



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월20일

(11) 등록번호 10-2770849

(24) 등록일자 2025년02월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/248 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7004699(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월06일
 심사청구일자 2024년03월06일
- (85) 번역문제출일자 2024년02월07일
- (65) 공개번호 10-2024-0023450
- (43) 공개일자 2024년02월21일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7014412
 원출원일자(국제) 2015년11월06일
 심사청구일자 2020년11월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/059532
- (87) 국제공개번호 WO 2016/073890
 국제공개일자 2016년05월12일
- (30) 우선권주장
 62/077,105 2014년11월07일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2007076927 A1
 WO2014074905 A1

- (73) 특허권자
 에프. 호프만 라-로셰 엘티디
 스위스, 4070 바젤, 그레자허스트라세 124
- (72) 발명자
 슈미트, 미카엘, 마치
 미국, 매사추세츠 02129, 보스턴, 에이퍼티.
 5114, 에이스 스트리트 42
 티스데일, 엘리슨
 미국, 매사추세츠 02478, 벨몬트, 화이트 스트리트
 207
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 13 항

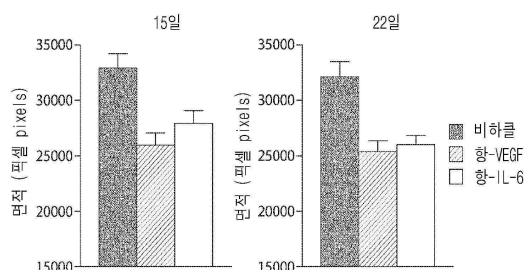
심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 향상된 IL-6 항체

(57) 요약

향상된 IL-6 항체를 제공한다. IL-6가 관련된 질환, 예를 들면, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)과 같은 안구 질환(ocular disease)에서의 항체의 사용을 개시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

펠파인, 에릭, 스티븐

미국, 매사추세츠 01773, 링컨, 링컨 알디 221

자비스-파파스토이치스, 그레고리스

미국, 매사추세츠 02472, 워터타운, 필립스 스트리트
34

(30) 우선권주장

62/087,448 2014년12월04일 미국(US)

62/247,705 2015년10월28일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) GYVLPNYLIE (서열번호 31)의 VH CDR1,
 (ii) VTTPGGGTIN (서열번호 32)의 VH CDR2, 및
 (iii) SRWDPLYYYALEY (서열번호 33)의 VH CDR3
 을 포함하는 중쇄 가변영역(heavy chain variable region) 및
 (i) RASESVDNYGIPFMN (서열번호 34)의 VL CDR1,
 (ii) AASNRRGS (서열번호 35)의 VL CDR2, 및
 (iii) QQSEEVPLT (서열번호 36)의 VL CDR3
 을 포함하는 경쇄 가변영역(light chain variable region)을 포함하는 것을 특징으로 하는,
 단리된 항- IL-6 항체(antibody) 또는 항원 결합 단편(antigen binding fragment).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 37을 포함하는 중쇄 가변영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39의 아미노산 1 내지 225, 서열번호 39, 서열번호 47 또는 서열번호 54를 포함하는 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41을 포함하는 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 38의 아미노산 1 내지 111을 포함하는 경쇄 가변영역 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변영역 서열을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은

(i) 20 pM IL-6로 HEK-Blue IL-6 분석에서 평가된 바와 같이 47 pM 미만의 IC₅₀ 또는

(ii) 20 pM IL-6로 HEK-Blue IL-6 분석에서 평가된 바와 같이 4350 pM 미만의 IC₉₀를 가지는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 토실리주마브(Tocilizumab) 또는 애플리버셉트(aflibercept)와 비교하여, 유리체 내(intravitreally)로 투여될 때 눈에 향상된 유지성(retention)을 가지는 것을 특징으로 하는, 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단리된 항- IL-6 항체 또는 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema, DME), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 건성안(dry eye), 알레르기성 결막염(allergic conjunctivitis), 포도막염(uveitis), 노인성 황반변성(age-related macular degeneration, AMD), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy, PDR), 열공성 망막박리(Rhegmatogenous retinal detachment, RRD), 망막정맥폐색(retinal vein occlusion, RVO), 시신경척수염(neuromyelitis optica, NMO)의 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 47을 포함하는 중쇄 서열 및 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열 및 적어도 60%의 항체의 IgG2-A 또는 IgG2-A/B 아형(isoforms), 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 조성물은 항체의 10% 미만의 IgG2-B 아형(isoforms)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항-IL-6 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 분야는 IL-6에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 분야는 IL-6의 조절 및 눈 질환과 같은 질환 치료에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 출원은 2014년 11월 7일자로 출원된 미국 가출원 제62/077,105호; 2014년 12월 4일 출원된 미국 가출원 62/087,448; 및 2015년 10월 28일자로 출원된 미국 가출원 62/247,705의 우선권을 주장한다. 이들 각각의 출원의 전문은 본 명세서에 참고로 삽입된다.

[0003] IL-6는 염증, 조혈(hematopoiesis), 혈관신생(angiogenesis), 세포 분화, 및 신경세포 생존(neuronal survival)에서 역할을 하는 것으로 보고된, 다면 발현성 사이토카인(pleiotropic cytokine)이다. 본 발명은 향상된 IL-6 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0004] 도 1은 항-IL-6 항체가 래트 CNV 모델에 투여된 실험 결과를 나타내는 그래프이다. 항-VEGF 항체는 양성 대조군으로서 투여되었고 음성 대조군은 비히클 단독이었다. 항-IL-6 대 비히클 대조군에 대하여 15일째에 $p = 0.0054$ 및 22일째에 $p = 0.0005$.

도 2는 gp130에 대하여 IL-6/IL-6R의 결합을 억제하는 마우스(murine) 64 항체의 능력을 테스트하는 결합 실험의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3A는 과도한 가용성 IL-6R α 의 부재에서 020이 IL-6 신호를 차단하는 능력에 대해 테스트된 실험을 나타내는 그래프이다. 실험은 0.2 ng/ml의 IL-6 및 2 μ g/ml의 IL6R α 로 HEK-Blue-IL-6 세포에서 수행되었다.

도 3B는 과도한 가용성 IL-6R α 의 존재에서 IL-6 신호를 차단하는 능력에 대해 테스트된 실험을 나타내는 그래프이다. 실험은 0.2 ng/ml의 IL-6 및 2 μ g/ml의 IL6R α 로 HEK-Blue-IL-6 세포에서 수행되었다.

도 4는 단클론 항-IL-6 항체 ("IL-6 차단")이 마우스 CNV 모델에 IVT가 투여된 실험 결과를 나타내는 그래프이다. 대조군은 비치료(반측 눈(contralateral eye)), 항-VEGF 항체의 유리체내 주사("VEGF 차단") 또는 항-HRP 동형(동형(isotype)) 대조군 항체("대조군 항체")의 유리체내 주사였다.

도 5는 (1) I51T/S55G, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, 및 (4) A28V/S30P/I51T/S55G (또한 EBI-

030로 언급됨)의 돌연변이를 가지는 항체에서, 야생형 항체 (EBI-029)에 비하여, IL-6에 대한 결합을 나타낸다.

도 6은 IL-6 및 하기의 Fabs의 하나로 처리된 HEK-Blue™ IL6 리포터 세포에서 분획 신호(fractional signaling)를 나타낸다: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

도 7은 나타낸 농도에서 IL-6 및 하기의 Fabs의 하나로 처리된 T1165.85.2.1 세포에서 루미네스스(luminescence) (IL-6로 유도된 증식 측정)를 나타낸다: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

도 8은 20 pM IL-6 및 다양한 농도의 (1) HEK-6E 세포에서 생산된 EBI-029 IgG2 (EBI029), (2) HEK-6E 세포에서 생산된 EBI-030 IgG2 (EBI030), 및 (3) HEK-6E 세포에서 생산된 EBI-030 IgG2-H311A (EBI030 H311A); (4) 토실리주마브 (TocI), 및 (5) 안정 CHO 풀(EBI-030 CHO)에서 생산된 EBI-030 IgG2로 처리된 HEK-Blue™ IL6 리포터 세포에서의 분획 신호를 나타낸다.

도 9는 실시예 20에서 설명된 약동학(pharmacokinetic)모델을 나타낸다.

도 10은 실시예 20에서 설명된 약동학 모델을 사용하여 모의 실험한(saimulated) 바와 같이, 눈에서 IL-6 억제 기간동안 항체 효력을 증가시키는 효과를 나타낸다.

도 11은 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 유리체(vitreous)에서 EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, 일리아®(Eylea®), 및 토실리주마브 (TCZ)의 상보결정부위(complementary determining regions)를 나타낸다.

도 12는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 망막(retina)에서 EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, 일리아®, 및 토실리주마브 (TCZ)의 상보결정부위를 나타낸다.

도 13은 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 방수(aqueous humor)에서 EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, 일리아®, 및 토실리주마브 (TCZ)의 상보결정부위를 나타낸다.

도 14는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 맥락막(choroid)에서 EBI-029, EBI-030, EBI-030-H311A, 일리아®, 및 토실리주마브 (TCZ)의 상보결정부위를 나타낸다.

도 15A는 EBI-029 (서열번호 11), EBI-030 (서열번호 41), 및 EBI-031 (또한 EBI-031은 본 명세서에서 EBI-030-H311A로서 언급됨) (서열번호 47)의 중쇄 서열에서 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, 힌지(hinge), CH2, 및 CH3의 위치를 나타낸다.

도 15B는 경쇄 서열 (EBI-029, EBI-030 및 EBI-031은 똑같은 경쇄 서열을 가짐) (서열번호 12)에서 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, 및 CK의 위치를 나타낸다.

도 16A는 20 pM의 IL-6 및 다양한 농도의 EBI-031 또는 토실리주마브로 처리된 HEK-Blue™ IL-6 리포터 세포에서 분획 신호를 나타낸다.

도 16B는 200 pM 과도한 IL-6 및 다양한 농도의 EBI-031 또는 토실리주마브로 처리된 HEK-Blue™ IL-6 리포터 세포에서 분획 신호를 나타낸다.

도 17은 실시예 24에서 설명된 컴퓨터 시뮬레이션의 결과를 나타낸다.

도 18은 이황화물 셔플링(disulfide shuffling)에 기인한 IgG2 항체의 3개의 다른 구조적 아형(isoforms)의 개략도를 나타낸다.

도 19는 EBI-031 시료의 RP-HPLC 크로마토그램을 나타낸다: 비처리 (상단 패늘), 5mM DTT (중간 패늘), 10 mM 시스테인 (하단 패늘).

도 20은 상이한 EBI-031 세포주로부터 수집된 EBI-031 시료의 RP-HPLC 크로마토그램을 나타낸다: 200L 규모 배양의 클론 세포주(상단 패늘), 부모 세포주로부터의 10L 규모 배양(중간 패늘), 및 세포의 안정적 형질감염된 풀 (하단 패늘).

도 21은 아형(isoforms)이 크로마토그램에서 각각의 피크를 대표하는 200L 규모 배양의 클론 세포주로부터 EBI-

031의 RP-HPLC 크로마토그램, 및 지정 및 수량을 나타낸다.

도 22A는 실시예 26에서 설명된 바와 같이, 아프리카 녹색(African green) 원숭이(K797)로부터 약동학 데이터를 나타내는 그래프이다.

도 22B는 실시예 26에서 설명된 바와 같이, 아프리카 녹색(African green) 원숭이(K679)로부터 약동학 데이터를 나타내는 그래프이다.

도 23은 아프리카 녹색 원숭이(K797 또는 K679) 및 피팅 곡선(fit curves)으로부터 약동학 데이터를 나타내는 그래프이다.

도 24A는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 유리체액(vitreous humor)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24B는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 방수(aqueous humor)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24C는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 맥락막(choroid)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24D는 유리체내 주사 후 시간이 지남에 따라 결막(conjunctiva)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24E는 유리체내 주사 후 지남에 따라 각막(cornea)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24F는 유리체내 주사 후 지남에 따라 홍채 섬모체(iris ciliary body)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24G는 유리체내 주사 후 지남에 따라 렌즈에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

도 24H는 유리체내 주사 후 지남에 따라 망막(retina)에서 EBI-031의 상보결정부위를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

요약

본 발명은 IL-6 항체 및 단편을 암호화하는 핵산뿐만 아니라, IL-6 항체 및 단편 (예를 들면, 항원-결합 단편) 또는 이의 유도체에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 항체, 단편 또는 이의 유도체의 용도에 관한 것이다. 항체 및 단편 또는 이의 유도체는, 예를 들면, IL-6 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. 실시형태에서, 항체, 단편, 또는 이의 유도체는 IL-6, 예를 들면, 인간 IL-6에 결합 (예를 들면, 특이적 결합)할 수 있다. 실시형태에서, 항체, 단편, 또는 이의 유도체는 IL-6의 부위 II (예를 들면, 인간 IL-6의 부위 II)에 결합 (예를 들면, 특이적 결합)할 수 있다.

일측면에서 본 명세서는 하기를 포함하는 중쇄 가변영역(heavy chain variable region)을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다

(i) GYX1LX2NYLIE (서열번호45)의 서열을 포함하는 VH CDR1,

(ii) VX3TPGX4GTIN (서열번호46)의 서열을 포함하는 VH CDR2, 및

(ii) VH CDR3,

여기서 하기의 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 모두)는 사실이다: X_1 은 A가 아니고, X_2 는 S가 아니며, X_3 은 I가 아니고 및 X_4 는 S가 아니다. 실시형태에서, X_1 은 A가 아니고, X_2 는 S가 아니며, X_3 은 I가 아니고 및 X_4 는 S가 아니다.

실시형태에서, X_1 은 V 또는 V에 대한 보존적 치환(conservative substitution)이다. 실시형태에서, X_2 는 P 또는 P에 대한 보존적 치환이다. 실시형태에서, X_3 는 T 또는 T에 대한 보존적 치환이다. 실시형태에서, X_4 는 G 또는 G에 대한 보존적 치환이다. 실시형태에서, 하기의 한개, 두개, 세개 또는 모두는 사실이다: X_1 은 V 또는 V에 대한 보존적 치환이고, X_2 는 P 또는 P에 대한 보존적 치환이고, X_3 는 T 또는 T에 대한 보존적 치환이고, X_4 는 G 또는 G에 대한 보존적 치환이다. 실시형태에서, X_1 은 V 또는 V에 대한 보존적 치환이고, X_2 는 P 또는 P에 대한 보존적 치환이고, X_3 는 T 또는 T에 대한 보존적 치환이고, X_4 는 G 또는 G에 대한 보존적 치환이다.

- [0013] 실시형태에서, X_1 은 V, I, L 및 M으로부터 선택된다. 실시형태에서, X_1 은 V, I 및 L로부터 선택된다. 실시형태에서, X_2 는 P 및 G로부터 선택된다. 실시형태에서, X_3 는 T 및 S로부터 선택된다. 실시형태에서, X_4 는 G 및 P로부터 선택된다.
- [0014] 실시형태에서, 하기의 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 모두)은 사실이다: X_1 은 V이고, X_2 는 P이고, X_3 는 T이고, 및 X_4 는 G이다. 실시형태에서, X_1 은 V이고, X_2 는 P이고, X_3 는 T이고, 및 X_4 는 G이다.
- [0015] 실시형태에서, VH CDR3은 서열번호 33의 서열을 포함한다.
- [0016] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성(affinity) 및/또는 증가된 효력(potency)을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 하기의 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 모두)을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들면, 그 외에 동일한 항체 또는 항원 결합 단편)과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다: X_1 은 A이고, X_2 는 S이고, X_3 은 I이고, 및 X_4 는 S이다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 31의 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 선택적으로 서열번호 33의 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함한다.
- [0018] 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 17에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함한다. 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 17에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열로 구성되거나 또는 서열번호 17로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이하다. 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 17로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이하다. 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 17로부터 1 내지 5개의 아미노산이 상이하다.
- [0019] 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 37에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함한다. 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 37에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열로 구성된다. 실시형태에서, 중쇄 가변영역은 서열번호 37로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이하다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 37을 포함하는 중쇄 가변영역 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 37로 구성된 중쇄 가변영역 서열을 포함한다.
- [0020] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이한 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39를 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab이다.
- [0021] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이한 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54를 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab이다.
- [0022] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv 서열을 포함하거나 scFv 서열로 구성된다.
- [0023] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRDPLYYALEYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVVDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (서열번호 52) 또는
- [0024] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVVDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRDPLYYALEYWGQGTITVTVSS (서열번호 53).
- [0025] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 52 또는 서열번호 53에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 52 또는 서열번호 53을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다.
- [0026] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는

99% 일치하는 중쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이한 중쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 서열번호 41을 포함하는 중쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41로 구성된 중쇄 서열을 포함한다.

[0027] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 EBI-029 또는 이의 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 4의 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 선택적으로 서열번호 6의 서열을 포함하는 VH CDR3을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 17을 포함하거나 서열번호 17로 구성된 중쇄 가변영역 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 24를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 11을 포함하거나 서열번호 11로 구성된 중쇄 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다.

[0028] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 4에 제공된 바와 같이 EBI-030 또는 EBI-031의 하나 또는 그 이상의 서열을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 도 15(예를 들면, 하나 또는 그 이상의 중쇄 서열의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, 힌지(hinge), CH2, 및 CH3 및/또는 경쇄 서열의 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, 및 CK)에 나타난 바와 같이 EBI-030 또는 EBI-031의 하나 또는 그 이상의 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄는 하나 또는 그 이상의 이황화 결합(disulfide bonds)으로 연결된다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 scFv이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv 또는 Fv 단편이다.

[0029] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 EBI-029의 하나 또는 그 이상의 해당하는 서열, 또는 본 명세서에 전문이 참고로서 삽입된, WO2014/074905에 설명된 항체의 서열을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대해 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 토실리주마브(Tocilizumab)와 비교하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성 및/또는 증가된 효력을 가진다.

[0030] 표 4: EBI-029, EBI-030, 및 EBI-031 서열의 요약 개요

표 4

설명	서열번호	서열
EBI-029 HC (IgG2) aa 서열	서열번호 11	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AAKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK T KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPLMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
EBI-029 HC -H311A	서열번호 10	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AAKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK T KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPLMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
EBI-029 LC aa 서열	서열번호 12	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMN WY QQKPGQP PKL LIYAASNRGS GVPDRFSGSG GTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEE VPL TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVC LL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
EBI-029 (IgG1) Fab HC aa 서열	서열번호 24	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AAKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVN HK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT

EBI-029 VH aa 서열	서열번호 17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNYLIE WVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRWDP LYYALEY WGQGTITVTVSS
EBI-029 VL aa 서열	서열번호 18	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMN WYQQ KPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAE DVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
EBI-029 HC CDR1	서열번호 4	GYALSNYLIE
EBI-029 HC CDR2	서열번호 5	VITPGSGTIN
EBI-029 HC CDR3	서열번호 6	SRWDPLYYALEY
EBI-029 LC CDR1	서열번호 7	RASESDNYGIPFMN
EBI-029 LC CDR2	서열번호 8	AASNRGs
EBI-029 LC CDR3	서열번호 9	QQSEEVPLT
EBI-030 HC (IgG2) aa 서열	서열번호 41	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGVITPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSRWDP LYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS LTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK T KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYP S D IAV EWESNGQPEN NYKTT P PMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
EBI-030 LC aa 서열	서열번호 42	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESD NYGIPFMN WY QQKPGQPPKL LIYAASNRGs GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQSEEVPLTFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVC LL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
EBI-030 (IgG1) Fab HC aa 서열	서열번호 39	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGVITPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGTAAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT
EBI-030 (IgG2) Fab HC aa 서열	서열번호 54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGGGTINYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRWDP LYYALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERK
EBI-030 VH aa 서열	서열번호 37	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGVITPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYALE YWGQGTITVTV SS
EBI-030 VL aa 서열	서열번호 38	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMN WYQQKPGQPPKLLIY AASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQSEEVPLTFG QGTKLEIKRTV
EBI-030 HC CDR1	서열번호 31	GYVLP NYLIE
EBI-030 HC CDR2	서열번호 32	VITPGGGTIN
EBI-030- HC CDR3	서열번호 33	SRWDPLYYALEY
EBI-030 LC CDR1	서열번호 34	RASESDNYGIPFMN
EBI-030 LC CDR2	서열번호 35	AASNRGs
EBI-030 LC CDR3	서열번호 36	QQSEEVPLT

EBI-031 IgG2 HC aa 서열	서열번호 47	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>TPGGGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS <u>RWDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKT ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSIVLTIV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
scFv VH-VL aa 서열	서열번호 52	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTINYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARS RWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQKPGQPPKLLIYAASNRSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQSQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
scFv VL-VH aa 서열	서열번호 53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWWYQKPGQPPKLLIYAASNRSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQSQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGSGGGSQVQLVQSGAEV KKPSSSVKVSCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCARS RWDPLYYYALEYWGQGTITVTVSS

- [0032] aa= 아미노산; na=핵산; HC=중쇄; LC=경쇄; VH=중쇄 가변영역; VL=경쇄 가변영역증가된 친화성 및/또는 증가된 효력은 본 명세서에 개시된 방법 및/또는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0033] 실시형태에서, 상기 친화성은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance(SPR))을 사용하여 평가된다.
- [0034] 실시형태에서, 상기 친화성은 적어도 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 또는 4 배 증가한다.
- [0035] 실시형태에서, 효력은 증가된다. 실시형태에서, 효력은 IC₅₀에서 증가 및/또는 IC₉₀에서 감소로 나타난 바와 같이 증가된다. 실시형태에서, IC₅₀은 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50 배 감소한다. 실시형태에서, IC₅₀은 적어도 약 50 배 감소한다. 실시형태에서, IC₉₀은 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500 배 감소한다. 실시형태에서, IC₉₀은 적어도 약 100 배 감소한다.
- [0036] 실시형태에서, 효력은 예를 들면, HEK-Blue™ 분석 또는 T1165 증식 분석을 사용하여 평가된다.
- [0037] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들면, 20 pM 자유 IL-6로 본 명세서에서 설명된 HEK-Blue™ 분석을 이용하여 얻어진 IC₅₀ 또는 IC₉₀ 값에 기초하여 평가된 바와 같이, 시스-IL-6 신호(cis-IL-6 signaling)을 억제한다.
- [0038] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 47 pM 미만(less than)의 IC₅₀ 및/또는 4350 pM 미만의 IC₉₀을 가진다. 실시형태에서, IC₅₀은 47 pM 미만, 예를 들면, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 또는 1 pM 미만이다. 실시형태에서, IC₉₀은 4350 pM 미만, 예를 들면, 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 또는 5 pM 미만이다. 실시형태에서, IC₅₀ 및/또는 IC₉₀은 20 pM IL-6로 HEK-Blue™ 분석법으로 평가한다.
- [0039] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들면, 20 pM IL-6로 HEK-Blue™ 분석법을 이용하여 얻어진 IC₅₀ 값에 기초하여 평가된 바와 같이, 토실리주마브(Tocilizumab)와 비교하여 거대한 효력으로 자유 IL-6(free IL-6)을 차단한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 토실리주마브와 비교하여 900 배 이상의 거대한 효력으로 IL-6을 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 EBI-031 또는 이의 항원 결합 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IL-6의 억제에 대하여, 15 pM 미만의 IC₅₀, 예를 들면, 14.2 pM 미만의 IC₅₀를 가진다.
- [0040] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들면, 200 pM 과도한(hyper) IL-6로 본 명세서에서 설명된 HEK-Blue™ 분석법을 이용하여 평가한 바와 같이, 트랜스-IL-6-신호(trans-IL-6 signaling)을 차단한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 과도한 IL-6에 의한 신호를 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 토실리주마브보다 거대한 효력으로, 예를 들면, 토실리주마브와 비교하여 900 배 거대한 효력으로 과도한 IL-6에 의한 신호를 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 1 μM 미만의 IC₅₀로 과도한 IL-6에 의한 신호를 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 1 nM 미만의 IC₅₀로 과도한 IL-6에 의한 신호

를 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 100 pM 미만 또는 50 pM 미만의 IC_{50} , 예를 들면, 약 14-15 pM의 IC_{50} 로 과도한 IL-6에 의한 신호를 억제한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 EBI-031 또는 이의 항원 결합 단편이다.

- [0041] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 시스-IL-6 신호 및 트랜스-IL-6 신호를 억제한다.
- [0042] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들면, 유리체 내 주입 후 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월 동안 눈에서 IL-6 신호를 차단하는데 효과적이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 유리체 내 주입 후 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월 동안 눈에서 IL-6 신호의 95%를 차단하는데 효과적이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 약 150 일 동안 눈에서 IL-6 신호의 95%를 차단한다.
- [0043] 다른 측면에서 본 명세서는 서열번호 37에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 중쇄 가변영역 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하고, 상기 중쇄 서열은 V28, P30, T51, 및 G55 (아미노산의 번호 매김은 서열번호 41에 따른 것이다)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4)의 아미노산을 포함한다.
- [0044] 추가적 측면에서 본 명세서는 서열번호 39에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 서열은 V28, P30, T51, 및 G55(아미노산의 번호 매김은 서열번호 41에 따른 것이다)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4)의 아미노산을 포함한다.
- [0045] 추가적 측면에서 본 명세서는 서열번호 54에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 서열은 V28, P30, T51, 및 G55(아미노산의 번호 매김은 서열번호 41에 따른 것이다)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4)의 아미노산을 포함한다.
- [0046] 또한 본 명세서는 서열번호 41에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 중쇄 서열을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 중쇄 서열은 V28, P30, T51, 및 G55(아미노산의 번호 매김은 서열번호 41에 따른 것이다)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4)의 아미노산을 포함한다.
- [0047] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 대조군 항체, 예를 들면, EBI-029 또는 이의 단편에 비하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 V28, P30, T51, 및 G55로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하지 않고 그 대신에 A28, S30, I51, 및 S55로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 (예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4) 아미노산을 포함하는 것을 제외하고 그 외에는 일치하는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 인간 IL-6에 대하여 증가된 친화성을 가진다. 실시형태에서, 상기 친화성은 적어도 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 또는 4 배 증가한다. 실시형태에서, 상기 친화성은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 평가된다.
- [0048] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 대조군 항체, 예를 들면, EBI-029 또는 이의 단편에 비하여 증가된 효력을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 V28, P30, T51, 및 G55로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하지 않고 그 대신에 A28, S30, I51, 및 S55로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 (예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4) 아미노산을 포함하는 것을 제외하고 그 외에는 일치하는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 증가된 효력을 가진다.
- [0049] 실시형태에서, 효력은 IC_{50} 에서 감소 및/또는 IC_{90} 에서 감소로 나타난 바와 같이 증가된다. 실시형태에서, IC_{50} 는 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50 배 감소한다. 실시형태에서, IC_{50} 는 적어도 약 50배 감소한다. 실시형태에서, IC_{90} 는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500배 감소한다. 실시형태에서, IC_{90} 는 적어도 약 100 배 감소한다.
- [0050] 실시형태에서, 효력은 HEK-BlueTM 분석 또는 T1165 증식 분석을 이용하여 평가된다.
- [0051] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 47 pM 미만의 IC_{50} 및/또는 4350 pM미만의 IC_{90} 을 가진다. 실시형태에서, IC_{50} 은 47 pM 미만, 예를 들면, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 또는 1 pM 미만이다. 실시형태에서, IC_{90} 은

4350 pM 미만, 예를 들면, 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 또는 5 pM 미만이다. 실시형태에서, IC₅₀ 및/또는 IC₉₀은 20 pM IL-6로 HEK-Blue™ 분석법으로 평가된다.

- [0052] 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 V28, P30, T51, 및 G55를 포함하고, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 A28, S30, I51, 및 S55를 포함하는 것을 제외하고 그 외에는 일치하는 항체 또는 항원 결합 단편과 비교하여 인간 IL-6에 대한 향상된 친화성 및/또는 향상된 효력을 나타낸다.
- [0053] 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는, 경쇄 가변영역 또는 이의 항원 결합 단편을 추가적으로 포함한다.
- [0054] 실시형태에서, 상기 VL CDR1은 서열번호 34의 서열을 포함하고, VL CDR2은 서열번호 35의 서열을 포함하며, VL CDR3은 서열번호 36의 서열을 포함한다.
- [0055] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 38에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 경쇄 가변영역 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0056] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 38을 포함하거나 서열번호 38로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이한 경쇄 가변영역 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0057] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변영역 서열을 추가적으로 포함한다. 실시형태에서, 경쇄 가변영역 서열은 서열번호 38로 구성된다.
- [0058] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 42에 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 일치하는 경쇄 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0059] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 42로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하(no more than)의 아미노산이 상이한 경쇄 서열을 포함한다.
- [0060] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함한다.
- [0061] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열 또는 서열번호 42로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산이 상이한 서열을 추가적으로 포함한다. 실시형태에서, 경쇄 서열은 서열번호 42로 구성된다.
- [0062] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은
- [0063] (i) 서열번호 31의 서열을 포함하는 VH CDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 VH CDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 VH CDR3 및 (ii) 서열번호 34의 서열을 포함하는 VL CDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 VL CDR1, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 VL CDR3을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 돌연변이, 예를 들면, 6개 모두의 CDRs에서 많아야 총 1, 2, 또는 3개의 돌연변이를 가지는 것을 제외한 앞서 언급한 CDRs를 포함한다. 실시형태에서, 상기 돌연변이(s)는 항체 또는 항원 결합 단편의 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.
- [0064] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체 또는 이의 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1 또는 IgG2 항체 또는 이의 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1 Fab 또는 IgG2 Fab이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG2 항체 또는 항원 결합 단편이다.
- [0065] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 ADCC 활성을 감소시키거나 또는 제거하기 위하여 조작(engineered)된다.
- [0066] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화(humanized)되거나 인간 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0067] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 37을 포함하거나 서열번호 37로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 38을 포함하거나 서열번호 38로 구성된 경쇄 가변영역을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 돌연변이, 예를 들면, 총 많아야 1, 2, 또는 3개의 돌연변이를 갖는 것을 제외하고 앞서 언급한 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함한다. 실시형태에서, 상기 돌연변이(s)는 항체 또는 항원 결합 단편의 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.

- [0068] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41을 포함하는 중쇄 서열 및 선택적으로 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함한다.
- [0069] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41로 구성된 중쇄 서열 및 선택적으로 서열번호 42로 구성된 경쇄 서열을 포함한다.
- [0070] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 47을 포함하는 중쇄 서열 및 선택적으로 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함한다.
- [0071] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편이 돌연변이(예를 들면, 서열번호 41 및/또는 서열번호 42에 비하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 총 돌연변이)를 포함한다는 것을 제외하고는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41에 일치하는 중쇄 서열 및 서열번호 42에 일치하는 경쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 돌연변이는 골격 영역에 있다. 실시형태에서, 상기 돌연변이는 돌연변이를 포함하지 않는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 항체 또는 항원 결합 단편의 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.
- [0072] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편이 돌연변이(예를 들면, 서열번호 47 및/또는 서열번호 42에 비하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 총 돌연변이)를 포함한다는 것을 제외하고는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 47에 일치하는 중쇄 서열 및 서열번호 42에 일치하는 경쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 돌연변이는 골격 영역에 있다. 실시형태에서, 상기 돌연변이는 돌연변이를 포함하지 않는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 항체 또는 항원 결합 단편의 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.
- [0073] 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab이다.
- [0074] 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1 Fab이다.
- [0075] 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39를 포함하는 중쇄 및 서열서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 분리된 Fab이다. 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39로 구성된 중쇄 서열 및 서열번호 42로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 분리된 Fab이다.
- [0076] 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG2 Fab이다.
- [0077] 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54를 포함하는 중쇄 서열 및 서열번호 42를 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 분리된 Fab이다. 일실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54를 포함하는 중쇄 서열 및 서열번호 42로 구성된 경쇄 서열을 포함하는 분리된 Fab이다.
- [0078] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 돌연변이(예를 들면, 서열번호 39 및/또는 서열번호 42에 비하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 총 돌연변이)를 포함하는 것을 제외하고는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 39에 일치하는 중쇄 서열 및 서열번호 42에 일치하는 경쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 상기 돌연변이는 골격 영역 내에 있다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 돌연변이를 포함하지 않는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.
- [0079] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 돌연변이(예를 들면, 서열번호 54 및/또는 서열번호 42에 비하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 총 돌연변이)를 포함하는 것을 제외하고는, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 54에 일치하는 중쇄 서열 및 서열번호 42에 일치하는 경쇄 서열을 포함한다. 실시형태에서, 상기 돌연변이는 골격 영역 내에 있다. 실시형태에서, 상기 돌연변이는 돌연변이를 포함하지 않는 항체 또는 항원 결합 단편에 비하여 항체 또는 항원 결합 단편의 친화성 및/또는 효력을 감소시키지 않는다.
- [0080] 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 하나의 R24, K27, Y31, D34, S118, 또는 V121에 결합할 수 있다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합할 수 있다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합할 수 있다.
- [0081] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 부위 II에 결합 (예를 들면, 특이적 결합) 할 수 있다.
- [0082] 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 70℃ 이상의 T_m을 갖는 IL-6에 결합할 수 있다.
- [0083] 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 80℃ 이상의 T_m을 갖는 IL-6에 결합할 수 있다.
- [0084] 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편(예를 들면, 이의 항원 결합 단편)은 인간 IL-6의 적어도 하나의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다.

- [0085] 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 2개의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 3개의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 4개의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 적어도 5개의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IL-6의 R24, K27, Y31, D34, S118, 및 V121에 결합한다.
- [0086] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 단클론 항체이다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 단클론 항체이다.
- [0087] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 100-150 mg/ml의 농도, 예를 들면, PBS, pH 7.4에서 약 142 mg/ml의 농도에서 <10% 집합(aggregation)을 나타낸다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 다른 치료제, 예를 들면, 토실리주마브(Tocilizumab), 베바시주마브(bevacizumab), 라니비주마브(ranibizumab), 및/또는 일리아®(Eylea®)와 비교하여 향상된 약동학적 특성(pharmacokinetic properties)을 가진다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 눈, 예를 들면, 유리체내, 예를 들면, 유리체내 주입에 의해 투여될 때 눈에 향상된 유지성을 가진다. 실시형태에서, 눈에서 향상된 유지성은 눈에서, 예를 들면, 유리체(vitreous), 망막(retina), 방수(aqueous humor), 맥락막(choroid) 및/또는 공막(sclera)에서 증가된 반감기에 의해 나타난다.
- [0088] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 유리체(vitreous)에서 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 일의 반감기를 가진다. 실시형태에서, 유리체에서 상기 반감기는 적어도 10 일이다. 실시형태에서, 유리체에서 반감기는 동물, 예를 들면, 래빗 또는 원숭이에서 평가된다. 실시형태에서, 유리체에서 반감기는 인간에서 평가된다.
- [0089] 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 전신성 반감기(systemic half life) (예를 들면, 더 낮은 T1/2β) 및/또는 향상된 전신성 제거율, 예를 들면, 다른 치료제, 예를 들면, 토실리주마브, 베바시주마브(bevacizumab), 라니비주마브(ranibizumab), 및/또는 아플리베르셉트(aflibercept) (Eylea®)의 것과 비교하여 감소된 전신성 반감기 또는 더 빠른 전신성 제거율을 가진다. 실시형태에서, 전신성 반감기 (예를 들면, T1/2β)는 토실리주마브 및/또는 아플리베르셉트(Eylea®)의 것보다 더 낮다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 H311, D313, I254, 또는 H436 (서열번호 41에서와 같이 번호 매김)에 해당하는 하나 또는 그 이상의 위치에서 돌연변이 (예를 들면, 1, 2, 3, 또는 4에서 돌연변이)를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 실시형태에서, 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R, 및 H436A로부터 선택된다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 H311A (서열번호 41에서와 같이 번호 매김)에 해당하는 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG2 Fc 도메인이다.
- [0090] 실시형태에서, Fc 도메인은 서열번호 50의 서열을 가지는 인간 IgG1 Fc 도메인이고 하나 또는 그 이상의 밀줄친 위치: (H90, D92, I33, 및 H215)에서 돌연변이를 포함한다:
- [0091] DKHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 50).
- [0092] 실시형태에서, IgG1 Fc 도메인은 하나 또는 그 이상의 H90A, H90E, H90N, D92T, I33A, I33R, 및 H215A(서열번호 50에 따른 번호 매김)에 해당하는 돌연변이를 포함한다.
- [0093] 실시형태에서, Fc 도메인은 서열번호 51의 서열을 가지는 인간 IgG2 Fc 도메인이고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 밀줄친 위치 (H86, D88, I29, 및 H211)에서 돌연변이를 포함한다:
- [0094] VECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 51).
- [0095] 실시형태에서, IgG2 Fc 도메인은 하나 또는 그 이상의 H86A, H86E, H86N, D88T, I29A, I29R, 및 H211A (서열번호 51에 따른 번호 매김)에 해당하는 돌연변이를 포함한다.
- [0096] 실시형태에서, Fc 돌연변이는 항체 또는 항원 결합 단편의 전신성 축적을 감소(예를 들면, 제거율의 증가 또는

반감기, 예를 들면, 항체 또는 항원 결합 단편의 T1/2 β 의 감소)시킨다. 실시형태에서, 전신성 축적은 다른 치료제 (예를 들면, 토실리주마브, 베바시주마브, 라니비주마브, 및/또는 아플리베르셉트)의 것과 비교하여 감소된다. 실시형태에서, 전신성 축적은 토실리주마브 및/또는 아플리베르셉트의 것과 비교하여 감소된다. 실시형태에서, 전신성 축적은 돌연변이를 포함하지 않는 해당 항체 또는 항원 결합 단편의 전신성 축적과 비교하여 감소된다. 실시형태에서, 전신성 축적은 항체 또는 항원 결합 단편의 유리체내 주입 이후에 평가된다.

[0097] 본 명세서에 개시된 다른 측면에서 개체에서 IL-6을 억제하는 전신성 효과를 감소시키는 방법, 본 명세서에 설명된 바와 같이 돌연변이된 Fc 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 개체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 야생형 Fc 도메인을 가지는 해당 항체 또는 이의 단편과 비교하여 IL-6의 활성을 억제할 수 있고 Fc 활성(예를 들면, FcRn에 대해 감소된 결합)을 감소시킨다. 일부 경우에서, 개체에서 IL-6을 억제하는 전신성 효과를 감소시키는 방법은 본 명세서에 설명된 바와 같이 돌연변이된 Fc 도메인을 포함하는 IL-6 길항제를 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0098] 추가적 측면에서, 본 명세서는 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 실시형태에서, 상기 핵산은 본 명세서에 개시된 아미노산 서열을 암호화한다. 실시형태에서, 상기 핵산 서열은 서열번호 40, 서열번호 43, 또는 서열번호 48을 포함한다. 실시형태에서, 핵산은 요약 4에 개시된 서열을 암호화한다.

[0099] 또한 본 명세서는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 또한 본 명세서는 핵산 또는 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0100] 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 IL-6 항체 또는 항원 결합 단편은 IL-6 관련된 질환을 가지는 개체 (예를 들면, 인간)의 치료에 사용을 위한 것이다. 실시형태에서, 질환은, 예를 들면, 유리체(vitreous)에서 상승된 수준의 IL-6로 특징되는, 안구(ocular) 질환이다.

[0102] *실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema) (DME), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 녹내장(glaucoma), 건성안(dry eye) (예를 들면, 건성안 질환 또는 건성안 증후군(dry eye syndrome), 알레르기결막염(allergic conjunctivitis), 안구통증(ocular pain), 열공망막박리(rhegmatogenous retinal detachment (RRD)), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration)(AMD), 증식성 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy) (PDR), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상(physical injury to eye)을 가지는 개체 (예를 들면, 인간)의 치료에 사용을 위한 것이다.

[0103] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 DME를 갖는 개체 (예를 들면, 인간)의 치료 용도에 관한 것이다. 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 IL-6 항체 또는 항원 결합 단편은 IL-6와 관련된 질환 치료를 위한 의약 조성물의 용도에 관한 것이다. 실시형태에서, 상기 질환은 유리체(vitreous)에서 상승된 수준의 IL-6로 특징되는 안구(ocular) 질환이다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME)), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 건성안(dry eye) (예를 들면, 건성안 질환 또는 건성안 증후군(dry eye syndrome)), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration(AMD)), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy(PDR)), 열공망막박리(rhegmatogenous retinal detachment (RRD)), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상(physical injury to eye)이다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)이다. 실시형태에서, 의약은 개체의 눈(예를 들면, 유리체내 주입을 위해)에 운반되도록 제조된다.

[0104] 또한 본 명세서는 본 명세서에 설명된 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 제공한다. 실시형태에서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0105] 실시형태에서, 조성물은 IL-6 관련된 질환의 치료에 사용을 위한 것이다. 실시형태에서, 질환은 안구(ocular) 질환, 예를 들면, 유리체에서 상승된 수준의 IL-6로 특징되는 안구 질환이다. 실시형태에서, 조성물은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME)), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 건성안(dry eye) (예를 들면, 건성안 질환 또는 건성안(dry eye syndrome), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration(AMD)), 증식성 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy(PDR)), 열공망막박리

(rhegmatogenous retinal detachment(RRD)), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상의 치료에 사용을 위한 것이다.

[0106] 또한 본 명세서에는 본 명세서에 설명된 IL-6 항체 또는 단편의 치료적 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, IL-6 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 유리체에서 상승된 수준의 IL-6로 특징되는 안구 질환이다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME)), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 건성안(dry eye) (예를 들면, 건성안 질환 또는 건성안 증후군(dry eye syndrome), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration(AMD)), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy(PDR)), 열공망막박리(Rhegmatogenous retinal detachment (RRD)), 망막정맥폐쇄 (retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 대한 물리적 손상(physical injury to eye)이다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)이다.

[0107] 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 조성물은 개체의 눈의(예를 들면, 유리체 내 주입에 의해) 유리체(vitreous)로 운반된다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편은 유리체 내 주입을 위한 것이다.

[0108] 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)이고 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편은 개체의 눈에 운반된다.

[0109] 또한 본 명세서에는 항체 또는 이의(예를 들면, 본 명세서에 설명된 IL-6 항체 또는 이의 단편) 단편(예를 들면, 항원 결합 단편), 상기 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을 IL-6 관련된 질환 (예를 들면, IL-6 관련된 질환을 갖는 개체, 예를 들면 인간 개체의 치료에 사용을 위한)의 치료를 위한 것이다.

[0110] 실시형태에서, 상기 질환은 예를 들면, 유리체에서 상승된 수준의 IL-6에 의해 특징되는 안구(ocular) 질환이다. 실시형태에서, 상기 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME)), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 건성안(예를 들면, 건성안 장애(dry eye disorder) 또는 건성안 질환(dry eye disease), 알레르기결막염(allergic conjunctivitis), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration(AMD)), 증식당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy (PDR)), 열공망막박리(Rhegmatogenous retinal detachment(RRD)), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상이다. 실시형태에서, 상기 질환 DME이다. 실시형태에서, 상기 질환은 건성안 질환이다. 실시형태에서, 상기 질환은 건성안 증후군(dry eye syndrome)이다. 실시형태에서, 상기 질환은 포도막염(uveitis)이다. 실시형태에서, 상기 질환은 AMD이다. 실시형태에서, 상기 질환은 PDR이다. 실시형태에서, 상기 질환은 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상이다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편(예를 들면, 항원 결합 단편)은 눈의 유리체(vitreous)로 운반되는데 적절하다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편(예를 들면, 항원 결합 단편)은 눈의 유리체로 운반된다.

[0111] 또한 본 명세서에는 L-6 항체 또는 이의 단편 (예를 들면, 이의 항원 결합 단편), 예를 들면, 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6 항체 또는 이의 단편을 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 실시형태에서, IL-6 항체 또는 이의 단편 (예를 들면, 이의 항원 결합 단편)은 치료적 유효량으로 투여된다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 유리체에서 상승된 수준의 IL-6으로 특징으로 되는 안구(ocular) 질환이다. 실시형태에서, 상기 IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME)), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 포도막염(uveitis), 건성안 증후군(dry eye syndrome), 건성안(dry eye) 질환, 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration(AMD)), 증식성 당뇨병성 망막증(proliferative diabetic retinopathy (PDR)), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO)), 각막이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 눈에 물리적 손상이다.

[0112] 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편 (예를 들면, 이의 항원 결합 단편)은, 눈의 유리체로 운반되는데 적절하다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편(예를 들면, 이의 항원 결합 단편)은, 개체의 눈의 유리체로 운반되는데 적절하다. 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)이고 상기 항체 또는 이의 단편은 개체의 눈의 유리체로 운반되는데 적절하다.

- [0113] 본 발명은 본 명세서에 개시된 IL-6 항체 또는 조성물, 선택적으로, 사용지침(instructions for use)을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0114] 또한 본 발명은 본 명세서에 개시된 IL-6 항체 또는 조성물을 포함하는, 용기(container) 또는 장치(device), 예를 들면, 약물 운반 장치(a drug delivery device)를 제공한다. 실시형태에서, 상기 장치는 눈, 예를 들면, 유리체로 항체 또는 조성물을 운반용(configured for delivery) 장치이다. 또한 본 명세서는 상기 용기 또는 장치를 포함하는 키트이다.
- [0115] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 번역글로불린과 동의어이고 일반적으로 당업계에 알려진 것으로 이해된다. 용어 항체는 항체를 생산하는 임의의 특정한 방법으로 제한되지 않는다. 예를 들면, 용어 항체는 그중에서도, 제조항 항체, 단클론 항체, 및 다클론 항체를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 항체는 사합체(tetramer)이고, 달리 개시되지 않는한, 각각은 2개의 동일한 폴리펩타이드 사슬 쌍으로 구성되었고, 각각의 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 가지고 있다. 각각의 사슬의 아미노 말단은 항원을 인식하는데 주용한 역할을 하는 약 100 내지 120 개 또는 그 이상의 가변영역을 포함한다. 각각의 사슬의 카르복시-말단의 일부는 항체 작용 기능(antibody effector function)에 주요한 역할을 가지는 불변 부위를 포함한다. 인간 경쇄의 분류는 카파(kappa) 및 람다(lambda) 경쇄로 불린다. 중쇄 분류는 무(mu), 델타(delta), 감마(gamma), 알파(alpha), 또는 엡실론(epsilon)이고, 항체의 동형(isotype)으로 정의된다. 항체 동형(Antibody isotype)은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE이다. 경쇄 및 중쇄 내에서 가변 및 불변 부위는 약 3개 또는 그 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함하는 중쇄와 함께, 약 12개 또는 그 이상의 아미노산의 "J" 영역으로 연결되어 있다.
- [0116] 각각의 중쇄/경쇄 쌍 (VH 및 VL)의 가변영역은, 각각, 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 예를 들면 완전한 IgG 항체는 2개의 결합 부위를 가진다. 양기능 또는 양특이성 항체를 제외하고, 2개의 결합 부위는 같다(same).
- [0117] 항체 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 상보 결정부위(complementary determining regions) 또는 CDRs로 불리는, 3개의 고도가변영역(hypervariable region)에 의해 결합된 상대적으로 보존된 골격 영역(relatively conserved framework regions(FR))의 같은 일반적 구조를 나타낸다. 용어 "가변(variable)"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 중의 서열에서 극히 상이하다는 사실을 의미하고 자체의 특이적 항원에 대해 각각의 특이적 항체의 결합 및 특이성을 포함한다. 가변성(Variability)은 매우 높게 보존된 골격 영역(FRs)에 의해 분리된, CDRs에서 주로 놓여있다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 임무는 번역학적으로 관심있는 단백질 카바트(Kabat) 서열의 정의에 따라 National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 및 1991)), 또는 당업계에 알려진 방법을 설명하는, Chothia 및 Lesk, J Mol Biol 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)에 따라 만들어지는 것이다.
- [0118] "야생형(wild type)"은 항원-결합 분자의 아미노산을 변경하기 위한 제조항 방법 등의 사용, 돌연변이와 같은, 조작된 형태로 얻어진 대립형질(allele) 또는 다형체(polymorphism), 또는 변이체 또는 유도체와 비교하여, 집단에서 발견되는 가장 일반적인 대립형질(prevalent allele) 또는 종(species) 또는 조작되지 않은 동물로부터 얻어진 항체를 의미할 수 있다.
- [0119] 용어 "항체 단편"은 완전한 또는 전장의 사슬(chain) 또는 항체의 일부, 일반적으로 표적 결합 또는 가변영역을 의미한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. "기능적 단편" 또는 "항-IL-6 부위 II 항체의 유사체"는 수용체에 결합하는 IL-6의 능력을 방지 또는 실질적으로 감소시켜, gp130에 결합하는 IL-6/IL-6R 복합체의 능력을 감소시키거나, gp130에 결합 또는 신호를 개시하는 리간드의 능력을 감소시킬 수 있는 단편이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "항원 결합 단편" 또는 "기능적 단편"은 일반적으로 "항체 단편"과 동의어이고 수용체에 결합하는 IL-6의 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시켜 gp130에 결합 또는 신호를 개시하는 IL-6/IL-6R 복합체의 능력을 감소시킬수 있는 Fv, Fab, F(ab')₂ 등과 같은 단편을 의미할 수 있다.
- [0120] 항체의 "유도체"는 본 명세서에 개시된 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 폴리펩타이드이다. 일반적으로, 상기 유도체는 IL-6의 부위 II에 결합할 수 있다.
- [0121] "경쟁(Compete)"은 첫번째 항체, 또는 이의 단편이 결합을 위해 두번째 항체 또는 이의 단편과 경쟁할 수 있는데, 예를 들면, 두번째 항체의 부재하에서의 첫번째 항체의 결합과 비교하여 두번째 항체의 존재하에서 자체의 항원결정인자를 갖는 첫번째 항체의 결합이 감지될 정도로 감소되는 것과 같다. 일부 경우에서, 또한 상기 용어는 첫번째 항체의 존재에서 감지될 정도로 감소되는 자체의 항원결정인자에 대한 두번째 항체의 결합을 의미할 수 있다. 비제한적 실시예에서, 상기 경쟁의 기전은 입체구조적 간섭(stric hindrance), 입체형태적 변화,

공통 항원결정인자에 대한 결합을 경유할 수 있다.

[0122] 핵산 서열의 문맥에서 용어 "퍼센트 서열 일치성"은 최대 관련성을 위하여 정렬될 때 똑같은 2개의 서열의 잔기를 의미한다. 서열 일치성 비교의 길이는 적어도 약 9개 뉴클레오타이드, 예를 들면, 적어도 약 18개 뉴클레오타이드, 적어도 약 24개 뉴클레오타이드, 적어도 약 28개 뉴클레오타이드, 적어도 약 32개 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 뉴클레오타이드, 또는 적어도 약 48개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드일 수 있다. 당업계에 알려진 알고리즘은 뉴클레오타이드 서열 일치성을 측정하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 서열은 FASTA, Gap 또는 Bestfit (Wisconsin Package 버전 10.0, Genetics 컴퓨터 Group (GCG), Madison, WI)을 사용하여 비교될 수 있다. 예를 들면, 프로그램 FASTA2 및 FASTA3을 포함하는 FASTA는 문의(query) 및 검색(search) 서열 사이의 최대 겹치는 영역의 정렬(alignment) 및 퍼센트 서열을 제공한다(Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol 266:227-258 (1996); Pearson, J Mol Biol 276:71-84 (1998); 본 명세서에 참고로 삽입됨). 특정 프로그램 또는 알고리즘을 위한 기본 파라미터(default parameter)는 일반적으로 사용된다. 예를 들면, 핵산 서열 사이의 퍼센트 서열 일치성은 자체의 기본 파라미터(단어크기 6 및 매트릭스(matrix) 점수를 매기기 위한 NOPAM 인자)를 갖는 FASTA를 사용하거나 또는 본 명세서에 참고로 삽입된, GCG 버전 6.1에서 제공된 것처럼, 자체의 기본 파라미터를 갖는 갭(Gap)을 사용하여 결정될 수 있다.

[0123] 아미노산 서열의 문맥에서 용어 "퍼센트 서열 일치성"은 최대 관련성을 위하여 정렬될 때 2개의 서열의 잔기를 의미한다. 서열 일치성 비교의 길이는 적어도 약 5개의 아미노산 잔기, 예를 들면, 적어도 약 20개의 아미노산 잔기, 적어도 약 30개의 아미노산 잔기, 적어도 약 50개의 아미노산 잔기, 적어도 약 100개의 아미노산 잔기, 적어도 약 150개의 아미노산 잔기, 또는 적어도 약 200개 또는 그 이상의 아미노산 잔기일 수 있다. 폴리펩타이드를 위한 서열 일치성은 일반적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 퍼센트 서열 일치성의 결정을 위한 알고리즘은 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 아미노산 서열은 FASTA, 갭(Gap) 또는 Bestfit(Wisconsin Package 버전 10.0, Genetics 컴퓨터 Group (GCG), Madison, WI)을 사용하여 비교될 수 있다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 다양한 치환(substitutions), 결실(deletions) 및 다른 변형(modifications)을 사용하여 서열을 짝지을 수 있다(matches). 예를 들면, 상기 GCG는 "Gap" 및 "Bestfit"와 같은 프로그램을 포함할 수 있는데, 이것은 상이한 종의 유기체로부터의 동종(homologous) 폴리펩타이드와 같은, 가깝게 관련된 폴리펩타이드 사이 또는 야생형 단백질과 이의 유사체 사이의 서열 동종성 또는 서열 일치성을 결정하기 위한 프로그램에 의해 구체화될 수 있는 기본 파라미터로 사용될 수 있다. 예를 들면, GCG 버전 6.1 (University of Wisconsin, Madison, WI)을 참고하기 바랍니다. 또한 폴리펩타이드 서열은 기본 또는 추천된 파라미터를 사용한 FASTA를 사용하여 비교될 수 있고, GCG 버전 6.1. FASTA (예를 들면, FASTA2 및 FASTA 3)이 문의(query) 및 검색(search) 서열 사이의 최대 중복 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 일치성을 제공한다는 것을 참고하십시오(Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000)). 상이한 유기체로부터 다수의 서열을 포함하는 데이터베이스에 대한 서열을 비교할 때 사용될 수 있는 다른 알고리즘은 프로그램과 같이 공급된 기본 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 예를 들면, blastp 또는 tblast이다. 예를 들면, Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990); Altschul et al., 핵산 Res 25:3389-402 (1997)을 참고하십시오.

[0124] 단백질 또는 폴리펩타이드는 시료의 적어도 약 60 내지 75%가 단일 종의 폴리펩타이드를 나타낼 때 "실질적으로 순수한," "실질적으로 균일한(homogeneous)," 또는 "실질적으로 정제된(purified)"이다. 폴리펩타이드 또는 단백질은 단량체(monomeric) 또는 다량체(multimeric)일 수 있다. 실질적으로 순수한 폴리펩타이드 또는 단백질은 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 순수함을 포함할 수 있다; 예를 들면, 실질적으로 순수한 폴리펩타이드 또는 단백질은 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 순수하다. 단백질 순도 또는 균일성(homogeneity)은 적절한 수단, 예를 들면, 단백질 시료의 폴리아크릴아미드겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)에 이온 단백질 또는 폴리펩타이드(예를 들면, 젤 염색에 따른)와 관련된 하나 또는 그 이상의 밴드를 육안으로 관찰, 크기별 제외 고성능액체크로마토그래피(size-exclusion HPL), 양이온 교환 고성능액체크로마토그래피(cation-exchange HPLC), SDS에서 환원모세관전기영동(reduced capillary electrophoresis), 펩타이드 맵핑(mapping), 또는 글리칸 맵핑(glycan mapping)으로 평가될 수 있다.

[0125] 핵산 또는 이의 단편을 언급할 때 용어 "실질적 유사성(substantial similarity)"은 적절한 핵산 삽입(insertions) 또는 다른 핵산(또는 상보적 가닥)과의 결실과 최적으로 정렬될 때를 의미하고, 여기에는 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 및 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오타이드 베이스(bases), 예를 들면, FASTA, BLAST 또는 Gap과 같은, 알려진 알고리즘의 서열 일치성에 의해 측정되는 85%, 90%, 95%, 96%,

98%, 또는 99% 서열 일치성이 있다.

[0126] 폴리펩타이드에 적용된 바와 같이, 용어 "실질적 일치성" 또는 "실질적 유사성"은 프로그램과 같이 공급되는 기본 갭 중량(default gap weights)을 사용하여 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때, 2개의 아미노산 서열이 적어도 약 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 일치성; 예를 들면, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 일치성을 공유(share)하는 것을 의미한다. 특정 실시형태에서, 동일하지 않은 잔기는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다.

[0127] "치료적 유효량"은 치료받는(being treated) 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 완화하거나 IL-6 관련된 질환을 치료하는데 유용한 다른 치료법(예를 들면, 다른 치료제)의 예방 및 또는 치료 효과를 증강 또는 향상시키도록 투여되는 치료제의 양을 의미한다. 치료적 유효량은 제한된 시간에 걸쳐 다수의 용량으로 또는 만성 치료로서 투여될 수 있다.

[0128] "치료하기(Treat)", "치료하는 것(treating)" 및 "치료(treatment)"는 질환의 하나 또는 그 이상의 징후 또는 증상을 완화하는 방법을 의미한다.

[0129] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "질환"은 질환 및 장애를 포함한다.

[0130] 본 명세서에서 언급된 각각의 특허 문서 및 과학 논문의 전문 개시, 및 이들에 의해 인용된 특허 문서 및 과학 논문은 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로서 명시적으로 삽입된다.

[0131] 본 발명의 추가적인 특징 및 장점은 하기에 더욱 특히 설명된다.

[0132] 상세한 설명

[0133] IL-6은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)과 같은 다수의 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 연루되었고, 안구(ocular) 질환을 포함하는, 다수의 질환에서 현저히 상향조절되는 것으로 보고되었다. IL-6은 시스(cis)- 및 트랜스(trans)-기전을 경유하여 작용할 수 있다. 시스 기전에서, IL-6 수용체에 결합된 막(membrane)에 결합하고(또한, IL-6R은 IL-6R α 및 CD126로서 언급됨), IL-6/IL-6R 복합체는 복합체를 포함하는 세포에서 신호를 활성화하기 위하여 gp130 (또한 CD130, 온코스테틴 M 수용체(oncostatin M receptor), IL-6R베타, 및 IL-6 신호 변환체(IL-6 signal transducer)로서 언급됨)과 상호작용한다. 트랜스 기전에서, 자유 IL-6은 가용성 IL-6 수용체(sIL-6R)에 결합한다. 그런 다음 IL-6/sIL-6R 복합체는 세포막에 존재하는 gp130에 결합할 수 있다. 이러한 기전 사이의 핵심적 차이는 더 많은 세포 유형이 발현이 더 제한되는, IL-6R을 발현하는 것보다 gp130을 발현하는 것이다. 따라서, IL-6 신호를 억제하는 것이 바람직한 질환에서, 예를 들면, IL-6 신호를 광범위하게 억제하는 것이 바람직한 질환에서, 시스- 및 트랜스-IL-6 신호 모두를 억제하는 것이 유용하다. 본 출원은 조작된 IL-6 길항제, 예를 들면, IL-6에 의해 시스- 및 트랜스-IL-6 신호 모두를 억제할 수 있는 항-IL-6 항체, 단편, 및 유도체를 가진다. 추가적으로, 본 출원은 더 신속한 전신성 제거율을 성취하기 위하여 상기 조작된 IL-6 길항제를 갖는다. IL-6 길항제, 예를 들면, IL-6 항체 및 단편 또는 이의 유도체는, 본 명세서에 참고로서 전문이 삽입된 WO2014/074905에 설명되어 있다. 본 발명은 향상된 IL-6 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0134] 명세서에 사용된 바와 같이, "a", "an" 또는 "the"를 포함하나 이에 한정되지 않는 단수의 용어는 문맥에 달리 명시되지 않는 한 복수를 포함한다.

[0135] IL-6 길항제 (IL-6a)의 특징

[0136] 일반적으로, 본 명세서에 설명된 IL-6 길항제 (IL-6a)는 IL-6의 부위 II (site 2)에 특이적으로 결합하고 IL-6와 관련된 눈 질환 및 특정 다른 질환의 치료에 유용하다. IL-6와 관련된 눈 질환은 질환의 바람직하지 않은 증상 또는 생물학적 활성이 IL-6의 발현 또는 존재와 관련된 것이다. 일부 실시형태에서 IL-6a는 자유(free) 및 결합된 IL-6와 고친화도를 가지고, 유기체에서 상대적으로 안정적이고, IL-6R에 결합된 IL-6(본 명세서에서 IL-6/IL-6R 복합체 또는 IL-6/IL-6R로 명시됨)의 gp130에 결합을 억제할 수 있으며, 치료 효과를 가질 수 있다. 일반적으로, IL-6a는 항체이거나 항체로부터 유래한다. 예를 들면, IL-6a는, IL-6의 부위 II에 특이적으로 결합할 수 있고 시스- 및 트랜스- IL-6 신호 모두를 강력히 차단할 수 있는 높은 친화성의 인간화된 Fab이다. 다른 실시예에서, IL-6a는 전장 항체, 예를 들면, IgG1 또는 IgG2 항체이다.

[0137] 일부 실시형태에서, 또한 Fab는 Fc-조작된 서열로 구성되거나 전장 항체로 있다. 일부 실시형태에서, Fc-조작된 IL-6a (예를 들면, Fc-조작된 Fab)는 적절한 대조군과 비교하여, 예를 들면, 조작된 Fc를 가지지 않는 해당 항체, 단편, 또는 이의 유도체와 비교하여, 더 신속한 전신성 제거율을 가진다. 추가적으로 IL-6a의 상기 및 다른

특징은 본 명세서에서 설명된다.

- [0138] 본 출원은 IL-6가 자유 형태이거나 또는 막(membrane) IL-6R 또는 sIL-6R에 결합 여부에 관계없이, 상기 분자가 IL-6에 gp130의 결합을 억제할 수 있기 때문에 IL-6 신호의 광범위 억제를 제공하기 위하여 IL-6의 부위 II에 상대적으로 결합할 수 있는 디자인된 IL-6 길항제를 가진다. 더욱이, IL-6 수용체와 반대로 리간드(IL-6)를 표적하는 것은 수용체 매개된 제거 및 ADCC (항체-의존적 세포-매개된 세포독성)에 기인한 독성을 회피할 수 있다. IL-6는 질환에서 병리학적 및 방어 역할 모두를 역할하기 때문에, 증가된 IL-6와 관련된 질환을 치료하기 위한 IL-6 길항제 (IL-6a)의 사용은 특정한 측면의 증상을 향상시킬 수 있으나, 또한 현저한 부작용, 예를 들면, 전신성 효과를 일으킬 수 있다. IL-6 경로의 이중성(즉, 바람직하거나 및/또는 바람직하지 않은 효과를 갖는 능력)은 전신성 억제제로 IL-6 관련된 장애를 치료하는 것을 바람직하지 않게 만들 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공된 조성물 및 방법은, 부분적으로 조성물은 국소 운반, 예를 들면, 눈에 국소 운반을 위하여 제조될 수 있기 때문에, 적어도 하나의 IL-6 활성을 억제하나, IL-6의 긍정적 활성화에 과도한 효과를 가지지 않는 치료에 유용할 수 있다. 예를 들면, 특정 측면에서, IL-6a는 특정 부위로 운반하기에 적절한 크기가 되도록 디자인된다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 전장 항체이다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 항체로부터 운반되고 눈의 유리체(vitreous)에 오래 머무르고 전신성 누출(systemic leakage)이 제한적일 수 있는 형식이다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 해당하는 수정되지 않은 항체와 비교하여 눈의 유리체에 더 오래 머무름 및/또는 더 제한적인 전신성 누출을 가지는 수정된(modified) 항체(예를 들면, 수정된 Fc 도메인을 가지는 항체)이다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 IgG2 항체이다.
- [0139] 일부 측면에서, IL-6a는 전장 미만의 항체, 예를 들면, IL-6 항체로부터 유래된 Fab인 항체 단편 또는 항체의 다른 유도체와 같은 상대적으로 작은 IL-6a이다. 일부 경우에서, IL-6a는 해당하는 전장 IL-6 항체와 비교하여 증가된 동력학(kinetics)으로 조직의 일부로부터 다른 부분으로 지나갈 수 있는 형식으로 있다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 거대 분자가 되도록 조작된 Fab이고, 이것은 예를 들면, IL-6a가 Fc 도메인을 통하여 2합체(dimerized)된, Fab 단편과 비교하여 운반된 위치에서 증가된 머무름(residence)을 더 가질 것 같다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 야생형 Fc를 포함하는 똑같은 IL-6 결합 실체와 비교하여 전신성 축적을 감소시킬 수 있는 FcRn 결합을 제거하거나 감소시킨 Fc 절반(moiety)과 같이 조작되었다. 조작된 Fc 도메인은, 예를 들면, IgG1 도메인 또는 IgG2 도메인이다.
- [0140] 일반적으로, 본 명세서에서 설명된 IL-6 길항제는 IL-6의 적어도 하나의 바람직하지 않은 효과를 개선하는데 효과적이기 위하여, 그들의 표적, IL-6에 대해 충분한 높은 친화성을 가지고, 치료제로서 유용하도록 충분히 안정하다.
- [0141] 일반적으로, IL-6a의 PK, 예를 들면, 눈에 사용을 위해 적절한 IL-6a는 치료 효과를 제공하기 위하여, 운반 부위, 유리체(vitreous)에서 충분히 긴 반감기를 가진다. 비제한적 실시예에서, PK는 적어도 8 일, 10 일, 14 일, 21 일, 28 일, 또는 30 일의 반감기를 가질 수 있다.
- [0142] **부위 II에 결합하는 IL-6 길항제의 확인**
- [0143] 일반적으로, 당업계에 알려진 임의의 방법은 IL-6에 결합할 수 있는 분자를 생성하는데, 예를 들면, 폴리펩타이드 라이브러리 또는 분자 라이브러리가 IL-6에 결합하는 폴리펩타이드 또는 화합물의 능력을 위한 분석에서 후보 화합물로 스크린 될 수 있는데 사용될 수 있다. 일단 상기 후보 화합물이 확인되면, 화합물의 결합부위는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 부위 I, 부위 II, 또는 부위 III에서 돌연변이된 IL-6에 결합하는 화합물의 결합 능력과 비교하여 야생형 IL-6에 결합하는 능력을 테스트하는데 사용될 수 있다. 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a는 IL-6/IL-6R α 복합체 및 IL-6에 결합하는 능력을 유지하고, gp130에 IL-6/IL-6R α 의 결합을 방지한다. 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a는 IL-6/IL-6R α 복합체에 결합하기 위해서, 예를 들면, IL-6의 부위 II에 결합함으로써 gp130과 경쟁할 수 있다. 상기 결합 활성은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 분석될 수 있다.
- [0144] IL-6a 후보물질은 예를 들면, HEK-Blue™ IL-6 분석 시스템(InvivoGen, San Diego)을 사용하여 테스트될 수 있다. HEK-Blue™ IL-6 세포는 인간 IL-6R 및 STAT3-유도가능한 SEAP 리포터 유전자로 안정적으로 형질감염된 HEK293 세포이다. IL-6의 존재에서, STAT3는 활성화되고 SEAP는 배출되었다. SEAP은, 예를 들면, QU항-Blue™ (InvivoGen, San Diego)를 사용하여 평가된다. 세포에 대한 IL-6 길항제의 첨가는 배출을 방지하거나 또는 자유 및 IL-6에 결합된 가용성 수용체 모두를 억제하는 결과로서 배출 또는 SEAP의 수준을 감소시킨다.
- [0145] Kp는 특이적 항체-항원 상호작용 또는 항체 단편-항원 상호작용의 결합 친화성 평화 상수(binding affinity

equilibrium constant)를 의미한다. 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 항체 또는 항원 결합 단편은 250 pM보다 미만이거나 동등한, 예를 들면, 225 pM, 220 pM, 210 pM, 205 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, 또는 1 pM보다 미만이거나 동등한 K_D 를 가지는 항원 (예를 들면, IL-6)에 결합한다. K_D 는 당업계에 알려진 방법, 예를 들면 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance), 예를 들면, BiaCore™ 시스템을 사용하여 결정될 수 있다.

[0146] K_{off} 는 특이적 항체-항원 상호작용 또는 항체 단편-항원 복합체의 해리속도상수(dissociation rate constant)를 의미한다. 해리속도상수는 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance), 예를 들면, BiaCore™ 시스템을 사용하여 결정될 수 있다. 상대적으로 느린 K_{off} 는, 예를 들면, 상기 치료의 필요에 있어서 개체에 억제제의 덜 빈번한 투여를 허용하는, 치료제의 바람직한 특성에 기여할 수 있다.

[0147]

[0148] 특이성

[0149] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 IL-6a는 표적, 예를 들면, IL-6에 특이적으로 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 일반적으로, "특이적 결합"은 분자가 선택된 분자에 우선적으로 결합하고 하나 또는 그 이상의 다른 분자에 대하여 매우 낮은 결합 친화성을 전시하는 것을 나타낸다. 실시형태에서, 다른 분자에 대한 결합친화성은 표적을 위한 결합 친화성보다 1, 2, 3 또는 더 낮은 규모이다.

[0150] 진술한 바와 같이, IL-6는 자유 IL-6 및 가용성 IL-6R α 에 결합된 IL-6로서 존재될 수 있다. 본 출원은 IL-6의 부위에 결합하는 억제제와 비교하여 IL-6 길항제에 대한 최적의 표적으로서 IL-6의 부위 II를 확인하였다. 부위 I 억제제는 IL-6R α 에 자유 IL-6의 결합을 억제할 수 있다. 그러나, 상기 억제제는 복합체의 K_{off} 에 의해 제한된 대체를 제외하고 기존의 IL-6/IL-6R 복합체에 의해 개시된 활성을 방지할 수 없다. 다른 대안적인, IL-6R α 에 결합하는 억제제는 포화 농도로 존재하지 않는 한 IL-6 활성을 억제하는 능력이 제한적이기 때문에 덜 적절하다. IL-6 수용체의 양은 IL-6의 양과 비교하여 일반적으로 꽤 높기 때문에, 상기 접근 방법은 수용체에 결합하여 IL-6 활성을 억제하는 조성물의 바람직하지 못한 많은 양의 투여를 요구할 수 있다. 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 IL-6 길항제(예를 들면, 본 명세서에 설명된 항체 및 단편 및 이의 유도체)는 IL-6이 IL-6R에 결합되어 있을 때도 IL-6의 활성을 차단할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 설명된 IL-6a의 장점은 IL-6 수용체를 표적하는 억제제와 비교하여 상대적으로 적은 양의 조성물이 치료 효과를 성취하는데 필요할 수 있다. 항-수용체 항체는 PK를 상당히 제한하는 수용체가 매개된 제거율(receptor mediated clearance)에 의해 신속히 제거되는 것으로 보고되었고, 따라서 더 큰 용량을 필요로 하거나 더 자주 투여하거나 또는 모두를 필요로 한다. 추가적으로, 수용체 및 항-IL-6 항체 모두는 리간드의 정상적인 수용체가 매개된 제거 경로를 파괴시킴으로써 IL-6의 조직 농도를 상당히 증가시킨다는 문제점이 있어서, 개체를 조직에서 잠재적으로 바람직하지 않은 수준의 IL-6로 노출시킨다. 더욱이 IL-6R α 를 표적하는 억제제의 사용은, 억제가 요구되는 부위 및 바람직하지 않은 부위의 모든 근처에 있는 억제제의 존재, 예를 들면, 진신성 치료를 필요로 할 수 있다. gp130이 결합하는 부위인, 부위 II에 결합하는 IL-6a의 사용은 IL-6R에 결합하는 IL-6뿐만 아니라 자유 IL-6를 경유하여 억제를 허용하나, 아직 gp130을 통해 IL-6 경로를 활성화 시키지는 못했다. 따라서, 이론에 구애됨이 없이, 본 명세서에 설명된 IL-6 길항제는 IL-6 (가용성 및 수용체 결합)의 모든 형태, 특히 IL-6 길항제가, 모든 형태에 접근 가능한 IL-6의 부위 II에 결합되도록 디자인된다. 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a를 포함하는 조성물은 IL-6에 의해 모든 시스 및 트랜스 신호를 억제할 수 있다.

[0151] 일부 경우에서 본 명세서에서 제공된 화합물 및 방법은 IL-6 관련된 장애의, 예를 들면, 혈관신생(angiogenesis) 및/또는 염증을 억제하는, 적어도 하나의 징후 또는 증상을 치료하는데 충분한 효과적인 IL-6 차단을 제공하도록 디자인된다.

[0152] 본 명세서에 설명된 화합물은 바람직하지 않은 높은 수준의 IL-6, 예를 들면, 유리체(vitreous)에서, 로 특징된 눈 질환을 치료하는데 유용하다(Yuuki et al., J Diabetes Compl 15:257 (2001); Funatsu et al., Ophthalmology 110: 1690,(2003); Oh et al., Curr Eye Res 35:1116 (2010); Noma et al., Eye 22:42 (2008); Kawashima et al., Jpn J Ophthalmol 51:100 (2007); Kauffman et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:900 (1994); Miao et al., Molec Vis 18:574(2012)을 참조).

[0153] 일반적으로, 본 명세서에 설명된 IL-6a는 IL-6 신호의 강력한 길항제이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 IL-6a는 IL-6에 대해 높은 친화성, 예를 들면, 10 pM의 IL-6을 사용하여 HEK-Blue IL-6 분석에서 100 pM

보다 미만이거나 동등한 IC_{50} 를 가진다. IL-6a의 높은 친화성은 IL-6a의 K_D , 예를 들면, 1 nM보다 미만이거나 동등한, 500 pM보다 미만이거나 동등한, 400 pM보다 미만이거나 동등한, 300 pM보다 미만이거나 동등한, 240 pM보다 미만이거나 동등한, 또는 200 pM보다 미만이거나 동등함에 기초하여 결정될 수 있다.

[0154] 증가된 IL-6 발현 또는 활성화와 관련된 장애를 치료하는데 유용한 생물학적 IL-6a(예를 들면, 항체, 단편, 또는 이의 유도체와 같은 단백질 또는 폴리펩타이드)를 생성하기 위하여, 일반적으로 생물학적 IL-6a는 높은 생산성을 가지는 것이 바람직하다. 예를 들면, 적절한 생산성은 1 g/ℓ 보다 크거나 또는 동등하다(예를 들면, 2 g/ℓ 보다 크거나 동등한, 5 g/ℓ 보다 크거나 동등한, 또는 10 g/ℓ 보다 크거나 또는 동등한).

[0155] IL-6 길항제를 효과적으로 투여하기 위하여, 억제제는 투여될 농도와 양립할 수 있는 용해도를 가지는 것이 필요하다. 예를 들면, 전장 항체 IL-6a의 경우에서, 용해도는 20 mg/ml보다 크거나 또는 동등하고, 10 mg/ml보다 크거나 또는 동등하고, 5 mg/ml보다 크거나 또는 동등하고, 또는 1 mg/ml보다 크거나 또는 동등하다.

[0156] 더욱이, 성공할 수 있는 치료가 되기 위해서, 억제제는 저장 안정성뿐만 아니라 체온의 운반 및 활성 부위에서 높은 안정성을 가져야만 한다. 실시형태에서, 억제제는 60℃보다 크거나 또는 동등한 T_m 을 가진다(예를 들면, 60℃보다 크거나 동등한, 62.5℃보다 크거나 동등한, 65℃보다 크거나 동등한, 70℃보다 크거나 동등한, 73℃보다 크거나 동등한, 또는 75℃보다 크거나 동등한). 실시형태에서, 억제제는 45℃보다 크거나 또는 동등한, 예를 들면, 50℃보다 크거나 또는 동등한, 51℃보다 크거나 또는 동등한, 55℃보다 크거나 또는 동등한, 또는 60℃보다 크거나 또는 동등한 T_{onset} 를 가진다. T_m 및 T_{onset} 를 결정하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0157] 원하는 특징을 가지는 길항제는 당업계에 알려진 적절한 유형의 분자, 예를 들면, 부모 IL-6 항체의 충분한 특징(예를 들면, 원하는 결합 속성)을 일반적으로 유지하거나 또는 보존하는 IL-6 부위 II 표적된 항체의 단편 및 유도체를 포함하는, 항체로부터 선택될 수 있다. 상기 길항제는 Fab 단편, scFvs, Fc 절반(moiety)을 포함하는 조작된 Fab 단편, 및 부모 IL-6 부위 II 표적된 항체로부터 상이한 골격을 가지는 조작된 전장 항체를 포함한다.

[0158] 일부 측면에서, 본 명세서에 개시된 IL-6a는 IL-6의 부위 II에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편과 경쟁 또는 교차-경쟁(cross-compete)할 수 있는 간 항체 항원-결합 부위를 포함한다. 예를 들면, 항체 또는 이의 단편은 본 명세서에 개시된 VH 도메인 및 VL 도메인으로 구성될 수 있고, VH 및 VL 도메인은 본 명세서에 개시된 IL-6/부위 II 결합 항체의 CDRs 세트를 포함한다.

[0159] 임의의 적절한 방법은 IL-6a에 의해, 예를 들면, IL-6 상의 다양한 부위를 돌연변이에 의해 결합된 도메인 및/또는 항원결정인자를 결정하는데 사용될 수 있다. 돌연변이가 IL-6a 및 IL-6 리간드의 결합을 방지 또는 감소시키는 상기 부위는 직접적으로 IL-6a에 결합 또는 간접적으로 결합 부위에 영향, 예를 들면, IL-6의 입체형태에 영향을 줌으로써 포함된다. 다른 방법은 IL-6a에 의해 결합된 아미노산을 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, PEPSCAN-기반 효소면역측정법(PEPSCAN-based enzyme linked immuno assay(ELISA))과 같은, 펩타이드-결합 스캔이 사용될 수 있다. 이러한 유형의 펩타이드-결합 스캔에서, 항원으로부터 유래된 짧은 중첩(overlapping) 펩타이드는 결합 구성요소에 대한 결합이 조직적으로 스크린된다. 펩타이드는 지지체 표면에 공유 결합(covalently coupled)되어 펩타이드 배열을 형성할 수 있다. 펩타이드는 선형 또는 제약된 입체형태일 수 있다. 제약된 입체형태는 각각의 펩타이드 서열의 끝의 말단 시스테인(cys) 잔기를 가지는 펩타이드를 사용하여 생성될 수 있다. 시스테인(cys) 잔기는 펩타이드가 고리형(looped) 입체 형태로 유지되도록 지지체 표면에 직접적으로 또는 간접적으로 공유결합될 수 있다. 따라서, 상기 방법에 사용된 펩타이드는 항원 단편에 해당하는 각각의 펩타이드 서열의 끝에 추가되는 시스테인 잔기를 가질 수 있다. 또한 시스테인 잔기가 펩타이드 서열의 중간에 또는 중간 근처에 추가적으로 위치된, 이중 고리형 펩타이드가 사용될 수 있다. 펩타이드가 중심 시스테인 잔기의 각각의 측면 상의 하나의 고리(loop)를 가진, 이중-고리(looped) 입체형태를 형성하는 것과 같이 시스테인 잔기는 지지체 표면에 직접적 또는 간접적으로 공유결합될 수 있다. 펩타이드는 합성적으로 생성되고, 따라서 시스테인 잔기는 IL-6 부위 II 서열에 자연적으로 발생하지 않음에도 불구하고, 원하는 위치에 조작될 수 있다. 선택적으로, 선형 및 제약된 펩타이드는 펩타이드-결합 분석에서 모두 스크린 될 수 있다. 펩타이드-결합 스캔은 결합 구성요소가 결합하는 펩타이드 세트를 식별하는 것(예를 들면, ELISA를 사용하여)을 포함할 수 있고, 상기 펩타이드는 IL-6a의 단편(예를 들면, IL-6a의 약 5, 10, 또는 15개의 연속적 잔기를 포함하는 펩타이드)에 해당하는 아미노산 서열, 및 공간(footprint)이 중첩(overlapping) 펩타이드에 대해 공통적 잔기를 포함하는 경우에, 결합 구성요소에 의해 결합된 잔기의 공간(footprint)을 결정하기 위하여 펩타이드를 정렬하는 것을 가진다. 대안적으로 또는 추가적으로 펩타이드-결합 스캔 방법은 IL-6a가 적어도 선택되는 신호:노이즈 비율

(signal:noise ratio)로 결합되는 펩타이드를 식별하는데 사용될 수 있다.

- [0160] 당업계에 알려진 다른 방법은 예를 들면, 부위 지정 유도 돌연변이(site-directed mutagenesis)(예를 들면, 본 명세서에 설명된 바와 같이), 수소 중수소 교환(hydrogen deuterium exchange), 질량분광계(mass spectrometry), NMR, 및 X-선 결정학(X-ray crystallography)을 포함하는, 항체에 의해 결합된 잔기를 결정하는데, 및/또는 펩타이드-결합 스캔 결과를 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0161] 일반적으로, 본 명세서에 설명된 바와 같이 유용한 IL-6a는 인간 항체 분자, 인간화된 항체 분자, 또는 결합 이의 단편이다. 일반적으로, 항체는 단클론 항체이다. 상기 항체의 기원은 인간, 마우스(murine), 래트, 낙타(cameland), 래빗, 양(ovine), 돼지(porcine), 또는 소(bovine) 일 수 있고 당업자에 알려진 방법에 따라 생성될 수 있다.
- [0162] 일반적으로, IL-6a는 IL-6 (예를 들면, 인간 IL-6), 예를 들면, IL-6의 부위 II에 특이적 결합할 수 있는 적어도 항체의 CDRs를 포함한다. 본 발명의 CDR 또는 CDRs 세트를 운반하기 위한 구조는 CDR 또는 CDRs 세트가 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 자연적으로 발생한 VH 및 VL 항체 가변 도메인의 CDR 또는 CDRs 세트에 해당하는 위치에 위치된 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 이의 실질적 부분일 수 있다. 상기 면역글로불린 가변 도메인의 구조 및 위치는 문헌 Kabat, et al., 1983(National Institutes of Health)에 의해 결정될 수 있고, 인터넷 검색 엔진을 사용하여 "카바트(Kabat)"에서 찾을 수 있다.
- [0163] 본 명세서에서 개시된 바와 같이, IL-6a는 항체 VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 일반적으로 포함하는 일반적 항체이다. VH 도메인은 중쇄 CDRs의 세트(VHCDRs)를 포함하고, VL 도메인은 경쇄 CDRs의 세트(VLCDRs)를 포함한다. 상기 CDRs의 예는 본 명세서의 실시예에서 제공한다. 항체 분자는 VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3 및 골격을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함할 수 있다. 항체 분자는 대안적으로 또는 또한 VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3 및 골격을 포함하는 항체 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0164] 본 명세서는 본 명세서에 개시된 것과 같은 VHCDR1 및/또는 VHCDR2 및/또는 VHCDR3 및/또는 본 명세서에 개시된 것과 같은 VLCDR1 및/또는 VLCDR2 및/또는 VLCDR3을 포함하는 IL-6 길항제를 개시한다. IL-6a는 본 명세서에 설명된 임의의 항체, 단편 또는 유도체의 하나 또는 그 이상의 CDRs를 포함할 수 있다.
- [0165] IL-6a는 VHCDRs 세트(예를 들면, VHCDR1, VHCDR2, 및 VHCDR3)를 포함할 수 있고, 선택적으로 또한 VLCDRs (예를 들면, VLCDR1, VLCDR2, 및 VLCDR3)를 포함할 수 있다. CDRs는 본 명세서에 설명된 하나 또는 그 이상의 항체, 단편, 또는 유도체로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, VLCDRs는 VHCDRs와 같이 똑같은 상이한 항체로부터 유래될 수 있다.
- [0166] 일반적으로, 항체 항원-결합 부위를 제공하기 위하여 VL 도메인과 쌍을 이룰 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1 또는 서열번호 3의 HC 도메인은 서열번호 2의 LC 도메인과 쌍을 이룬다. 일부 경우에서, VH 또는 VL 도메인 단독은 IL-6a로서 사용될 수 있다.
- [0167] 일부 측면에서, IL-6a는 (i) 본 명세서에 설명된 VH 도메인과 적어도 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 아미노산 서열 일치성을 가지는 VH 도메인 서열(예를 들면, 서열번호 37), 또는 (ii) VH 도메인 서열로부터 VHCDRs 세트(예를 들면, VHCDR1, VHCDR2, 및/또는 VHCDR3)를 포함하는 항체 분자, 단편, 또는 이의 유도체이다. 실시형태에서, 항체 분자, 단편, 또는 이의 유도체는 서열번호 37의 VHCDR1, VHCDR2, 및 VHCDR3을 포함한다. 실시형태에서, 항체 분자, 단편, 또는 이의 유도체는 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산에 의해 서열번호 37의 HCDR1, VHCDR2, 및 VHCDR3로부터 총괄적으로 상이한 VHCDR1, VHCDR2, 및 VHCDR3을 포함한다.
- [0168] 또한 항체 분자, 단편, 또는 이의 유도체는 (i) 본 명세서에 설명된 VL 도메인, 예를 들면, 서열번호 38의 VL 도메인을 갖는 적어도 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 아미노산 서열 일치성을 가지는 VL 도메인 서열, 또는 (ii) VL 도메인으로부터 세트 VLCDRs (예를 들면, VLCDR1, VLCDR2, 및/또는 VLCDR3)을 선택적으로 포함할 수 있다. 실시형태에서, 항체 분자, 단편 또는 이의 유도체는 서열번호 38의 VLCDR1, VLCDR2, 및 VLCDR3를 포함한다. 실시형태에서, 항체 분자, 단편, 또는 유도체는 1개 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 아미노산에 의해 서열번호 38의 VLCDR1, VLCDR2, 및 VLCDR3로부터 총괄적으로 상이한 VLCDR1, VLCDR2, 및 VLCDR3을 포함한다. 2개의 아미노산 서열의 퍼센트 일치성을 계산하도록 사용될 수 있는 알고리즘은 예를 들면, 기본 파라미터를 사용하여, 예를 들면, BLAST, FASTA, 또는 스미스-워터맨(the Smith-Waterman) 알고리즘을 포함한다.
- [0169] 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a는 항체 불변 부위 또는 이의 부분, 예를 들면, 인간 항체 불변 부위 또는

이의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면, VL 도메인은 인간 CK 또는 CL 사슬을 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인 끝의 C-말단에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인에 기초한 IL-6a는 항체 동형(isotype), 예를 들면, IgG, IgA, IgE 및 IgM 및 임의의 동형(isotype) 하위부류, 특히 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 유래된 면역글로불린 중쇄의 모든 또는 부분(예를 들면, CH1 도메인)에 C-말단 끝에 부착될 수 있다. 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 ADCC 활성을 감소 또는 제거하기 위하여 조작된다.

[0170] 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG2 항체이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 본 명세서에 설명된 바와 같이 IgG2 골격, IgG2 불변 부위, 또는 IgG2 Fc 영역을 포함한다.

[0171] IgG2 항체는 3개의 주요 구조적 아형(isoforms)으로 존재할 수 있다: IgG2-A, IgG2-B, 및 IgG2-A/B (Wypych J. et al. Journal of Biological Chemistry. 2008, 283:16194-16205). 상기 구조 이질성(heterogeneity)은 Fab 암(arms)을 중쇄 힌지(hinge) 영역에 연결하는 이황화 결합의 상이한 윤곽(configurations)에 기인한다. IgG2-A 아형에서는, Fab 암을 힌지 영역에 연결하는 이황화 결합이 없다. IgG2-B 아형에서, 모든 Fab 암은 힌지 영역에 중쇄 및 경쇄를 연결하는 이황화 결합(disulfide bond)을 갖는다. IgG2-A/B 아형은, 하나의 Fab 암의 중쇄 및 경쇄를 힌지 영역에 연결하는 이황화 결합을 갖는 단지 하나의 Fab 암을 가지는, IgG2-A와 IgG2-B 아형(isoforms) 사이의 혼성체(hybrid)이다. 또한 이황화 셔플링(disulfide shuffling)으로 불리는, 2개의 또는 모든 다른 구조적 아형(isoforms) 사이의 IgG2 항체의 전환은, 자연적으로-발생 및 제조항 항체 모두에 대하여 생체 내 및 시험관 내에서 자연적으로 발생한다. 결과적으로, 당업계의 IgG2 항체의 제제는 IgG2-A, IgG2-B, 및 IgG2-A/B 아형(isoforms)의 이질적 혼합물을 포함할 수 있다. 상이한 IgG2 아형은, 안정성의 상이성(differences in stability), 응집(aggregation), 점성(viscosity), Fc 수용체 결합, 또는 효력과 같은, 고유하고 상이한 구조적 성질을 가질 수 있다. IgG2 항체 제제에서 다수의 아형 또는 증가된 수준의 특이적 아형의 존재는 안정성, 응집, 또는 효력을 부정적으로 영향을 줄 수 있다.

[0172] 본 발명은 IgG2-A 또는 IgG2-A/B 아형에 존재하는 주요 장점을 가진 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 실질적 시간 동안 IgG2-B 아형으로 존재하지 않거나, 또는 IgG2-B 아형으로 존재하지 않는다. 따라서, 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 및 제제는 당업계에 알려진 다른 IgG2 항체보다 덜 이질적이므로, 치료 적용에 사용하기 위해 더 바람직하다.

[0173] 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 주로 항체의 IgG2-A 및/또는 IgG2-A/B 아형을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 항체를 포함하는 조성물은 항체의 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99%의 IgG2-A 또는 IgG2-A/B 아형을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 항체는 총괄적으로 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99%의 IgG2-A 및 IgG2-A/B 아형을 포함한다. 상기 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 항체르 포함하는 조성물은 항체의 실질적 양의 IgG2-B 아형을 포함하지 않는다. 예를 들면, 조성물은 항체의 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.1% 미만의 IgG2-B 아형을 포함한다.

[0174] 일부 경우에서, 본 발명의 항체는 특이적 동종이형(allotype), 예를 들면, 특정 지리학적 기원(particular geographic origin)을 가지는 집단에서 우세한(predominate) 동종이형(allotype)을 갖는 서열을 창조하는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 추가적으로 수정된다. 일부 경우에서, 인간 중쇄 불변 부위는 상기 목적을 위하여 수정된다.

[0175] IL-6a는 항체 골격 내에서, 하나 또는 그 이상의 CDRs, 예를 들면, CDRs 세트를 가지는, 항체 분자, 이의 결합 단편, 또는 변이체(variant)일 수 있다. 예를 들면, 항체의 하나 또는 그 이상의 CDRs 또는 CDRs 세트(예를 들면, 본 명세서에 설명된 것과 같은 항체 또는 단편 또는 이의 유도체)는 항체 분자를 제공하기 위하여 골격 (예를 들면, 인간 골격)으로 이식될 수 있다. 골격 영역은 인간 생식계통 유전자(germline gene) 서열로부터 유래될 수 있거나, 또는 기원에서 비생식계통(non-germline)일 수 있다.

[0176] VH 및/또는 VL 골격 잔기는 본 명세서에서 논의되고 예로 든 바와 같이, 예를 들면, 부위 지정 유도 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 사용하여 수정될 수 있다.

[0177] 아미노산 변경은 당업계에 알려진 방법 및 파라미터를 사용하여 IL-6의 부위 II(본 명세서에서 “참고 IL-6 항체”로 지칭됨)에 표적된 항체 IL-6로부터 유래된 하나 또는 그 이상의 골격 영역 및/또는 하나 또는 그 이상의 CDRs에서 만들어 질 수 있다. 또한 본 명세서는 참고 IL-6 항체와 비교하여 IL-6의 부위 II(예를 들면, 인간 IL-6의 부위 II)에 결합을 유지하고 일반적으로 적어도 같은 결합 또는 증가된 친화성을 갖는 결과물인 IL-6 길항제를 포함한다. 일부 경우에서, 안정성과 같은 파라미터를 향상시키기 위하여, 참고 IL-6a (예를 들면, 참고 항체)와 비교하여 유래된 IL-6a의 결합 친화성의 감소를 야기하는 변경은 유용한 IL-6a를 만들기 위해 도입될

수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들면, 참고가 FcRn 결합 또는 유리체(vitreous)에서 반감기 또는 전신성 반감기 (예를 들면, 혈액, 혈장(plasma), 혈청(serum), 림프(lymph), 간(liver), 신장(kidney), 다른 조직, 또는 체액에서)와 같은 약동학적 파라미터(pharmacokinetic (PK) parameter)에 관련되는 일부 경우에서, 참고 항체(reference antibody)는 IL-6에 특이적으로 결합하지 않는 항체일 수 있다.

[0178] IL-6a 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 변경은 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 비-자연적으로 발생하거나 비-표준화된 아미노산으로 치환하는 것, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 비-자연적으로 발생하거나 비-표준화된 형태로 변형(modifying)시키는 것, 또는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 발생하거나 비-표준화된 아미노산을 서열로 삽입하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 서열에서 변경(alterations)의 숫자 및 위치의 예는 본 명세서의 어느 곳이라도 설명되어 있다. 자연적으로 발생한 아미노산은 표준 단일 문자 코드에 의해 A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E로서 확인된 20개의 "표준" L-아미노산을 포함한다. 비-표준화된 아미노산은 폴리펩타이드 백본으로 삽입될 수 있거나 존재하는 아미노산 잔기의 수정(modification) 결과인 임의의 다른 잔기를 포함한다. 비-표준화된 아미노산은 자연적으로 발생하거나 비자연적으로 발생할 수 있다. 몇 개의 자연적으로 발생한 비-표준화된 아미노산은 4-하이드록시프로린(4-hydroxyproline), 5-하이드록시리신(5-hydroxylysine), 3-메틸히스티딘(3-methylhistidine), 및 N-아세틸세린(N-acetylserine)과 같이, 당업계에게 알려져 있다. 이들의 N-알파 위치에서 유도체화되는 상기 아미노산 잔기는 단지 아미노산 서열의 N-말단에 위치한다. 아미노산은 일반적으로 L-아미노산이다. 일부 경우에서 아미노산은 D-아미노산이다. 따라서 변경은 L-아미노산을 D-아미노산으로 변경, 또는 D-아미노산으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 메틸화된(Methylated), 아세틸화된(acetylated) 및/또는 인산화된 형태의 아미노산은 잘 알려져 있고, 본 발명의 아미노산은 상기 수정(modification)의 영향을 받는 대상이 될 수 있다.

[0179] 본 발명의 항체 도메인 및 결합 구성요소에서 아미노산 서열은 본 명세서에서 논의된 바와 같이 비-자연적 또는 비-표준화된 아미노산을 포함할 수 있다. 비-표준화된 아미노산 (예를 들면, D-아미노산)은 당업계에게 알려진 방법, 예를 들면, 분자 합성으로 또는 아미노산의 후-합성 수정(post-synthesis 수정(modification)) 또는 대체를 사용하여 아미노산 서열로 삽입될 수 있다. 일부 경우에서, D-아미노산은 IL-6a의 PK를 증가시키는데 사용된다.

[0180] 본 발명의 CDR-유래된 서열을 가지는 신규한 VH 또는 VL 영역은 전체 가변 도메인 내에서 돌연변이를 생성하기 위하여 하나 또는 그 이상의 선택된 VH 및/또는 VL 핵산 서열의 무작위 돌연변이 유발을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들면, 오류가 잦은(error-prone) PCR이 사용될 수 있다(Chao et al., Nature Protocols, 1:755-768 (2006)). 일부 실시형태에서 하나 또는 2개의 아미노산 치환은 전체 가변 도메인 또는 CDRs 세트 내에서 만들어진다. 당업계에게 알려진 다른 방법은 일반적으로 하나 또는 그 이상의 CDRs에서 돌연변이를, 예를 들면, 부위 지정 유도 돌연변이를 생성하기 위하여 사용될 수 있다.

[0181] 항체 IL-6a를 생성하는 하나의 방법은, 하나 또는 그 이상의 아미노산을 추가(adding), 삭제(deleting), 치환(substituting) 또는 삽입(inserting)하여 본 명세서에 개시된 바와 같이 VH 도메인을 변경하는 것이다. 변경된 VH 도메인은 VL 도메인(예를 들면, 본 명세서에서 개시된 VL 도메인)과 결합될 수 있고, 이것은 당업계에게 알려진 방법을 사용하여 본 명세서에서 설명된 바와 같이 변경될 수 있다. 상기 변경된 분자는 참고 분자와 비교하여 IL-6의 부위 II에 결합 능력 및 증가된 친화성과 같은 다른 원하는 성질에 대하여 선택적으로 테스트 받을 수 있다. 일부 경우에서, 변이체(variant) VH 또는 VL 도메인은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 상기 변경(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환)을 가질 수 있다.

[0182] 실시형태에서, 본 발명의 IL-6a는 IL-6의 부위에 결합하는 항체 단편이고, 예를 들면, IL-6의 부위 II에 결합할 수 있는 항원 결합 부위를 포함한다. 본 발명의 항체 단편은 일반적으로 서열번호 41 및 서열번호 42를 포함하는 항체 분자와 같은, 참고 (부모) 항체 분자로 시작하여 얻어진다. 항체 단편은 재조합 DNA, 효소 절단(enzymatic cleavage) (예를 들면, 펩신(pepsin) 또는 파페인(papain)을 사용하여), 항체의 화학적 절단 (예를 들면, 이황화 브릿지(disulfide bridge)의 화학적 감소)와 같은 당업계에게 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 항체 항원-결합 부위를 포함하는 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd, 및 이황화 안정된(disulfide stabilized) 가변영역(dsFv)과 같은 분자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나 또는 그 이상의 항체 항원-결합 부위, 예를 들면, F(ab')₂, F(ab)₃, 이중체(diabodies), 삼중체(triabodies), 사중체(tetrabodies), 및 미니바디(minibodies)를 포함하는 다양한 다른 항체 분자는 조작될 수 있다. 이들의 구성 및 사용을 위한 항체 분자 및 방법의 예는 Holliger 및 Hudson, 2005, Nat Biotechnol 23:1126-1136에 설명되어 있다. 결합 단편의 비제한적 예는 VL, VH, 불변경쇄 도메인 (CL) 및 불변중쇄 도메인 1 (CH1) 도메인으로 구성된 Fab 단편; VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; VH 또

는 VL 도메인으로 구성된 dAb 단편; 분리된 CDR 영역; F(ab')₂ 단편, 2개가 연결된 Fab 단편을 포함하는 이가(bivalent) 단편; 항원 결합 부위를 형성하기 위하여 연결된 2개의 도메인을 허용하는 펩타이드 링커로 연결된 VH 도메인 및 VL 도메인이 있는, 단일 사슬 Fv 분자(scFv); 양특이성 단일 사슬 Fv 이량체(dimer) (예를 들면, WO 1993/011161에서 개시된 바와 같이) 및 유전자 융합(예를 들면, WO94/13804에서 개시된 바와 같이)을 사용하여 제조된 다가(multivalent) 또는 다가특이성(multispecific) 단편인, 이중체(diabody)이다. Fv, scFv, 또는 이중체 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 이황화 브릿지의 삽입에 의해 안정될 수 있다. 또한 CH3 도메인에 접합된(joined) scFv를 포함하는 미니바디(Minibodies)는 IL-6a로서 사용될 수 있다. IL-6a로서 사용될 수 있는 항체의 다른 단편 및 유도체는 Fab'를 포함하는데, 이것은 항체 힌지 영역, 및 자유 티올기(thiol group)를 가지는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 있는 Fab' 단편인, Fab'-SH로부터 하나 또는 그 이상의 시스테인을 포함하는, 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단의 몇개의 아미노산 잔기의 첨가에 의한 Fab 단편과는 상이하다.

[0183] 일부 경우에서, 항체 단편인 IL-6a는 원하는 성질, 예를 들면, 반감기 또는 삽입을 위한 PEG화(PEGylation)를 향상 또는 도입하기 위하여 화학적으로 수정되었다.

[0184] dAb (도메인 항체)는 항체(항체 중쇄 또는 경쇄의 가변영역)의 작은 단량체(monomeric) 항원-결합 단편이다. VH dAbs는 낙타과(camelids) (예를 들면, 낙타 및 라마)에서 자연적으로 발생하고, 낙타를 표적 항원으로 면역력을 갖게하고, 항원-특이적 B 세포를 분리하여 각각의 B 세포로부터 직접적으로 dAb 유전자를 클로닝하여 생성될 수 있다. 본 발명의 IL-6a는 본 명세서에서 출발한 것과 같이 실질적으로 VH 또는 VL 도메인을 포함하거나, 또는 출발한 것과 같이 실질적으로 CDRs 세트를 포함하는 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 dAb일 수 있다.

[0185] 본 발명의 항체는 2개의 상이한 가변영역이 같은 분자에 결합된 양특이성 항체를 포함한다. IL-6a는 당업계에서 알려진 방법을 사용하여, 예를 들면, 화학적으로 또는 혼성체(hybrid) 하이브리도마로부터 제조된 양특이성 항체의 부분으로서 삽입될 수 있다. 상기 분자는 상기에 논의된 유형의 양특이성 항체 단편일 수 있다. 양특이성 항체를 생성하기 위한 방법의 하나의 비제한적인 예는 상이한 특이성을 가진 2개의 항체의 결합 도메인이 사용되고 짧은 유연한 펩타이드를 경유하여 직접적으로 연결된 BiTE™ 기술이다. 이것은 짧은 단일 폴리펩타이드 사슬 상에 2개의 항체를 연결시킨다. 이중체(diabodies) 및 scFv는, 항-유전자형 반응(anti-idiotypic reaction)의 효과를 잠재적으로 감소시키는, 단지 가변 도메인을 사용하여, Fc 영역없이 제조될 수 있다. 양특이성 항체는 전체 IgG, 양특이성 Fab'2로서, Fab'PEG로서, 이중체(diabodies)로서 또는 그 밖에 양특이성 scFv로서 제조될 수 있다. 추가적으로, 2개의 양특이성 항체는 4가(tetravalent) 항체를 형성하기 위하여 당업계에 알려진 통상적 방법을 사용하여 연결될 수 있다.

[0186] 양특이성 전체 항체와 반대로, 양특이성 이중체(diabodies)는, E. coli에서 제조될 수 있고 발현될 수 있기 때문에 부분적으로, 유용하다. 적절한 결합 특이성의 이중체(diabodies)(및 항체 단편과 같은, 많은 다른 폴리펩타이드)는 라이브러리로부터 파지 디스플레이(phage display) (WO 1994/13804)를 사용하여 신속히 선별될 수 있다. 만약 이중체의 하나의 암(arm)이, 예를 들면, IL-6의 부위 II에 대한 직접적 특이성을 가진, 불변을 유지한다면, 다른 암이 다양화되고 항체의 적절한 특이성이 선별된 경우에 라이브러리가 만들어질 수 있다.

[0187] 양특이성 전체 항체는 WO 1996/27011, WO 1998/50431 및 WO 2006/028936에서 설명된 바와 같이 대안적 조합 방법으로 만들어질 수 있다.

[0188] 일부 경우에서, 하기에 추가적으로 논의된 바와 같이, 본 발명의 IL-6a는, 비-항체 단백질 스캐폴드에서, 하나 또는 그 이상의 CDRs, 예를 들면, CDRs 세트를 삽입하여, 비-항체 분자 내의 항원-결합 부위를 포함한다. 일부 경우에서, CDRs는 비-항체 스캐폴드로 삽입된다. IL-6 부위 II 결합 부위는 파이브로넥틴(fibronectin) 또는 사이토크롬 B(cytochrome B)와 같은 비-항체 단백질 스캐폴드 상의 CDRs의 재배열에 의해, 또는 IL-6 부위 II에 대하여 결합 특이성을 주기 위하여 단백질 스캐폴드 내의 고리(loop)의 아미노산 잔기를 무작위화(randomizing)하거나 또는 돌연변이시켜 제공될 수 있다. 단백질의 신규한 결합 부위를 조작하기 위한 스캐폴드는 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 항체 흉내를 위한 단백질 스캐폴드는 적어도 하나의 무작위 고리를 가진 파이브로넥틴 유형 III 도메인을 포함하는 단백질(항체 흉내)을 설명하는, WO200034784에 개시된다. 하나 또는 그 이상의 CDRs, 예를 들면, 세트 HCDRs,로 이식하는 적절한 스캐폴드는 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리(superfamily)의 임의의 도메인 구성요소에 의해 제공될 수 있다. 스캐폴드는 인간 또는 비-인간 단백질일 수 있다. 비-항체 단백질 스캐폴드의 장점은 적어도 일부 항체 분자보다 제조하는데 적거나 및/또는 쉬운 스캐폴드 분자에서 항원-결합 부위를 제공할 수 있다는 것이다. 결합 구성요소의 작은 크기는, 예를 들면 세포로 들어가는 능력, 조직으로 깊게 침투하거나 또는 다른 조직 내의 표적에 도달하는 것, 또는 표적 항원의 단백질 공간 내에서 결합하는 것과 같은, 유용한 생리학적 성질을 줄 수 있다. 표적 항원을 결합하는 항원-결합 부위를 만들기 위해 고리 또

는 고리들의 아미노산 서열이 특이적으로 또는 무작위로 돌연변이된, 하나 또는 그 이상의 가변 고리(loops) 및 안정된 백본을 가지는 단백질이 일반적이다. 상기 단백질은 감마-크리스탈라인(gamma-crystalline) 및 다른 아플린™ 스캐폴드(Affilin™ scaffolds) (Sci1 단백질, Halle, Germany)뿐만 아니라 S. 아우레스(S. aureus), 트랜스페린(transferrin), 테트라넥틴(tetranectin), 파이브로넥틴(fibronectin) (예를 들면, 10번째 파이브로넥틴 유형 III 도메인을 사용하여), 리포칼린(lipocalins)로부터 단백질 A의 IgG-결합 도메인을 포함한다. 다른 접근방법의 예는 내부-분자(intra-molecular) 이황화 결합, 미세단백질(microproteins) (예를 들면, Versabodies™, Amunix Inc., Mountain View, CA) 및 안키린 반복(ankyrin repeat) 단백질 (DARPs, 예를 들면, Molecular Partners AG로부터, Zurich-Schlieren, Switzerland)을 가지는 사이클로타이드-작은(cyclotides--small) 단백질에 기초한 합성 마이크로바디(microbodies)를 포함한다. 또한 상기 단백질은 작고, 조작된 단백질 도메인, 예를 들면, 면역-도메인(immuno-domains)을 포함한다(예를 들면, 미국특허공개번호 2003/082630 및 2003/157561를 참조). 면역-도메인은 항체의 적어도 하나의 상보적 결합부위(one complementarity determining region (CDR))을 포함한다.

[0189] IL-6a는, 예를 들면, 항원에 결합하는 능력 이외에 추가로 다른 기능적 특성을 분자에 부여하기 위해, 추가 아미노산을 포함할 수 있다.

[0190] 일부 경우에서, IL-6a는 검출할 수 있는 표지를 운반하거나, 또는 독성 또는 표적 절반(moiety) 또는 효소(예를 들면, 펩티딜 결합(peptidyl bond) 또는 링커(linker)를 경유하여)에 결합(conjugated)된다. 예를 들면, IL-6a는 항원 결합 부위 (예를 들면, IL-6 부위 II에 대한 결합 부위)뿐만 아니라 촉매(catalytic) 부위(예를 들면, 효소 도메인에서), 예를 들면, 항원 결합 부위가 항원에 결합하고 따라서 촉매 부위를 IL-6 또는 IL-6/IL-6R 복합체로 표적하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 추가적으로 촉매 부위는, 예를 들면, IL-6, IL-6R, 또는 IL-6a/IL-6 복합체와 관련된 다른 분자의 절단에 의해, IL-6의 생물학적 기능을 억제할 수 있다.

[0191] 일부 측면에서, 본 발명은 IL-6a의 생물학적 기능을 변경시키는, 예를 들면, 증가, 감소, 또는 제거함으로써, 참고 항체와 비교하여 수정된 항체 IL-6a를 포함한다. 일 실시예에서, Fc 영역은 수정되거나 또는 부모 Fc 도메인은 수정되지 않은 부모와 비교하여 수정된 IL-6a의 약동학을 변경시키기 위해 수정된 Fc 도메인으로 대체된다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 IgG2 골격을 가지도록 조작된다. 다른 실시형태에서, IL-6a는 IgG1 또는 IgG2 골격에 있고, 부모 또는 다른 참고 IL-6a와 비교하여 pH 6.0에서 IL-6a의 결합 친화성을 증가시키는 수정된 Fc를 가지며 pH 7.0에서 결합 친화성을 실질적 변경시키지 않는 수정된 Fc를 가진다. 실시형태에서, Fc 도메인은 수정되었고 IL-6a는 부모 또는 다른 참고 IL-6a와 비교하여 감소된 전신성 축적, 감소된 반감기, 및/또는 증가된 전신성 제거율을 가진다. 일부 실시형태에서, 항체 IL-6a는 보체결합(complement fixation) 및 보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity)을 증가시키기 위해 수정된다. 다른 측면에서, 항체 IL-6a는 참고 항체와 비교하여 작동세포(effector cell)를 활성화시키고 항체-의존적 세포독성(ADCC)에 참여하는 항체 능력을 증가시키기 위해 수정된다. 일부 경우에서, 본 명세서에 개시된 항체는 작동세포(effector cell)의 활성화 및 항체-의존적 세포독성 (ADCC)에 참여하는 이들의 능력을 증강시키고 보체의 결합 및 보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity (CDC))에 참여하는 능력을 모두 증강시키기 위해 수정될 수 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체는 보체의 결합(fix complement) 및 보체-의존적 세포독성에 이들의 능력을 감소시키도록 수정된다. 다른 실시형태에서, 항체는 작동세포(effector cell)를 활성화시키고 항체-의존적 세포독성(ADCC)에 참여하는 능력을 감소시키도록 수정된다. 더욱 다른 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체는 작동세포(effector cell)를 활성화시키고 항체-의존적 세포독성(ADCC)에 참여하는 능력을 감소시키고 보체의 결합(fix complement) 및 보체-의존적 세포독성(CDC)에 참여하는 능력을 모두 감소시키기 위해 수정될 수 있다.

[0193] 이것은 눈에 주입될 때, IL-6a의 용량의 빈번한 운반을 회피하기 위한 일반적으로 장점이다. 특정 실시형태에서, 상기 특징을 용이하게 하기 위하여, 본 명세서에 개시된 바와 같이 운반 부위, 예를 들면, 유리체(vitreous)에서 IL-6a의 반감기는 적어도 4일, 예를 들면, 적어도 7일, 적어도 9일, 적어도 11 일, 또는 적어도 14 일이다. 특정 실시형태에서, IL-6a의 평균 반감기는 적어도 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 25일, 30일, 40일, 50일, 또는 60일이다. 항체의 반감기를 증가시키는 방법은, 예를 들면, 미국특허번호. 6,277,375 및 국제공개번호 WO 1998/23289 및 WO 1997/3461에 설명되는 바와 같이, 당업계에 알려져 있다. 일부 실시형태에서, IL-6a의 반감기는 전신성 반감기, 예를 들면, 혈액, 혈청, 혈장, 림프, 간, 신장, 또는 다른 조직 또는 체액에서의 반감기보다 표적 운반 부위, 예를 들면, 유리체(vitreous)에서 더 길다(greater).

- [0194] 다른 실시형태에서, 본 발명은 용기(container)를 포함하는 제조 물품을 제공한다. 용기(container)는 본 명세서에 개시된 IL-6a를 포함하는 조성물, 및 조성물이 IL-6 관련 장애를 치료하는데 사용될 수 있는 것을 나타내는 포장 삽입물(package insert) 또는 표지(label)를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있는 IL-6a이다.
- [0195] 일부 경우에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 IL-6a를 포함하는 조성물, 및 치료를 필요로 하는 개체에게 조성물을 투여하는 지침서를 포함한다.
- [0196] 운반 부위 또는 근처에서 IL-6a의 유지성을 증가시키기 위해, 큰 IL-6a가 바람직한 실시형태에서, IL-6a의 기능을 현저히 부정적 영향(예를 들면, IL-6 또는 IL-6/IL-6R 복합체에 대한 IL-6의 결합 친화성)을 주지 않으나 크기를 증가시키는 절반(moiety)은 IL-6a와 관련될 수 있다. 예를 들면, Fab는 Fab 및 Fc 절반(moiety)을 포함하는 단일 폴리펩타이드로서 발현되도록 유전적으로 조작될 수 있다.
- [0197] IL-6a에 대해 상대적으로 작은 크기가 바람직한 실시형태에서, IL-6 항체의 단편은 예를 들면, scFv 또는 Fab 단편이 사용될 수 있다. IgG 항체는 크기에서 약 150 kD이고, Fab는 약 50 kD이고 scFv는 약 25 kD이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 바와 같은 IL-6a는 크기에서 약 50 kD 미만이다. 상기 길항제는, 예를 들면, 50kD보다 미만이거나 동등하고 10 kD 이상(greater than), 50 kD보다 미만이거나 동등하고 20 kD 이상, 또는 50 kD보다 미만이거나 동등하고 25 kD보다 크거나 또는 동등할 수 있다.
- [0198] 일부 경우에서, IL-6 길항제의 안정성, 예를 들면, 이황화(disulfides)를 가지는 항체 또는 다른 억제제는, 하나 또는 그 이상의 이황화 브릿지가 부모 분자보다 더 안정적인 변이체(variant)를 만듦으로써 향상된다.
- [0199] 본 명세서에 설명된 특정 IL-6a 분자의 다른 장점은 운반 모드에 대한 적절한 크기, 운반 부위, 또는 활성 모드를 가지는 효과적 분자의 활용성일 수 있다. 예를 들면, Fab 포맷에서 IL-6a는 국소 적용에 사용될 수 있다. 상기 분자의 조작 방법은 본 명세서에 설명되고 당업계에 알려져 있다.
- [0200] **표시/IL-6 관련된 질환**
- [0201] 본 발명의 IL-6a로 처리될 수 있는 질환은 상승된 IL-6가 질환 상태 또는 질환 상태에 대한 전제조건과 관련된 질환을 포함한다. 상기 질환은 질환 병리학에 기여한 IL-6에 의해 조절되는 혈관신생(angiogenesis) 및 염증 질환을 포함한다. 이는 정상 수준과 비교하여, IL-6가 상승되어 있는, 예를 들면, IL-6가 유리체에서(예를 들면, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 및 포도막염(uveitis)과 같은) 또는 눈의 조직에서 상승된 질환을 포함한다. 예는, 제한 없이, 건성안(dry eye) (예를 들면, 건성안(dry eye) 질환 또는 건성안 증후군(dry eye syndrome), 알레르기결막염(allergic conjunctivitis), 포도막염(uveitis), 연령과 관련된 황반 퇴화(age-related macular degeneration)(AMD), 증식성 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)(PDR), 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)(DME), 열공망막박리(rhegmatogenous retinal detachment(RRD)), 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion(RVO)), 시신경척수염(neuromyelitis optica(NMO))을 포함하는 눈 질환을 포함한다. 다른 치료될 수 있는 안구(ocular) 장애는 각막 이식(corneal transplant), 각막찰과상(corneal abrasion), 또는 다른 눈에 물리적 손상과 같은 트라우마에 의해 원인이 되는 질환을 포함한다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 설명된 IL-6a를 가지는 IL-6 관련 질환을 가지는 개체를 치료하는 것을 포함한다.
- [0202] 일부 실시형태에서, IL-6 관련된 질환은 염증 질환이다. 일부 실시형태에서, 질환은 녹내장(glaucoma)이다.
- [0203] 일부 실시형태에서, 질환은 안구(ocular) 통증이다.
- [0204] 일부 실시형태에서, 또한 개체의 치료는 개체가 IL-6 관련된 질환을 가지는지의 여부, 및 선택적으로, 개체가 스테로이드 또는 항-VEGF 치료법과 같은 다른 비-IL-6 억제치료에 내성(resistant) 여부를 결정하는 것을 포함한다.
- [0205] 눈과 같은, 예를 들면, 유리체에서, 특이적 유전자자리(locus)에서 효과적인 특정 항체-기반된 치료법을 가진 하나의 문제는 전신성 투여의 원인이 되는 부작용이다. 하나의 해결책은 본 명세서에 설명된 분자로 예를 든 것과 같은 전신성과 반대인 국소적으로 운반될 수 있는 치료법을 제공하는 것이다. 국소적으로, 예를 들면, 유리체(vitreous)로 운반되는 일부 치료법은, 어느 정도까지, 전신성(systemically)으로 나타나기 때문에, 상대적으로 신속한 전신성 회전을(rapid systemic turnover)을 가지는 분자를 디자인하는 것이 유리하다. 본 출원은 부모 분자 또는 참고 항체와 비교하여, 신속한 전신성 회전을 위하여 디자인된 IL-6 항체의 조작된 실시예를 가진다. 이것은 FcRn 매개된 IL-6a의 재생(recycling)을 감소시키기 위하여, 분자의 FcRn 결합을 수정하기 위하여

Fc 도메인을 돌연변이시켜 완성된다.

- [0206] 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema) (DME). 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema(DME))은 시력(visual acuity) 감소 및 실명(blindness) 가능성의 원인이 되는 망막 혈관의 폐색 및 누출을 포함한다. DME에 대한 표준 치료는 스테로이드 또는 항-VEGF 항체의 국소 투여를 포함한다. 그러나, 많은 환자는 상기 치료에 적응하기 힘들다(refractory). 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)의 발병은 혈관신생(angiogenesis), 염증, 및 산화 스트레스 구성요소를 포함한다. IL-6는 조산소증(hypoxia) 및 고혈당증(hyperglycemia)에 의해 유도되고 혈관 염증, 혈관투과성(vascular permeability), 및 병리학적 혈관신생(angiogenesis)을 증가시킨다. IL-6는 직접적으로 VEGF 발현을 유도하고 동물모델에서 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization)을 촉진할 수 있다. DME 환자에서, 안구(ocular) IL-6 수준은 황반의 두께 및 질환의 심각도와 양성적으로 관련된다. 전하는 바에 따르면, IL-6 수준은 항-VEGF에 반응하는 환자에서 감소하는 반면에 항-VEGF 치료법이 실패한 환자에서는 상승된다. 따라서, 본 명세서에 설명된 IL-6a의 투여는 항-VEGF 치료법 또는 대안적으로 항-VEGF 치료법에 반응하지 않는 환자를 위한 것을 포함하는, 항-VEGF 치료와 혼합하여 당뇨병 치료에 유용하다. IL-6a로 황반부종(macular edema)을 치료하는 것은 병리(pathology)를 억제하는 기전을 완전히 억제하는 필요성을 제거함으로써 항상 안전성을 향상시킬 수 있으므로, 따라서 각각의 사이토카인(cytokine)의 일부 원하는 생리학적 역할을 보존한다. 따라서, VEGF 억제와 혼합한 국소적 IL-6a 치료는 치료의 빈번한 용량을 감소시키고 부작용을 감소시킨다.
- [0207] DME에서 유리체 IL-6 수준과 질환 심각성 및 VEGF로 다루기 힘든 개체 사이에 양성적 관계성(positive correlations)이 있다. 따라서, 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a는 스테로이드 치료법, 항-VEGF 치료법, 또는 양쪽 모두에 잘 듣지 않는 DME 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에서, IL-6a는 DME를 치료하기 위하여, 항-VEGF 치료법 또는 스테로이드 치료법과 혼합하여 사용된다.
- [0208] 또한 본 명세서에 설명된 IL-6a는 암, 예를 들면, 전립선암(prostate cancer), 백혈병(leukemia), 다발골수종(multiple myeloma), 염증성(inflammatory)(만성 염증성 증식성 질환(chronic inflammatory proliferative disease)과 같은) 및 자가면역 질환, 예를 들면, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 캐슬만 질환(Castleman's disease)(거대 또는 혈관 여포양 임파선 증식증(angiofollicular lymph node hyperplasia), 림프성 과오종(lymphoid hamartoma), 혈관 여포양 임파선 증식증), 소아특발성관절염(juvenile idiopathic arthritis)(다발성소아특발성관절염(polyarticular juvenile idiopathic arthritis) 및 전신성 소아특발성관절염을 포함하는), 스틸병(Still's disease)(소아특발성관절염 및 어린 발병 스틸병을 포함하는), 어린 발병 스틸병, 아밀로이드 A 아밀로이드증(amyloid A amyloidosis), 류마티스성 다발근통(polymyalgia rheumatica), 부종이 있는 혈청 음성 대칭적 활막염(remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema), 척추관절염(spondyloarthritis), 베체트병(Behcet's disease)(안구 징후의 치료를 포함하여), 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis), 건선(psoriasis), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 다발근육염(polymyositis)(염증성 근육병증), 재발성 다발 연골염(relapsing polychondritis), 후천성 혈우병 A(acquired hemophilia A), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 염증성 빈혈(anemia of inflammation), 및 크론병(Crohn's disease)과 같은 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0209] 또한, IL-6 길항제는 특정 신경학적 질환, 예를 들면, 우울증, 및 알츠하이머병의 치료에 유용하다.
- [0210] 본 명세서에 설명된 IL-6a로 처리될 수 있는 다른 질환은, 제한 없이, 전신성 경화증(systemic sclerosis), 타카야수동맥염(Takayasu arteritis), 거대세포성동맥염(giant cell arteritis), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease), 및 TNF-수용체-관련된 주기 증후군(TNF-receptor-associated periodic syndrome (TRAPS))를 포함한다.
- [0211] **투여량(dosing)**
- [0212] IL-6 항체 또는 이의 단편은, 예를 들면, 비정상적으로 높은 수준의 IL-6을 발현하는 개체 (예를 들면, 환자)에 투여될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 1회 투여될 수 있거나, 여러번 투여될 수 있다. 항체는, 예를 들면, 매일 3회부터 매 6개월마다 1회 또는 그 이상까지(from 3회 daily to once every six 개월 또는 longer) 투여될 수 있다. 투여는 매일 3회, 매일 2회, 매일 1회, 매 이틀마다 1회, 매 3일마다 1회, 매 1주일마다 1회, 매 2주마다 1회, 매 1개월마다 1회, 매 2개월마다 1회, 매 3개월마다 1회 및 매 6개월마다 1회와 같은 일정일 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 미니펌프(minipump) 또는 이식가능한 느린-배출 캡슐(implantable slow-release capsule) 또는 항체 또는 이의 단편을 생성하는 캡슐화된 세포에 의한 것과 같은 다른 경로를 경유하여 계속적으로 투여될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 점막(mucosal), 구강(buccal), 비강내(intranasal), 흡입성

(inhalable), 정맥(intravenous), 피하내(subcutaneous), 근육내(intramuscular), 비경구(parenteral), 안구내(intraocular), 또는 종양내(intratumor) 경로를 경유하여 투여될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 1회, 적어도 2회, 또는 적어도 증상이 치료되고, 완화되거나 또는 치유되는 기간 동안 투여될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 일반적으로 증상이 존재하는 한 오랫동안 투여될 것이다. 항체 또는 이의 단편은 일반적으로 본 명세서에 설명된 약학적 조성물의 일부로서 투여될 것이다. 항체의 투여량은 일반적으로 0.1 내지 100 mg/kg, 0.5 내지 50 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 및 1 내지 10 mg/kg의 범위에 있다. 항체 또는 이의 단편의 혈청 농도는 임의의 적절한 방법에 의해 측정될 수 있다. 본 명세서에 설명된 특정 화합물의 하나의 특징은 이들이 상대적으로 드문 투여량(infrequent dosing), 예를 들면, 주(week)당 1회, 주당 2회, 주당 3회, 매 4주 1회(once every four weeks), 매 2주 1회, 매 8주 1회, 매 12주 1회, 매 16주 1회, 매 32주 1회, 1개월당 1회, 2개월당 1회, 3개월당 1회, 6개월당 1회이다. 일부 경우에서 상기 화합물은 필요에 따라 투여되고, 예를 들면, 개체의 증상에 따라 결정된다. 본 명세서에 설명된 비교적 드문 투여량(infrequent dosing)을 허용하는 IL-6 길항제의 특징은 적어도 부분적으로, 일단 IL-6에 결합한 느린 속도 및 비교적 높은 농도의 화합물을 운반하는 능력에 의해, 완성된 높은 효력의 조합이다.

[0213] 일부 경우에서, IL-6a는 단독 요법으로서 투여된다. 다른 실시형태에서, IL-6a는 메토타렉세이트(methotrexate) 또는 항염증제를 변형시키는 다른 질병과 부수적으로 투여된다.

[0214]

[0215] 항체의 생성

[0216] 항체 IL-6a 또는 유도체 또는 이의 단편은 단클론 항체 방법론과 같은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들면, Kohler 및 Milstein (1975) Nature 256: 495를 참조). 또한 바이러스 또는 B 림프구의 종양 형질 전환과 같은 단클론 항체를 생성하는 다른 기술이 수행될 수 있다.

[0217] 키메라(Chimeric) 또는 인간화된 항체는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 제조된 마우스(murine) 단클론 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 관심있는 마우스(murine) 하이브리도마(Hybridoma)로부터 얻을 수 있고 표준 분자 생물학적 기술을 이용하여 비-마우스(non-murine) (예를 들면, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체를 만들기 위하여, 당업계에 알려진 방법을 사용하여 마우스(murine) 가변영역이 인간 불변 부위에 연결될 수 있다 (예를 들면, 미국특허번호 4,816,567를 참조). 인간화된 항체를 만들기 위하여, 당업계에 알려진 방법을 사용하여 마우스(murine) CDR 영역은 인간 골격으로 삽입될 수 있다(예를 들면, 미국특허번호 5,225,539, 및 미국특허번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; 및 6,180,370를 참조).

[0218] 실시형태에서, 본 명세서에 설명된 IL-6a(예를 들면, 항-IL-6 항체 또는 유도체 또는 이의 단편)은 인간 IL-6에 특이적으로 결합할 수 있다. 실시형태에서, IL-6a는 IL-6의 부위 II(예를 들면, 인간 IL-6의 부위 II)에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0219] 일부 실시형태에서, IL-6a 항체는 인간 단클론 항체이다. 상기 항체는 마우스 시스템보다는 다소 인간 면역 시스템의 일부를 포함하는 트랜스제닉(transgenic) 또는 트랜스 염색체(transchromosomal) 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 상기 트랜스제닉 또는 트랜스 염색체(transchromosomal) 마우스는 HuMAb 마우스® 및 KM 마우스®와 같은 "인간 Ig 마우스"를 포함한다(예를 들면, 미국특허번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429; 미국특허번호 5,545,807; PCT 공개번호: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962; 및 PCT 공개번호 WO 01/14424를 참조).

[0220] 다른 측면에서, 인간 항-IL-6 항체는 인간 중쇄 트랜스유전자(transgene) 및 인간 경쇄 트랜스염색체(transchromosome)를 가지는 마우스와 같이, 트랜스유전자 및 트랜스염색체 상에 인간 면역글로불린 서열을 가지는 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 상기 마우스는 PCT 공개번호 WO 02/43478에서 상세히 설명되어 있다.

[0221] 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 다른 트랜스제닉 동물 시스템은 당업계에서 사용될 수 있고 항체 IL-6a를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 에노마우스™(enomouse™) (Abgenix, Inc.)로 언급되는 대안적 트랜스제닉 시스템이 사용될 수 있다; 미국특허번호 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584; 및 6,162,963. 더욱이, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 트랜스염색체 동물 시스템은 당업계에서 활용될 수 있고 항체 IL-6a를 생성할 수 있다. 예를 들면, 인간 중쇄 트랜스염색체(transchromosome) 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 가진 마우스는 omizuka et al. (2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:722-727)에 설명되어 있다. 또한 인간 단클론 항

체는 예방접종(immunization)에 따라 인간 항체 반응이 생성될 수 있도록 인간 면역 세포가 재구성된 SCID 마우스를 사용하여 제조될 수 있다. 상기 마우스는 예를 들면, 미국특허번호 5,476,996 및 5,698,767에 설명되어 있다.

[0222] **파지 디스플레이 라이브러리(Phage Display Libraries)**

[0223] 일부 경우에서, 항체 IL-6a 항체 또는 유도체 또는 이의 단편은 파지(phage)를 사용하여 인간 항체 라이브러리를 합성하는 것, IL-6, 예를 들면, 인간 IL-6, 또는 이의 단편으로 라이브러리를 스크리닝 하는 것, IL-6에 결합하는 파지를 분리하는 것, 및 파지로부터 항체를 얻는 것을 포함하는 방법으로 생성된다.

[0224] 제조합 인간 항체 IL-6a는 제조합 조합 항체 라이브러리(recombinant combinatorial antibody library)를 스크리닝하여 분리될 수 있다. 일반적으로, 라이브러리는 파지 디스플레이 라이브러리이고, B 세포로부터 분리된 mRNA로부터 제조된 인간 VL 및 VH cDNAs를 사용하여 생성된다. 상기 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하는 키트는 상업적 이용 가능하다(예를 들면, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 및 the Stratagene SurfZAP™ Phage 디스플레이 kit, catalog no. 240612). 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용될 수 있는 다른 방법 및 시약은 당업계에 알려져 있다(본 명세서에 참고로서 모두 삽입된, 예를 들면, 미국특허번호 5,223,409; PCT 공개번호 WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay et al., Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993); Hawkins et al., J Mol Biol 226:889-896 (1992); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Gram et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19:4133-4137 (1991); 및 Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982 (1991)를 참조).

[0225] 원하는 특성을 가진 인간 IL-6 항체를 분리하고 생성하기 위한 실시예에서, 본 명세서에 참고로서 삽입된, PCT 공개번호 WO 93/06213에 설명된 방법이 각인된 항원결정인자를 사용하여, IL-6에 대하여 유사한 결합 활성을 가지는 인간 중쇄 및 경쇄 서열을 선별하기 위하여 인간 IL-6 항체가 첫번째로 사용되었다. 상기 방법에 사용된 항체 라이브러리는 일반적으로, 본 명세서에 참고로서 모두 삽입된, PCT 공개번호 WO 92/01047; McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); 및 Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993)에서 설명된 것처럼 제조되고 스크리닝된 scFv 라이브러리이다.

[0226] 일단 초기 인간 VL 및 VH 도메인이 선택되면, 초기에 선택된 VL 및 VH 분절(segment)의 상이한 쌍이 바람직한 VL/VH 쌍의 조합을 선별하기 위해 IL-6 결합을 위해 스크리닝되는 "혼합(mix) 및 매치(match)" 실험이 수행된다. 바람직한 특징의 IL-6a를 선별하기 위해, VL 및/또는 VH 분절(segment)의 선별된 쌍은 무작위로 돌연변이될 수 있다. 상기 시험관 내 친화성 돌연변이 유발은 예를 들면, 선별된 VH 및 VL 도메인의 하나 또는 모두의 CDR에 무료로 제공되는 PCR 프라이머를 사용하여 VH 및 VL 도메인을 증폭시켜 성취될 수 있으며, 상기 프라이머는 특정 위치의 4개의 뉴클레오타이드 염기의 임의의 혼합물을 포함하고, 결과적인 PCR 산물은 VH 및/또는 VL로 임의의 돌연변이가 도입된 VH 및 VL 분절(segment)을 암호화(encode)한다. 상기 무작위 돌연변이된 VH 및 VL 분절은 IL-6, 예를 들면, IL-6의 부위 II에 결합을 위해서 제-스크리닝될 수 있다.

[0227] 제조합 면역 글로불린 디스플레이 라이브러리로부터 항체 IL-6a의 스크리닝 및 분리 후, 선별된 항체를 암호화하는 핵산은 디스플레이 패키지(예를 들면, 파지 계통에서)로부터 회수될 수 있고 당업계에 알려진 제조합 DNA 기술을 사용하여 다른 발현 벡터로 서브 클로닝될 수 있다. 추가적으로 상기 항체는 본 명세서에 설명된 것과 같이 항체 단편을 생성하기 위하여 추가적으로 조작될 수 있다.

[0228] **약동학(Pharmacokinetics (PK))**

[0229] PK를 위한 테스트는 본 명세서에 설명된 방법 및/또는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 동물의 사용을 요구하는 결정에 대한 하나의 장벽, 예를 들면, PK의 결정은, 인간 IL-6이 상기 테스트에 일반적으로 사용된 일부 동물과 50% 미만의 상동성(homology)을 갖는다는 것이다. 따라서, PK를 테스트하는 하나의 방법은 인간 IL-6를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 사용하는 것이다. 일부 실시형태에서, 비 인간 영장류가 PK를 결정하는데 사용된다.

[0230] 일부 실시형태에서, 항-IL6 항체는 FcRn 결합의 pH 민감도를 변경시켜, 자체의 PK가 변경되도록 돌연변이된다. 상기 돌연변이를 얻는 방법은 실시예에서 설명되어 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, IL-6a는 부모 IL-6a 또는

참고 분자와 비교하여 변경된 전신성 PK를 가진다. 일부 경우에서, PK는 유리체에서 변경되지 않거나 또는 향상된다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 부모 IL-6a 또는 참고 분자와 비교하여 감소된 전신성 PK (예를 들면, 감소된 반감기 및/또는 증가된 제거율, 예를 들면, 혈액, 혈장, 림프, 또는 혈청과 같은 순환액(circulatory fluid)에서 분석됨)을 가진다.

[0231] **IL-6 길항제 테스트를 위한 모델**

[0232] IL-6 길항제는 IL-6 관련된 운반(delivery)을 위한 질병 모델에서, 특히 유리한 IL-6 특성에 대한 치료 효능 및 제한된 해로운 효과에 대해서 테스트될 수 있다. 예를 들면, 포도막염(uveitis)은 완전한 프로이드 어주번트 면역(complete Freund's adjuvant (CFA) immunization)에서 광수용체 레티노이드 결합 단백질(interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP))을 사용하여 래트 또는 마우스 (Caspi, Invest Ophthalmol Vis Sci 52:1873; Agarwal et al., 900:443-69, 2012)의 실험적 자가면역 포도막염(uveitis) 모델에서 테스트될 수 있다. 다른 모델은 수지상세포(dendritic cell)-유도된 포도막염(uveitis), 배양된 작용 T 세포의 양자 전달(adoptive transfer of cultured effector T cell), IRBP TCR Tg 마우스에서 자발적 EAU, 내독소-유도된 포도막염(uveitis), 자가 면역성 포도막염(autoimmune uveoretinitis)에 대해 당업계에서 알려진 것을 포함한다(Haruta et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 53:3264 (2011); Yoshimura et al., Rheumatology 48:347-354 (2009)).

[0233] IL-6 관련된 질환 치료에서 IL-6a의 효과를 조사하기 위하여 사용될 수 있는 다른 모델 시스템은, 예를 들면, 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization) (CNV) 모델 (Izumi-Nagai et al., Am J Pathol 170:6 (2007); Krzystolik et al., Arch Ophthalmol 120:338 (2002)) 및 Kern et al.에서 설명된 것과 같은 당뇨병 모델이다 (Animal Models Of Diabetic Complications Consortium (P01 DK57733), Update Report (September 2001 January 2004)). 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)에서 IL-6a를 테스트하는데 유용한 동물 모델은 당업계에 알려져 있고, 예를 들면, Asquith et al. (Eur J Immunol 39:2040-4 (2009)) 및 Kollias et al. (Ann Rheum Dis 70:1357-62 (2011)) 참조하시오.

[0234] CNV 모델은 AMD 및 DME의 인간 증상을 대표한다. 망막혈관신생(retinal neovascularization) 모델은 허혈성 망막병증(ischemic retinopathies), 예를 들면, 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy) 또는 미숙아 망막 병증(retinopathy of prematurity)을 연구하는데 유용하다. 다양한 맥락막 및 망막신생혈관증(retinal neovascularization)은 당업계에 알려져 있고(예를 들면, Grossniklaus, H.E. et al. Prog Retin Eye Res. 2010 Nov;29(6):500-19. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003. Epub 2010 May 19; Saisin, Y et al. (2003) Journal of Cellular Physiology, 195:241-248; Takahashi, K. et al. (2003) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 44(1):409-415; Lima e Silva, R. et al. (2007) FASEB Journal, 21:3219-3230; Tobe et al. (1998) American Journal of 병리학, 153(5):1641-1646; Dong, A et al. (2011) PNAS, 108(35): 14614-14619; Dong et al. (2009) J Cell Physiol 219:544-552; Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341)을 참조), IL-6a의 효능을 조사하기 위해 사용될 수 있다. 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization)(CNV)은, 예를 들면, 레이저(lasers), 빛(light), 외과수술(surgery), 또는 유전자 수정(genetic modifications)에 의해, 유도될 수 있다. 산소-유도된 망막혈관신생의 모델은 당업계에 알려져 있고 예를 들면, Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341에 설명되어 있다.

[0235] 또한 허혈/재관류(ischemia/reperfusion) 모델이 사용될 수 있다. 예를 들면, Zheng, L et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 48 no. 1 pp. 361-367, 2007을 참조하시오. 예를 들면, 1일째에, 액체가 가방(fluid bag)에 부착된 30 30 게이지 바늘(gauge needle)은 마취된 마우스의 각막에 삽입되고 안구내 압력(IOP)이 허혈이 일어나도록 대략 120 mmHg로 상승된다. 30-90 분 후에, 바늘이 제거되고, IOP가 정상화되며, 망막순환의 역류(reflow)가 발생한다. 2-6일째에 NF- α 및 ICAM-1을 포함하는 염증성 마커의 발현은 웨스턴 블랏 및 qPCR로 평가될 수 있다. 추가적으로, 신경절 세포 손실(ganglion cell loss)은 3-14일째에 조직학(histology)에 의해 평가될 수 있고 모세 혈관 변성(capillary degeneration)은 10-14일째에 트립신 절단 기술(trypsin digest technique)로 측정된다. 치료 연구를 위하여, 테스트 물질(예를 들면, IL6a의 적절한 농도, 예를 들면, 20 mg/ml의 1 μ l)이 허혈 유도 직전 또는 직후에 유리체내로 주입된다.

[0236] **병용 치료**

[0237] 일부 실시형태에서, IL-6a는 두번째 치료 실체와 혼합하여 투여된다. 예를 들면, IL-6a는 예를 들면, 라니비주

마브(ranibizumab)와 같은 VEGF 억제제를 포함하는 치료법(treatment regime)으로 투여된다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 예를 들면, an 항-PDGF 항체 또는 항-PDGF 수용체 항체 (예를 들면, imatinib)와 같은 PDGF 억제제를 포함하는 치료법(treatment regime)으로 투여된다. 일부 실시형태에서, IL-6a는 보완경로 (complement pathway) 억제제, 예를 들면, 램팔리주마브(lampalizumab) (인자 D 억제제) 또는 C5 억제제와 혼합하여 투여된다.

[0238] **IL-6 길항제의 운반**

[0239] 본 명세서에 설명된 IL-6 길항제 또는 조성물은 IL-6 억제를 위하여 표적되는 세포 또는 조직으로 또는 근처와 직접적으로 접촉하여, 국소적으로 운반될 수 있다. 상기 운반 방법의 비제한적 예는 IL-6 길항제를 포함하는 물질의 주사(injection), 주입(infusion) 또는 이식을 포함한다.

[0240] 실시형태에서, IL-6a 또는 조성물은 안구 내, 예를 들면, 유리체 내, 예를 들면, 유리체내 주사, 안구 삽입 (ophthalmic insert), 유전자 운반(유전적 운반(genetic delivery))에서 투여된다.

[0241] 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은 안구 제제(ophthalmic formulation)로서 투여된다. 방법은 IL-6 조성물 및 안과적으로 허용가능한 담체의 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 안구 제제(ophthalmic formulation)는 액체, 반-고체, 삽입물(insert), 필름, 미세입자 또는 나노입자이다. IL-6 조성물은 예를 들면, 국소적으로 또는 주입(예를 들면, 유리체내 주사)으로 투여될 수 있다.

[0242] 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은 유리체내 주사를 위해 제조된다.

[0243] 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은 국소투여, 예를 들면, 눈을 위해 제조된다. 국소 제제는 액체 제제 또는 반-고체일 수 있고, 예를 들면, 국소 제제는 수용액(aqueous solution), 수성 현탁액(aqueous suspension), 연고 또는 젤을 포함할 수 있다. 안구(ophthalmic) IL-6a 제제는 눈앞(front of eye), 위눈꺼풀 아래(under the upper eyelid), 아래 눈꺼풀(on the lower eyelid) 및 맹낭(cul-de-sac)에 국소적으로 적용될 수 있다. 일반적으로, 안구 제제는 멸균이다. IL-6a 안구 제제는 안구 제제의 제조를 위해 적절한 하나 또는 그 이상의 약학적 부형제를 포함할 수 있다. 상기 부형제의 예는 보존제(preserving agents), 완충제(buffering agents), 킬레이 트제(chelating agents), 항산화제(antioxidant agents) 및 삼투압을 조절하는 염이다. 연고 및 현탁액 모두를 포함하는, 안구 제제는, 일반적으로 선택된 경로의 투여에 적합한 점도를 가진다. 일부 실시형태에서, 안구 제제는 약 1,000부터 약 30,000까지의 센티포이즈(cenipoise)의 점도를 가진다.

[0244] 일부 실시형태에서, 제제는 중합체를 포함하는 액체 제제이다. 상기 중합체는 생물학적이용가능성, 점성을 높이거나 눈으로부터의 액체 제제의 배수를 감소를 향상시키는데 사용될 수 있다. 적절한 중합체는 Wagh et al. (Asian J Pharm, 2:12-17, 2008)에 설명된 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비제한적 실시예에서, 중합체는 소듐 히아루로나제(sodium hyaluronase), 키토산(chitosan), 사이클로덱스트린(cyclodextrin)(예를 들면, 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린(hydroxypropyl-β-cyclodextrin), 폴리갈락토론산(polygalactonic acid), 크실로글루칸(xyloglucan), 크산탄 검(xanthan gum), 젤란검(gellan gum), 티오머(thiomer), 폴리(ortho 에스테르)(poly(ortho ester)) (예를 들면, Einmahl, Adv Drug Deliv Rev 53:45-73, 2001), 또는 타마린트 시드 폴리사카라이드(tamarind seed polysaccharide) (예를 들면, Ghelardi et al., Antimicrob Agents Chemother 48:3396-3401, 2004)이다.

[0245] 일부 실시형태에서, 안과적 운반을 위한 IL-6 조성물은 하나 또는 그 이상의 계면활성제, 보조제, 완충제 (buffers), 항산화제(antioxidants), 긴장성 조정제(tonicity adjusters), 보존제(preservatives)(예를 들면, EDTA, BAK (benzalkonium chloride), 소듐클로라이드(sodium chlorite), 소듐퍼보레이트(sodium perborate), 폴리쿼터늄-1(polyquaterium-1)), 두께 또는 점도 조절제(viscosity modifiers)(예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 하이드록시메틸셀룰로오스(hydroxymethyl cellulose), 폴리 비닐 알코올 (polyvinyl alcohol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 글리콜400(glycol 400), 프로필렌 글리콜 하이드록시 메틸셀룰로오스(propylene glycol hydroxymethyl cellulose), 하이드록시 프로필-구아(hydroxypropyl-guar), 히알루론산(hyaluronic acid), 및 하이드록시프로필셀룰로오스(hydroxypropyl cellulose)) 등을 포함할 수 있다. 제제에서 첨가제는 소듐 클로라이드, 소듐바이카보네이트(sodium bicarbonate), 소르브산(sorbic acid), 메틸 파라벤(methyl paraben), 프로필 파라벤(propyl paraben), 클로르헥시딘(chlorhexidine), 파마자 기름(castor oil), 및 소듐퍼보레이트(sodium perborate)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0246] 일부 실시형태에서, 정제된 또는 탈이온수는 조성물에 사용된다. pH는 약 5.0 내지 8.5, 예를 들면, pH 7.0, pH 7.3, pH, 7.4, 또는 pH 7.5의 범위 내에서 생리학적으로 및 안과적으로 허용가능한 pH를 조절가능한 산, 염기

또는 완충제(buffers)를 첨가하여 조절될 수 있다. 안과적으로 허용가능한 산의 예는 아세트산(acetic), 붕산(boric), 구연산(citric), 젖산(lactic), 인산(phosphoric), 염산(hydrochloric) 등을 포함하고, 염기의 예는 소듐하이드록사이드(sodium hydroxide), 소듐포스페이트(sodium phosphate), 소듐보레이트(sodium borate), 소듐시트레이트(sodium citrate), 소듐아세테이트(sodium acetate), 소듐락테이트(sodium lactate), 트로메타민(tromethamine), 트리스하이드록시메틸아미노-메탄(trishydroxymethylamino-methane) 등을 포함한다. 제제에 사용될 수 있는 염(salts) 및 완충제(buffers)의 예는 시트레이트/덱스트로오스(citrate/dextrose), 소듐바이카보네이트(sodium bicarbonate), 암모늄클로라이드(ammonium chloride) 및 앞서 말한 산 및 염기의 혼합물을 포함한다.

[0247] 일부 실시형태에서, 안구(ophthalmic) 조성물의 삼투압은 약 10 밀리 오스몰러(milliosmolar)(mOsm)부터 약 400 mOsm까지, 예를 들면, 200 내지 400 mOsm, 또는 220 내지 370 mOsm일 수 있다. 일반적으로, 삼투압은 생리학적으로 및 안과적으로 허용가능한 염(salts) 또는 부형제를 사용하여 조절될 수 있다. 일부 실시형태에서, 소듐 클로라이드는 제제에 포함되고, 예를 들면, 소듐 클로라이드는 소듐 클로라이드는 조성물의 총 중량을 기준으로, 0.01 내지 1 중량%, 또는 0.05 내지 0.45 중량% 범위의 농도의 제제에 존재한다. 원하는 범위 내의 삼투압을 성취하기 위하여 소듐 클로라이드 대신에, 포타슘(potassium), 암모늄(ammonium) 등과 같은 양이온(cations) 및 클로라이드(chloride), 시트레이트(citrate), 아스코르베이트(ascorbate), 보레이트(borate), 포스페이트(phosphate), 바이카보네이트(bicarbonate), 설페이트(sulfate), 티오설페이트(thiosulfate), 바이설페이트(bisulfate), 소듐설페이트(sodium bisulfate), 암모늄설페이트(ammonium sulfate) 등과 같은 음이온으로 구성된 동등한 양의 하나 또는 그 이상의 염이 추가적으로 사용될 수 있다.

[0248] 또한 일부 실시형태에서, 만니톨(mannitol), 덱스트로오스(dextrose), 소르비톨(sorbitol), 글루코오스(glucose) 등과 같은 슈가(sugar) 등이 삼투압을 조절하기 위하여 사용될 수 있다.

[0249] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 눈의 외부 표면과 접촉하여 제제의 저장소(depot)를 형성하거나 공급하는 것을 포함한다. 저장소(depot)는 눈물이나 다른 눈 제거 기전에 의해 신속히 제거되지 않는 제제의 원천(source of agent)을 의미한다. 이를 통해 계속적이고 지속적인 고농도 제제가 단일 적용으로도 눈의 외부 표면의 액체에 존재하게 된다. 일부 실시형태에서, 저장소(depot)는 최대 8 시간 이상 지속될 수 있다. 일부 실시형태에서, 안구 저장소는 수성 중합체 현탁액(aqueous polymeric suspensions), 연고, 및 고체 인서트 삽입물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0250] 일부 실시형태에서, 반-고체 조성물은 눈에 적용시 점도가 증가하는 액체 제제이고, 이는 일반적으로 온도, pH 또는 전해질 농도의 변화에 따라 증가하는 점도가 있는 액체 제제의 중합체로 인해 발생한다. 예를 들면, 중합체는 셀룰로오스아세토프탈레이트(celluloseacetophthalate), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 겔란 검(gellan gum), 히알루로나제(hyaluronase), 키토산(chitosan), 알긴산 염(salts of alginic acid) (예 : 알긴산 나트륨(sodium alginate)), 또는 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide) 및 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)의 블록 공중합체(a block copolymer)(예를 들면, 플루로닉®(Pluronic®), BASF; 폴록 사머)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아크릴산(polyacrylic acid)은 가교 결합된 아크릴산(cross-linked acrylic acid)(예를 들면, 카르보폴®(Carbopol®))이다. 일부 실시형태에서, 반-고체 조성물은 카르보폴과 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide) 및 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)의 블록 공중합체의 혼합물 및; 메틸셀룰로오스와 하이드로시에틸셀룰로오스의 혼합물; 또는 폴리에틸렌 글리콜과 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드의 블록 공중합체의 혼합물을 포함한다.

[0251] 일부 실시형태에서, 안구 제제를 포함하는 IL-6a는 오일-기초된 운반 비히클(oil-based delivery vehicle)이다. 예를 들면, 제제는 IL-6 조성물이 첨가되는(예를 들면, 0.1 내지 2%에서) 페트롤륨(petroleum) 또는 라놀린 염기(lanolin base), 및 부형제를 포함할 수 있다. 공통 염기는 미네랄 오일(mineral oil), 페트롤라툼(petrolatum) 및 이의 조합을 포함할 수 있으나, 제한되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 연고는 아래 눈꺼풀 상으로 리본(ribbon)으로 도포된다.

[0252] 일부 경우에서, 안구 조성물은 안구 삽입물(ophthalmic insert)이다. 실시형태에서, 조성물은 안구 삽입물을 경유하여 유리체내에 투여된다.

[0253] 예를 들면, 안구 삽입물은 생물학적으로 불활성이고, 부드럽고, 생물침식성(bio-erodible)이고, 점탄성(viscoelastic)이며, 치료제에 노출된 후에도 살균에 안정적이고, 공기 중 박테리아, 생체 침식, 생체 적합성 및/또는 점탄성의 감염에 내성이 있다. 일부 실시형태에서, 상기 삽입물은 안과적으로 허용가능한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 중합체 매트릭스를 포함한다. 매트릭스는 일반적으로 중합체이고 IL-6 조성물은 매트릭스

내에 분산되거나 중합체 매트릭스에 결합된다. 일부 실시형태에서, 제제는 공유 결합의 용해(dissolution) 또는 가수 분해(hydrolysis)를 통해 매트릭스로부터 서서히 방출된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 생체 침식성(가용성)이고 이의 용해 속도는 본 명세서에서 분산된 제제의 방출 속도를 조절할 수 있다. 다른 형태에서, 중합체 매트릭스는 가수분해에 의해 분해되어 이에 결합된 제제를 방출하거나 분산되는 생분해성(biodegradable) 중합체이다. 추가적 실시형태에서, 매트릭스 및 제제는 추가적으로 방출을 제어하기 위해 추가 중합체 코팅으로 둘러싸여 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 폴리카프로락톤(polycaprolactone(PCL)), 에틸렌/비닐아세테이트 공중합체(ethylene/vinyl acetate copolymer)(EVA), 폴리알킬시아노아크릴레이트(polyalkyl cyanoacrylate), 폴리우레탄(polyurethane), 나일론(nylon) 또는 폴리(디-락티드-코-글리콜리드)(poly(dl-lactide-co-glycolide) (PLGA), 또는 임의의 이들의 공중합체와 같은 생분해성 중합체를 포함한다. 일부 경우에서, 제제는 매트릭스 물질로 분산되거나 중합체화 이전에 매트릭스 물질을 만드는데 사용된 단량체(monomer) 조성물 중에서 분산된다. 일부 실시형태에서, 제제의 양은 약 0.1부터 약 50%까지, 또는 약 2부터 약 20%까지이다. 생분해성 또는 생물침식이 가능한 중합체 매트릭스가 사용될 수 있고 사용된 삽입물은 눈에서 제거될 필요가 없다. 생분해성 또는 생물침식이 가능한 중합체 매트릭스는 분해성이거나 또는 용해적이고, 제제는 방출된다.

[0254] 추가적 실시형태에서, 안구 삽입물은 본 명세서에 참고로서 전문이 삽입된, Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., pages 12-17 (January 2008)에 설명된 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone (PVP)), 아크릴레이트(acrylate) 또는 메틸아크릴레이트(methacrylate) 중합체 또는 공중합체 (예를 들면, Rohm 또는 Degussa로부터의 중합체의 Eudragit® 페밀리), 하이드록시메틸셀룰로오스(hydroxymethyl cellulose), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리(아미도아민)덴드리머(poly(amidoamine) dendrimers), 폴리(디메틸실록산)(poly(dimethylsiloxane)), 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(poly(lactide-co-glycolide)), 폴리(2-하이드록시메타크릴레이트)(poly(2-hydroxyethylmethacrylate)), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol), 또는 폴리(프로필렌 푸마레이트)(poly(propylene fumarate))로부터 선택되는 중합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 Gelfoam®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 450 kDa-시스테인 결합체(450 kDa-cysteine conjugate)의 폴리아크릴산이다.

[0255] 삽입물은 IL-6 조성물 및 외부 튜브(outer tube)를 포함하는 코어(core)를 포함할 수 있다(예를 들면, 미국특허 공개번호 20040009222에서 설명된 바와 같이). 일부 경우에서, 외부 튜브는 투과성이거나, 약물에 불투과성(impermeable)이다. 일부 실시형태에서, 상기 코어(core)는 IL-6 조성물 방출의 속도에 현저한 효과를 가지지 않는 중합체 매트릭스를 포함한다. 일부 경우에서, 외부 튜브, 코어의 중합체 매트릭스는 또는 둘다 생체 침식성이 있다. 공동-압출된(co-extruded) 제품은 약물 운반 장치로 세분될 수 있다. 일부 실시형태에서, 장치는 코팅이 되어 있지 않아서 각각의 끝이 열려 있거나, 또는 장치는 IL-6a 조성물에 투과성이고 IL-6a 조성물에 반투명하거나, 또는 생체침식성이 있는 층으로 코팅되어 있다. 특정 실시형태에서, IL-6 조성물 및 적어도 하나의 중합체는 분말 형태로 혼합된다.

[0256] 일부 실시형태에서, 안구 조성물은 안구 필름이다. 상기 필름에 적절한 중합체는 Wagh, et al. (supra)에 설명된 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 필름은 소프트-콘택트렌즈, 예를 들면, 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트(ethyleneglycol dimethacrylate)와 가교 연결된 N,N-디에틸아크릴아미드(N,N-diethylacrylamide) 및 메타크릴산(methacrylic acid)의 공중합체로 구성된 렌즈이다.

[0257] 특정 실시형태에서, IL-6a는 관형(tubular form)으로 된 삽입물이고 분할(segmented)될 수 있다.

[0258] 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은, IL-6 조성물이 과립(granular) 또는 미립자(particulate) 형태와 같은, 중합체 매트릭스로 코팅되거나 분산되는, 치료적 유효량으로 제조된다. 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은, 입자로부터의 약물이 매트릭스로 또는 매트릭스 내에서 용해되고, 매트릭스를 통해 분산되고, 주변 생리적 유체(fluid)로 방출되는 것과 같이, 제제로부터 방출된다. 일부 실시형태에서, 방출 속도는 매트릭스로 들어가는 과립/미립자로부터의 IL-6 조성물의 용해 속도에 의해 제한된다; 매트릭스 및 분산을 통하여 주위의 유체(surrounding fluid)로 들어가는 확산(diffusion) 단계는 주요 방출 속도 제한(release-rate-limiting)이 아니다. 특정 실시형태에서, 중합체 매트릭스(matrix)는 생체 침식성이 없지만(non-bioerodible), 다른 형태에서는 생체 침식성이 있다. 생체 침식성이 없는 중합체 매트릭스의 예는 폴리우레탄(polyurethane), 폴리실리콘(polysilicone), 폴리(에틸렌-코-비닐아세테이트)(poly(ethylene-co-vinyl acetate) (EVA)), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 및 유도체 및 이의 공중합체(copolymer)로부터 형성될 수 있다. 생체 침식성이 있는 중합체 매트릭스 예는 폴리아나이드리드(polyanhydride), 폴리 유산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic

acid), 폴리오르쏘에스테르(polyorthoester), 폴리알킬시아노아크릴레이트(polyalkylcyanoacrylate), 및 유도체 및 이의 공중합체(copolymer)로부터 형성될 수 있다.

[0259] 일부 경우에서, IL-6 조성물은 콜라겐성 물질로 제조된다. 예를 들면, 삽입물은 가용성 안구 약물 삽입물(예를 들면, 약물 운반을 위해 상부 결막낭(upper conjunctival sac)에 도입될 수 있는 중합체 타원형 필름(polymeric oval film); 에틸렌비닐아세테이트(ethylene vinyl acetate)로 제조된 OCUSERT (Alza 회사에서 개발된, pilocarpine ocular therapeutic system)와 같은 타원형 삽입물(elliptical insert); Lacrisert®, 셀룰로오스로 만든 막대 모양의 삽입물(rod shaped insert); 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol))로 만들어진, 새로운 안구 약물 운반 시스템; 또는 Fabrizio (Adv Drug Deliv Rev 16 : 95-106, 1998)에 설명된 것과 같은 삽입물일 수 있다. 일부 경우에서, 삽입물은 콜라겐, 젤라틴, 또는 중합체를 포함하고, 상기 중합체는 폴리카프로락톤(polycaprolactone (PCL)), 에틸렌/비닐아세테이트(ethylene/vinyl acetate)공중합체 (EVA), 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리우레탄, 나일론, 폴리(디락티드-코-글리콜리드(poly(dl-lactide-co-glycolide(PLGA))), 또는 임의의 이들의 공중합체로부터 선택된다. 일부 경우에서, 삽입물은 상부 눈꺼풀 밑으로 이식된다. 일부 경우에서, 삽입물은 맥락막 공간(choroidal space) 또는 공막(sclera)에서, 눈의 후방 부분에 이식된다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 유리체내 또는 하부-망막적으로(sub-retinally) 이식된다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 하부-망막적으로(sub-retinally)으로 주입된다. 이들의 제조를 위한 투여 및 기술의 방법은, 본 명세서에 참고로서 전문이 삽입된, 앞에서 말한 레밍톤(Remington's): The Practice of Science of Pharmacy, 20th edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2006)에 있다.

[0260] 다른 실시형태에서, IL-6 조성물을 포함하는 삽입물은 눈의 유리체(vitreous)로 제제의 지연된 방출을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "지연된 방출(sustained release)"은 조성물이 제어된 방식으로 장기간에 걸쳐 제제를 방출하는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 방출하는 동안에 액체 제제(aqueous agent) 농도가 유리체 제제 농도 미만으로 유지되는 속도로 제제를 방출한다. 일부 실시형태에서, 액체 제제 농도는 약 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 또는 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{m}$ 부터, 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 또는 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만까지이다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 1 $\mu\text{g}/\text{day}$ 내지 약 50 $\mu\text{g}/\text{일}$, 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{일}$ 내지 약 10 $\mu\text{g}/\text{일}$ 의 속도로 방출된다. 일부 실시형태에서, 삽입물은 상기 상세히 설명된 바와 같이, 예를 들면, 플루오시노론(fluocinolone acetonide) (안구 삽입물 레티설트®(Retisert®)에서 발견된 것과 같은)와 같은 추가 치료제를 추가적으로 포함한다.

[0261] 일부 실시형태에서, 안구 조성물은 미세구(microspheres) 또는 나노입자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미세구는 젤라틴을 포함한다. 일부 실시형태에서, 미세구는 맥락막 공간에서, 공막(sclera)에서, 유리체내의 또는 하부-망막적으로(sub-retinally), 눈의 후방 부분으로 주입된다. 일부 실시형태에서, 미세구 또는 나노입자는 Wagh, et al. (Asian J Pharm 2:12-17, 2008)에 설명된 것을 포함하는 중합체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 중합체는 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 알부민 입자(albumin particles), 히아루론산 에스테르(hyaluronic acid esters), 폴리타코닉산(polyitaconic acid), 폴리(부틸)시아노아크릴레이트(poly(butyl)cyanoacrylate), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리(이소부틸)카프로락톤(poly(isobutyl)caprolactone), 폴리(락트산-코-글리콜산)(poly(lactic acid-co-glycolic acid)), 또는 폴리(락트산)(poly(lactic acid))과 같은 키토산, 폴리카르복실산(polycarboxylic acid)이다. 일부 실시형태에서, 미세구 또는 나노입자는 고체 지지 입자를 포함한다.

[0262] 일부 실시형태에서, IL-6 조성물은 이온 교환 수지(ion-exchange resin)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 수지는 무기 제올라이트(inorganic zeolite) 또는 합성 유기 수지(synthetic organic resin)이다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 수지는, 본 명세서에 참고로서 전문이 삽입된, 앞서 언급한 바와 같은 Wagh, et al., 에 설명된 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 수지는 특히 중화된 폴리아크릴산이다.

[0263] IL-6 조성물은 액체 중합체성 현탁액에서 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-6 조성물 또는 중합체 현탁제는 액체 배지(예를 들면, 상기 언급된 특성을 가지는)에서 현탁된다. 중합체 현탁제의 예는 다른 중합체 진동제(demulcents)뿐만 아니라, 텍스트란(dextrans), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycols), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리사카리이드 젤(polysaccharide gels), 젤라이트®(Gelrite®), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스(hydroxypropyl methylcellulose)같은 셀룰로오스 중합체, 및 중합체 또는 아크릴산과 같은 공중합체와 같은 카르복시-포함하는 중합체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 중합체 현탁제는 물 팽윤성(water swellable), 물 불용성(water insoluble) 중합체, 특히 가교된 카르복시-함유 중합체이다. 일부 실시형태에서, 중합체 현탁제는 존재하는 단량체의 총 중량을 기준으로 하여, 적어도 약 90 중량%

내지 약 99.9 중량%, 또는 약 95 중량% 내지 약 99.9 중량%의 하나 또는 그 이상의 카르복시-함유 모노 에틸렌성 불포화 단량체(monoethylenically unsaturated monomers)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 아크릴산, 메타크릴산(methacrylic acid), 에타크릴산(ethacrylic acid), 메틸아크릴산(크로톤산)(methacrylic acid(crotonic acid)), 시스- α -메틸크로톤산(엔젤산)(cis- α -methylcrotonic acid (angelic acid)), 트랜스- α -메틸크로톤산(티그린산)(trans- α -methylcrotonic acid(tiglic acid)), α -부틸크로톤산(α -butylcrotonic acid), α -페닐아크릴산(alpha-phenylacrylic acid), α -벤질아크릴산(α -benzylacrylic acid), α -시클로헥실아크릴산(α -cyclohexylacrylic acid), 페닐아크릴산(신남산)(phenylacrylic acid(cinnamic acid)), 쿠마르산(o-하이드록시신남산)(coumaric acid(o-hydroxycinnamic acid)), 및 움브산(p-하이드록시쿠마르산)(umbellic acid(p-hydroxycoumaric acid))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합체는 다기능 가교제(polyfunctional crosslinking agent)(예를 들면, 이중기능성 가교제(difunctional crosslinking agent))에 의해 가교된다. 일부 실시형태에서, 가교제는, 존재하는 단량체의 총 중량에 근거하여, 약 0.01% 내지 약 5%, 또는 약 0.1% 내지 약 5.0%, 또는 약 0.2% 내지 약 1% 양로 포함된다. 일부 실시형태에서, 가교제는 디비닐 글리콜(divinyl glycol), 2,3-디하이드록시헥사-1,5-디엔(2,3-dihydroxyhexa-1,5-diene), 2,5-디메틸-1,5-헥사디엔(2,5-dimethyl-1,5-hexadiene), 디비닐벤젠(divinylbenzene), N,N-디아릴아크릴아미드(N,N-diallylacrylamide), N,N-디아릴메타크릴아미드(N,N-diallylmethacrylamide)와 같은 비폴리아케닐 폴리에테르 이중기능성 가교 단량체(nonpolyalkenyl polyether difunctional crosslinking monomers); 분자 당 2개 또는 그 이상의 알케닐 에테르 그룹핑 한것, 예를 들면, 알릴브로마이드(allyl bromide) 등, 예를 들어, 폴리아릴 수크로즈(polyallyl sucrose), 폴리아릴 펜타에리트리톨(polyallyl pentaerythritol) 등과 같은 알케닐 할리드(alkenyl halide)를 갖는 적어도 3개의 하이드록실기 및 4개의 탄소원자를 포함하는 다가 알코올(polyhydric alcohol)을 에테르화(etherifying)시켜 제조된, 말단 $H_2C=C$ 군을 포함하는 알케닐 에테르 그룹핑한 것을 포함하는 폴리아케닐 폴리에테르 가교제(polyalkenyl polyether crosslinking agents); 디올 및 폴리올(diols 및 polyols)의 불용성 디아크릴레이트(diacrylates) 및 폴리아크릴리이트(polyacrylates) 및 메타크릴레이트(methacrylates), 이소시아네이트(isocyanate)의 디이소시아네이트 하이드록시알킬 아크릴레이트(diisocyanate hydroxyalkyl acrylate) 또는 메타크릴레이트의 반응 생성물로 말단된 하이드록시알킬메타크릴레이트를 가지는 폴리에스테르 디올(polyester diols), 폴리에테르 디올(polyether diols) 또는 폴리실록산 디올(polysiloxane diols)로부터 유래된 예비 중합체(prepolymers), 등과 같은, 약 400 내지 약 8,000의 분자량을 가지는 디올레핀성의 비-친수성 거대분자 가교제이다.

[0264]

일부 실시형태에서, 가교-결합된 중합체는 카르복시-함유 모노에틸렌계(monoethylenically) 불포화 단량체 또는 존재하는 유일한 모노에틸렌계 불포화 단량체로서 단량체와 함께 가교제 또는 작용제와 함께 제조된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 메틸 메타크릴레이트(methyl methacrylate), 에틸 아크릴레이트(ethyl acrylate), 부틸 아크릴레이트(butyl acrylate), 2-에틸헥사이크릴레이트(2-ethylhexylacrylate), 옥틸 메타크릴레이트(octyl methacrylate), 2-하이드록시메타크릴레이트(2-hydroxyethylmethacrylate), 3-하이드록시프로필아크릴레이트(3-hydroxypropylacrylate), 등, 비닐아세테이트(vinyl acetate), N-비닐피롤리돈(N-vinylpyrrolidone), 등 (예를 들면, Mueller et al. 미국특허번호 4,548,990)과 같은 아크릴계(acrylic) 및 메타크릴산(methacrylic acid) 에스테르를 포함하는, 단지 생리학적 및 안과용 무해한 치환체를 포함하는 단량체 또는 하나 또는 그 이상의 비-카복실을 포함하는 모노에틸렌성으로 불포화 단량체 또는 단량체로 대체된 카르복시-함유 모노에틸렌계 불포화 단량체 또는 단량체들의, 약 40 중량%까지, 바람직하게는 약 0 내지 약 20 중량%인 것이다. 일부 실시형태에서, 중합체는 폴리카르보필(polycarbophil)(Noveon AA-1), Carbopol®, 및 DuraSite®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가교 중합체는 통상적인 자유 라디칼 중합 촉매를 사용하여, 동등한 구형 직경이 약 $50\mu m$ 이하(not more than)의 건조 입자 크기로, 단량체를 현탁 또는 유화 중합시킴으로써 제조된다. 일부 실시형태에서, 평균 건조 입자 크기는 동등한 구형 지름(equivalent spherical diameter)의 약 1 내지 약 $30\mu m$, 또는 약 3 내지 약 $20\mu m$ 이다. 일부 실시형태에서, 중합체 입자는 더 큰 중합체 입자를 기계적으로 분쇄하여 얻어진다. 추가적 실시형태에서, 상기 중합체는 약 250,000 내지 약 4,000,000, 및 3,000,000,000 내지 4,000,000,000 분자량을 가질 것이다. 다른 실시형태에서, 가교 중합체의 입자는 단분산(monodisperse)되어 있는데, 이는 입자의 약 80%, 약 90% 또는 약 95%가 주요 입자 크기 분포의 μm 범위 내에 속하는 입자 크기 분포를 갖는다는 것을 의미한다. 추가적 실시형태에서, 단분산 입자 크기는 $1\mu m$ 이하(below $1\mu m$) 크기의 겨우(no more than) 약 20%, 약 10% 또는 약 5%를 의미한다. 일부 실시형태에서, 수용성 중합체 현탁액은 제제의 약 0.05 내지 약 1%, 약 0.1 내지 약 0.5%, 또는 약 0.1 내지 약 0.5% 및 중합체 현탁제의 약 0.1 내지 약 10%, 약 0.5 내지 약 6.5%, 약 0.5 내지 약 2.0%, 약 0.5 내지 약 1.2%, 약 0.6 내지 약 0.9%, 또는 약 0.6 내지 약 0.8%를 포함한다. 단수로 언급되었지만, 하나 또는 그 이상의 중합체 현탁제 중은 언급된 범위 내에 있는 총량으로 사용될 수 있다는

것을 이해해야 한다.

- [0265] 일 실시형태에서, 불용성이 약하게 가교 결합된 중합체 입자, pH 및 삼투압의 양은, 25번 스핀들(spindle) 및 12 rpm의 13R 소형 샘플 어댑터(small sample adapter)로 장착된 브룩필드 디지털 LVT 점도계(Brookfield Digital LVT Viscometer)를 사용하여, 실온(약 25℃)에서 측정된 바와 같이, 약 500 내지 약 100,000 센티포이즈(cen-
tipoise)의 범위, 바람직하게는 약 1,000 내지 약 30,000 또는 약 1,000 내지 약 10,000 센티포이즈에서 점도를 갖는 조성물을 주기 위해서 각각의 다른 것 및 가교 결합도와 상호관련 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 점도는 약 10 내지 약 400 센티포이즈, 약 10 내지 약 200 센티포이즈 또는 약 10 내지 약 25 센티포이즈이다.
- [0266] 일부 실시형태에서, 수성 중합체 현탁액은 눈에 투여되기 이전과 같은 눈에 동일하거나 실질적으로 동일한 점도를 유지하도록 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들은 눈물액(tear fluid)과의 접촉시 겔화가 일어나도록 배합될 수 있다. 예를 들면, DuraSite® 또는 다른 유사한 폴리아크릴산-유형의 중합체를 포함하는 제제가 약 6.7 미만의 pH에서 눈에 투여될 때, 중합체는 pH가 높기 때문에(약 7) 눈물액과의 접촉시 팽창할 수 있다. 이러한 겔화 또는 겔화의 증가는 부유 입자(suspended particles)의 포획을 초래할 수 있으며, 이로 인해 화합물의 체류 시간이 연장된다. 일부 실시형태에서, 제제는 현탁된 입자가 시간이 지남에 따라 용해되는 것 같이 천천히 방출된다. 일부 실시형태에서, 상기 운반 경로는 환자의 안락함을 증가시키고 안구 조직과 약물 접촉시간을 증가시키므로써, 눈에서 약물 흡수의 정도 및 제제의 작용 기간을 증가시킨다. 이러한 약물 전달 시스템에 포함된 제제는 약물 자체 및 물리적 형태, 즉 존재될 수 있는, 안구 표면과 호환되는 이온교환수지와 같은, 임의의 약물 전달 보조제 상에서뿐만 아니라, 시스템의 약물 로딩(loading)의 정도 및 pH에 관한 것과 같은 요소에 의존하는 속도로 겔에서 방출될 것이다.
- [0267] 일부 실시형태에서, IL-6 길항제는 유전적 운반(genetic delivery), 예를 들면, 국소 유전적 운반(genetic delivery)을 사용하여 개체에게 제공된다. 상기 운반은 블루버드 바이오(Bluebird Bio) (Cambridge, MA)에 의해 제조된 렌티바이러스 운반시스템(lentiviral delivery system), 또는 뉴로테크(Neurotech)(Cumberland, Rhode Island)에 의해 제조된 것과 같은 세포 공장(cell factory)에서 운반과 같은 일시적인 발현 시스템, 안정적인(예를 들어, 통합된(integrated)) 발현 시스템을 경유할 수 있다.
- [0268] 모든 기술적 특징은 상기 특징의 가능한 모든 기능의 조합으로 개별적으로 결합될 수 있다.
- [0269] **등가물(EQUIVALENTS)**
- [0270] 본 발명은 정신 또는 이의 필수적 특성에서 벗어나지 않고 특이적 형태로 구체화될 수 있다. 따라서 앞서 말한 실시형태는 본 명세서에 설명된 발명을 제한하는 것이 아니라 모든면의 예시적인 형태로 고려되어야 한다.
- [0271] **실시예**
- [0272] 하기의 비제한적인 실시예는 본 명세서에 설명된 발명의 실시형태를 추가적으로 설명하는 것이다.
- [0273] **실시예 1: 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization) (CNV) 모델에서 국소 IL-6 차단剂的 검증**
- [0274] 국소 IL-6 차단이 눈 질환 치료, 예를 들면, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema) (DME) 또는 습성황반변성(wet AMD)을 치료하는데 효과적일지를 결정하기 위하여, 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization) 모델 시스템을 사용하여 항-IL-6 항체를 국소적으로 투여하였다. 레이저-유도된 CNV 모델(eyecro.com/in-vivo/laser-induced-choroidal-neovascularization-cnvm/)은 염증 및 혈관신생(angiogenesis)을 포함하는 DME의 기초가 되는 많은 병리학적 과정을 재생산한다. 연구는 아이크로(EyeCRO) (Oklahoma City, OK)의 래트로 수행하였다. 눈 당 3개의 병변(lesions)을 만들기 위해 각각의 군의 6마리의 동물을 0일째에 양측 레이저(bilateral laser) 치료를 시행하였다. 3일째 및 10일째, 3 μ g의 다클론 항-래트-IL-6 항체 (R&D Systems AF506; Minneapolis, MN)를 유리체강내(intravitreal) (IVT) 주입으로 테스트 군에 투여하였고, 반면에 PBS 또는 항-VEGF 다클론 항체 (R&D Systems AF564)를 각각 비히클 및 양성 대조군에 투여하였다. 병변 면적을 측정하기 위하여 생체 내 혈관조영술(angiography)을 15일째 및 22일째에 수행하였다. 15일째 및 22일째 모두에, 항-IL-6 처리 군은 비히클 대조군과 비교하여 현저히 감소된 신혈관형성(neovascularization)을 나타냈다. 항-IL-6 처리 군 및 항-VEGF 양성 대조군 사이의 반응에서 현저한 차이점이 없었다. 도 1은 상기 실험의 결과를 나타낸다. 이러한 데이터는 IL-6a, 예를 들면, 항-IL6 항체가 투여된 IVT가 항-VEGF 양성 대조군과 유사한 수준으로 래트 CNV 모델에서 신혈관 형성을 감소시킬 수 있음을 나타냈다(항-IL-6 대 비히클 대조군에 대하여, 15일째에 $p = 0.0054$ 및 22일째에 $p = 0.0005$).
- [0275] 상기 데이터는 IL-6의 국소 차단이 혈관 누출(vascular leakage), 예를 들어, 황반부종(macular edema)를 포함

하는 질환과 같은 눈 질환을 치료하는데 유용할 수 있음을 나타낸다.

[0276] **실시예 2: 후보 항체 IL-6 길항제**

[0277] 후보 항체 IL-6 길항제는 첫번째로 관여된 면역접종(Immunizations) 과정을 이용하여 개발되었다. 면역접종(Immunizations)은 계약연구기관(contract research organization(CRO))에 의한 발명가의 지시에 따라 수행되었다. 5마리의 BALB/C 마우스에 프로이트 보조제(Freud's adjuvant)를 함유한 1M NaCl을 포함하는 PBS에 80 μ g의 IL-6(R & D Systems, cat # 206-IL / CF, Minneapolis, MN)을 피하주사 하였다. 2개의 부스트(boosts)를 80 μ g 및 50 μ g IL-6으로 수행하였다. 비장(Spleen) 세포를 가장 높은 역가(titer) 마우스로부터 수득하였고 하이브리도마(Hybridomas)를 생성하기 위하여 P3x763Ag8.653 골수종(myeloma) 세포로 융합시켰다.

[0278] 하이브리도마(Hybridoma) 상등액을 IL-6 결합 및 길항작용을 위해 스크리닝하였다. ELISA 결합에 대하여, 코스타(Costar) 9018 플레이트를 4℃에서 하룻밤 동안 1 μ g/ml 인간 IL-6의 PBS로 코팅하였다. 웰을 2% BSA를 포함하는 PBS로 차단하였고 2% BSA를 포함하는 PBS로 1:2 희석된 50 μ l의 각각의 하이브리도마(Hybridoma) 상등액으로 세척한 후 배양하였다. 60 분 후에, 웰을 0.1% 트윈-20을 포함하는 300 μ l의 PBS로 3회 세척하였다. 그런 다음 PBS-BSA에서 1:3000으로 희석된 항-마우스-HRP를 각각의 웰에 첨가하고 30 분동안 배양하였다. 그런 다음 상기에서 세척된 웰에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)) 기질을 첨가하고 450 및 550 nm에서 신호를 측정하였다. 길항작용 연구를 위하여, HEK-Blue™-IL6 리포터 세포 (InvivoGen, San Diego, CA)를 1:10 희석된 하이브리도마(Hybridoma) 상등액의 존재하에서 증가 농도의 인간 IL-6으로 배양하였다. 20-24 시간 후에, 20 μ l의 상등액을 180 μ l의 콰нти블루™(QuantiBlue™)(InvivoGen)으로 혼합하였고 흡광도를 655 nm에서 측정하였다.

[0279] 결합 및 길항작용 연구에 기반하여, 하이브리도마(Hybridoma) 64를 CRO에서 출원인에 의해 시작으로 선별되었고 CRO에서 서브클론하였다. 하이브리도마 64(마우스 단클론)을 효소 결합 면역 흡착법(enzyme-linked immunosorbant assay) (ELISA)을 사용하여 gp130에 IL-6/IL-6R α 복합체의 결합을 억제하기 위한 능력에 대해서 추가적으로 테스트하였다. 1.5 μ g/ml의 농도의 하이브리도마 64는 ELISA의해 고정화된 gp130에 IL-6/IL-6R α 복합체의 결합을 현저히 감소시켰다(도 2).

[0280] 서브클론을 스크리닝하였고 서브클론 64.58의 가변 도메인을 5' RACE PCR로 증폭하였고 서열화하였다. 마우스 가변 도메인 서열(m64로 언급됨)은 하기와 같다:

[0281] m64 VH (가변 중쇄)

[0282] QVQLQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFSNYLIEWVKRPGQGLEWIGVITPGSGTINYNEKFKGKAVLTADKSSSTVYMQLSLTSDDSAVYFCAKSRWD
PLYYYALEYWGQGTSTVTVSS (서열번호13)

[0283]

[0284] m64 VL (가변 경쇄)

[0285] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPKLLIYAASNQSGVDPARFSGSGSGTDFTSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPLTF
GAGTKLELK (서열번호14)

[0286] 인간화된 서열을 만들기 위하여, m64 상보성 결정 영역(m64 complementarity determining regions(CDRs))은 컴퓨터화 알고리즘에 의해 마우스 서열과의 유사성을 위해 선택된 인간 생식 골격(human germline framework)으로 이식되었다. 인간화된 서열 (h64로 언급됨)은 하기(밑줄친 m64 서열과 비교하여 변경된 잔기)와 같고 마우스(murine) 서열과 약 79.5% 일치성 (VH) 및 84.4% 일치성 (VL)을 가진다:

[0287] h64 VH

[0288] QVQLYQSGAEV**V**K**K**PGSSVKVSKASGYAFSNYLIEW**V**R**Q**APGQGLEW**M**GVITPGSGTINY**A**Q**K**F**Q**GRV**T**ITADE**S**T**S**TAY**M**ELSS**L**R**S**ED**T**AVY**Y**C**A**R**S**RWD
PLYYYALEYWGQGT**T**TVTVSS

[0289] (서열번호 15)

[0290] h64VL

[0291] DIV**M**TQSPD**S**LAVSLGERAT**I**NCRA**S**ESVDNYGISFMN**W**YQ**K**PGQPPKLLIYAASNQSGVDP**R**FS**G**SGSGTD**F**TL**T**I**S**SLQ**A**ED**V**AVY**Y**C**Q**QSKEVPLTF
GQGT**K**LE**I**K

- [0292] (서열번호 16)
- [0293] 인간화된 서열을 DNA2.0 (Menlo Park, CA)에 의해 합성하였고, 이후 인간 IgG1 불변 도메인을 갖는 인라인 융합 (inline fusions)으로서 pcDNA3.1-유래 발현 벡터로 클로닝하였다. IgGs를 프리스타일™-293(Freestyle™-293) 세포(Invitrogen, Grand Island, NY)에서 일시적 형질감염에 의해 발현되었고 단백질-A 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 결합 및 길항작용 연구 모두에서, m64 이전의 것과 비교하여 h64 IgG는 효력이 상당히 감소됨을 나타냈다. 따라서, 효모 진열(yeast display)은 잃어버린 친화성을 복원하는데 사용되었다.
- [0294] 인간화된 h64IgG의 친화성을 복원 또는 향상하기 위하여 디자인된 친화성 성숙을 수행하기 위하여, h64 항체 서열을 재클론(reclone)시켜 FabH 사슬이 (G4S)3 링커를 통해 항-FITC scFv 4m5.3에 융합된 pYC2/CT-유래 효모 벡터에서 Fab 분자를 생성시켰다(서열번호 29). 그런 다음 h64 변이체(variant)의 라이브러리를 Chao et al. (2006, Nature Protocols, 1:755-768)의 프로토콜에 따른 오류가 발생하기 쉬운(error prone) PCR로 생성하였다. H64 변이체가 발현되었고 그런 다음 FITC-PEG-NHS로 표지된 효모에 의해 포획된 표면을 비오티인이 부착된 (biotinylated) 인간 IL-6로 배양하였다. 결합된 IL-6을 스트렙타비딘-APC(streptavidin-APC)로 검출하였고, 디스플레이된 Fabs의 양과 비하여 결합된 IL-6의 높은 양을 가진 세포를 BD FACSaria™ 세포 분류기(BD FACSaria™ cell sorter) 상에서 선별하였다. 4 라운드의 선택 후, 더 높은 친화성 변이체의 집단이 선택되었고 서열화되었다. 친화성 성숙(h64-1.4로 언급됨)에 의해 선별된 클론 서열은 볼드체로 선택된 돌연변이 (즉, 돌연변이 및 비교 및 h64 VH 및 VL의 서열과 비교하여 돌연변이됨)와 같고 CDR은 밑줄쳐 있다. 이들은 018의 가변 도메인이다(하기에 설명된 020 및 029 IL-6a 분자뿐만 아니라). 전체 Fabs는 CK 및 IgG1 CH1 도메인을 포함한다는 것을 주목하시오. 본 출원의 문맥에서, “Fab” 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열에 대한 참고는 서열이 경쇄-유래 서열 및 중쇄-유래 서열로 구성된 기능적 Fab의 일부분일 수 있음을 의미한다.
- [0295]
- [0296] h64-1.4 VH (018VH)(가변 도메인)
- [0297] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALS~~NYL~~IEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTIN~~YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR~~SEDTAVYYCARS~~RWDPLYYYALEYWGQGTQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALS~~NYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTIN~~YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR~~SEDTAVYYCARS~~RWDPLYYYALEYWGQGT~~TVTVSS (서열번호 17)
- [0298] h64-1.4 VL (018VL) (가변 도메인)
- [0299] DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVDNYGI~~PFMNWYQKPGQPPKLLIYAASNR~~GSGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQAEDVAVYYCQOSEEV~~PLTFGQGTKLEIKRTV (서열번호 18)
- [0300] h64-1.4 가변 도메인을 pcDNA3.1 인간 IgG1 벡터로 재클론하였고 프리스타일™-HEK293 세포 (Life Technologies)에서 전장 IgG1로 발현시켰다. 결과로 얻어진 정제된 IgG는 모든 결합 및 세포 내 길항작용 연구에서 본래 h64 항체보다 현저히 더 강력하였다. 효모 시스템에서 친화성을 테스트하면 본래의 인간화된 분자는 343pM에서 43pM으로 친화성 증가한다. 길항제 효력은 HEK-블루 세포 시스템을 사용하여 분석된 바와 같이 약 10 배 증가된다.
- [0301] h64-1.4 IgG는 안구 및 다른 지시의 사용에 대한 Fab로서 제포맷하였다. 추가적으로, 라이브러리 생성의 다른 라운드 및 효모가 기반된 선별은 친화성을 추가적으로 향상시키기 위하여 수행되었다. 4번의 선별 후에, A79V 돌연변이를 가진 VH 변이체에 대한 현저한 농축이 생겼다. 항체, 변이체 및 A79V 변이체를 포함하는 이의 단편은 019 IL-6a 항체, 변이체 및 이의 단편으로 언급되었다.
- [0302] **실시예 3: 포맷 선별**
- [0303] 항체-기반된 IL-6 길항제에 대한 적절한 포맷을 조사하기 위하여, 앞서 언급한 바와 같이 선별된 IL-6 항체는 018 서열의 Fab, scFv(VH-VL) 및 scFv(VL-VH) 형태를 사용하여 일시적 발현, 안정성, 응집 속성, 결합 친화성, 및 IC₅₀를 테스트하였다.
- [0304] 후보 IL-6a 분자의 하나에 대한 상기 연구 결과(018 가변영역을 포함하는 서열)를 요약 1에 나타냈다.

표 1

[0305]	파라미터	Fab	scFv(V _H -V _L)	scFv(V _L -V _H)
	일시적 발현	45 mg/ml	2 mg/L	4mg/L

안정성 (T _M)	73℃	43℃	46℃
응집성 (SEC, MALS)	No	Yes	N/A
결합 친화성 (K _D)	240 pM	1 nM	720 pM
10 pM IL-6을 가진 IC ₅₀	255 pM	160 pM	125 pM

[0306] 상기 데이터는 항체-기반된 IL-6 길항제의 다양한 포맷의 핵심 특징을 확인하는 방법을 나타내고, 018 가변영역을 포함하는 IL-6 길항제에 대해서 나타내며, 상기 018Fab 포맷은 scFv 구성과 비교하여 대부분의 핵심 카테고리, 즉, 발현, 안정성, 응집, 및 결합 친화성을 가진다. 018 Fab의 IC₅₀는 치료 용도를 위한 합리적인 범위 내에 있다. **실시예 4: IL-6a 항체, 단편, 및 유도체의 예**

[0307] 출원은 본 명세서에 설명된 방법을 사용하여 하기의 서열을 확인하였다. 밀줄친 서열은 중쇄 및 경쇄의 CDRs를 나타낸다. 다른 서열은 명세서 전반에 걸쳐 발견될 수 있다.

[0308] 018 중쇄 (전장; f1018HC) IgG1 골격의 폴리펩타이드 서열

[0309] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALSNYLIEWVRQAPQGLEWMGVITPGSGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYIALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 19)

[0310] 018 중쇄 (전장; f1018HC) IgG1 골격의 핵산 서열

[0311] CAAGGCGAAAGGTGACCCAGGGAGCCCCAGGTTTATACACTGCCTCCCTCACGCGACGAATTAACAAAGAATCAGGTGTCTCTCACCTGTCTCGTCAAGGGCTTTTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCTGAGAACAAATTATAAGACAACCTCCCCAGTCTGGATTGATGGGTGCTTCTTCTATATAGTAAGTTGACCGTGATAAGTCTCGCTGGCAACAGGGGAACGTGTTCTCTTGTCTGTTATGCATGAAGCGCTGCACAATCATTATACCCAGAA GTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGGAAG(서열번호 20)

[0312] 018 Fab 중쇄 (018FabHC) IgG1 골격의 폴리펩타이드 서열. CDRs는 밀줄쳐져 있다

[0313] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALSNYLIEWVRQAPQGLEWMGVITPGSGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYIALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(서열번호 1)

[0314] 018 전장 경쇄 (f1018LC) 폴리펩타이드 서열. CDRs는 밀줄쳐져 있다

[0315] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD_NYGIPFMNWy QQKPGQPKL LIYAASNRGS_GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL_TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (서열번호 2)

[0316] 또한 이것은 020 및 029 IL-6 길항제에 대한 경쇄 서열이다.

[0317] 018 IgG1 골격의 전장 경쇄 (018LC) 핵산 서열

[0318] GACATAGTGA TGACTCAAAG TCCGGACAGC CTGGCGGTGT CACTCGGCGA ACGGGCAACT ATCAACTGCC GAGCCAGCGA GAGCGTCGAT AATTACGGCA TCCCTTCAT GAACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGACAGCC GCCCAAGCTG CTTATCTACG CCGCTTCCAA CCGGGGATCA GGGGTGCCCC ATCGATTTAG TGGAAGCGGT AGTGGGACCG ATTCACACT GACCATCAGC TCCCTTCAGG CCGAGGATGT GGCTGTCTAT TATTGTCAGC AATCCGAGGA AGTGCCGCTC ACGTTTGCTC AGGGAACCAA ACTGGAGATC AAGCGGACCG TAGCGGCGCC TAGTGTCTTC ATCTTCCAC CCTCCGACGA ACAGCTGAAG TCTGGCACTG CTTCGCTCGT GTGCCTGCTC AACAACTTTT ACCCTAGAGA GGCAAAAGTT CAATGGAAG TAGACAATGC CTTGCAGTCC GGGAACTCCC AGGAGTCTGT CACAGAGCAG GATAGTAAGG ACTCAACCTA CAGCCTGTCC AGCACACTGA CCCTCTCCAA AGCCGACTAC GAGAAGCACA AAGTGTACGC TTGCGAAGTT ACGCATCAGG GGCTGTCTCT ACCCGTTACA AAAAGTTTAA ACAGAGGGGA GTGC (서열번호26)

[0319] 019 Fab 중쇄(019FabHC, A79V(굵은체 글씨/이탤릭체)를 제외한 018FabHC로서 같은 서열)

[0320] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTW MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYIALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ

SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHHK PSNTKVDKKV EPKSC (서열번호 3)

- [0321] 019 VH(가변 영역/019HC)
- [0322] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTW MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SS(서열번호 27)
- [0323] 019 항체 경쇄 (019LC) 서열 (폴리펩타이드 및 핵산)은 018LC와 같다.
- [0324] 018HC의 CDR1 (VH CDR1 018): GYALSNYLIE (서열번호4)
- [0325] 018HC의 CDR2 (VH CDR2 018): VITPGSGTIN (서열번호5)
- [0326] 018HC의 CDR3 (VH CDR3 018): SRWDPLYYYALEY (서열번호6)
- [0328] *018LC의 CDR1 (VL CDR1): RASESDNYGIPFMN (서열번호7)
- [0329] 018LC의 CDR2 (VL CDR2): AASNRGS (서열번호8)
- [0330] 018LC의 CDR3 (VL CDR3): QQSEEVPLT (서열번호9)
- [0331] 019HC의 CDR1 (VH CDR1 019): GYALSNYLIE (서열번호4)
- [0332] 019HC의 CDR2 (VH CDR2 019): VITPGSGTIN (서열번호5)
- [0333] 019HC의 CDR3 (VH CDR3 019): SRWDPLYYYALEY (서열번호6)

[0334] **실시예 5: 항원결정인자 및 구조 맵핑**

[0335] *항원결정인자 맵핑*

[0336] 기능적 항원결정인자 맵핑은 선별된 후보 IL-6 길항제 상에서 수행되었다. 후보 항체 (마우스 64 항체)는 ELISA에서 IL-6에 대한 IL-6R α 의 결합을 감소시켰고 이는 후보 항체가 부위 I에 결합하지 않음을 나타냄을 발견하였다. 추가 실험을 수행하였고 ELISA에서 키메라 마우스 64 항체가 IL-6/IL-6R α 복합체의 gp130과의 결합을 감소시켜 IL-6의 II 부위 또는 III 부위가 항체를 위한 결합 부위를 포함한다는 것을 나타냈다. 또한 마우스 (murine) 64 항체는 IL-6에 대한 부위 III 결합 항체 AH-65 (Immunotech, Marseille, France)의 결합을 현저히 차단하지 않음을 발견하였다. 상기 데이터는 부위 II에 대한 항체가 생성될 수 있고 상기 항체를 확인하는 방법을 나타낸다.

[0337] 항원결정인자를 추가적으로 정의하기 위하여, IL-6의 돌연변이는 4m5.3에 대한 융합체로서 효모에서 생성된다 (Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 10701-10705; Chao et al., 2006, Nat Protoc 1, 755-768). 발현된 돌연변이는 하기의 단일 또는 이중 돌연변이를 가진 인간이었다: R24E/D27E, R30E, Y31E, D34R, S118R/V121E, W157E, Q159E/T162P, K171E, 및 R179E. 발현된 돌연변이된 IL-6 분자는 018 (Fab)을 가진 결합 연구에서 사용되었다. 018 (Fab)의 감소된 친화성은 R24E/K27E, Y31E, D34R, 및 S118R/V121R에서 관찰되었고, 이들 모두는 IL-6의 부위 II에 위치되어 있다. 따라서, 본 명세서에 설명된 본 발명은 인간 IL-6의 24, 27, 31, 34, 118, 및 121 위치의 적어도 하나, 두개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 아미노산 또는 IL-6의 동등한 부위에 결합하는 항체를 포함한다.

[0338] *부위 II 항원결정인자의 구조적 정의*

[0339] 하기의 거리는 구조적으로 부위 II를 정의하기 위하여 계산되었다. 계산은 IL-6/IL-6 α /gp130 6합체 크리스탈 구조(hexameric crystal structure), PDB 1P9M에 기초하였다(Boulanger et al., 2003, Science 300: 2101-2104). IL-6의 헬릭스의 부위 I 및 부위 II 사이에 있고, 그 결과, 부위 II의 근처에 있지만 부위 I, 예를 들면 R30을 향하여 지적되는 부분 사슬이 있는 부위를 지니고 있는 특정 잔기를 가진다. D2 및 D3은 IL-6R α 의 세포 외 도메인을 나타낸다.

[0340] IL-6의 하기의 아미노산은 gp130-D2-D3의 5 Å 내에 있다: L19, R24, K27, Q28, R30, Y31, D34, E110, Q111, R113, A114, M117, S118, V121, Q124, F125, 및 K128.

[0341] 하기의 아미노산은 gp130-D2-D3의 7 Å 내에 있는 것으로 결정되었다: L19, E23, R24, I25, K27, Q28, I29, R30, Y31, D34, K41, Q102, E109, E110, Q111, A112, R113, A114, V115, Q116, M117, S118, K120, V121, L122, Q124, F125, 및 K128.

[0342] 따라서, 부위 II의 5 Å 및 7 Å내에 있는 하나 또는 그 이상의 IL-6 아미노산에 결합할 수 있는 분자, 예를 들면, 항체 또는 이의 단편은 IL-6a일 수 있다.

[0343] 인간 IL-6의 서열은 참고 (미출원 서열은 리더(leader) 서열이다)에 대해 하기를 제공한다. gp130-D2-D3의 7 Å 내의 아미노산은 이탤릭체이다. 항원결정인자를 정의하는데 사용되는 아미노산 숫자, 예를 들면, 돌연변이는, 리더 서열이 없다:

[0344] 인간 IL-6

[0345] MNSFSTSAFGPVAFLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSER/DKQIRYILDGISALRÆETCNKSNMCESSEALAEENLNLPKMAEKDGC
QSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFFESSEQARAVQMSTKVLIQFLQAKAKNLDAITTPDPTNASLLTKLQAQNQWLQDMTHLILRSFKEFLQS
 SLRALRQM (서열번호 21).

[0346] 실험은 h64-1.4 인간화된 항체의 Fab 단편을 테스트하는 것을 수행하였고 표적하는 부위 II에 기인한 시스 및 트랜스 IL-6 신호 모두를 차단할 수 있는 것을 나타낸다. Fab 단편의 효력은 가용성 IL-6 수용체 (sIL-6R)의 존재에서 변하지 않는다. 이것은 sIL6R의 존재에서 감소된 효력을 가지는 항-IL-6R IgG에 반대이고, 이것은 단지 시스(cis) 신호를 차단한다.

[0347] 상기 실험은 부위 II를 표적으로 하는 Fab 단편과 같은 항체의 항체 또는 단편이 IL-6의 시스(cis) 및 트랜스 (trans) 신호 모두를 억제하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0348] **실시예 6: 영장류 연구(Primate studies)**

[0349] 비영장류 활동은 영장류의 활동과 크게 다를 수 있기 때문에, 후보 IL-6 길항제는 비-인간 영장류를 사용하여 PK 및 다른 파라미터에 대해 일반적으로 추가적으로 평가된다. 인간 IL-6는 7개 부위에서 시노몰거스 (cynomolgus) 원숭이 및 레서스(rhesus) 원숭이 IL-6과 상이하고, 이것의 하나는 부위 II (아미노산 28)에 있고 아프리카 녹색(African green) 원숭이 IL-6의 부위 II에서 동일하다. 이것은 018 서열을 포함하는 항체의 결합을 단지 약 3-4 배 감소시키는 것으로 보인다. 비-인간 영장류 IL-6에 대한 결합 능력은 IL-6 길항제의 유용한 특징이고, 예를 들면, 비-인간 영장류에서 독성 테스트와 같은 테스트를 함으로써, 약물로서 후보물질의 개발을 용이하게 한다.

[0350] 대부분의 IL-6 항체와 마찬가지로, 본 명세서에 설명된 항-IL-6 항체는 낮은 서열 상동성(homology)에 기인한 설치류(rodent), 래빗 또는 개과(canine)의 IL-6에 교차 반응하지 않았다. 그러나, 친화성 연구에서, 018 Fab가 대략 인간 친화성을 가지는 시노몰거스(cynomolgus) 원숭이 및 레서스(rhesus) 원숭이 IL-6에 결합하는 것을 발견하였다(표 2).

[0351] 표 2: 다양한 종의 다양한 IL-6에 대한 1가(Monovalent) 친화성 (018 Fab)

표 2

[0352]

종(Species)	K _D
인간	200 pM
아프리카 녹색 원숭이	280 pM
시노몰거스(Cynomolgus) 원숭이	840 pM
개	> 1 μM
마우스	> 1 μM
래빗	> 1 μM
랫트	> 1 μM

[0353] 상기 데이터는 본 명세서에 설명된 바와 같이 IL-6a의 특이적 결합 능력 및 적절한 동물에서, 예를 들면, 독성 및 생식 연구에 대한 테스트를 허용하는 특징을 가지는 분자를 개발하는 능력을 나타낸다. **실시예 7: IL-6a의 발현 증가**

[0354] 018 Fab 및 019 Fab 폴리펩타이드의 발현을 증가시키기 위하여, 구성체(constructs)를 당업계에 알려진 방법을 사용하여 CH1/힌지 영역에서 중쇄에 대해 5 개의 추가 아미노산 (DKTHT (서열번호 30))을 도입하여 만들어진다. 변경된 018Fab 중쇄의 서열은 서열번호 24로서 하기에 나타났다. 변경된 018 서열은 020로서 본 명세서에 언급되었고 변경된 019 서열은 021로서 본 명세서에 언급되었다. 020 분자(020Fab 중쇄 및 018Fab 경쇄)는 018Fab 중쇄 및 018Fab 경쇄를 가진 부모 Fab와 비교하여 향상된 발현을 가진다. 019 분자는 020 분자와 비교하여 현재

한 친화성을 나타내지 않는다. 모든 020 및 019의 발현은 각각, 약 2배 증가되었고, 친화성은 변경(alteration)에 의해 영향을 받지 않는다.

[0355] 020 중쇄 (카르복시 말단(carboxy terminus)에서 DKHT (서열번호 30)을 갖는 Fab)

[0356] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS WDPLYYYALE YWQGTTTVT SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (서열번호 24)

[0357] 020Fab을 사용하여 IL-6 길항작용을 HEK-블루™ IL-6 리포터 세포 (InvivoGen, San Diego, CA)에서 측정하였다. 세포를 10 pM IL-6의 혼합물 및 50 nM IL-6Rα가 있거나 없는, 020 또는 IL-6Rα 항체(Cell Sciences, Canton, MA)의 다양한 농도에서 배양하였다. 배양 20-24 시간 후에, 20 μl의 세포 배양 상등액을 180 μl의 QuantiBlue™ (InvivoGen) 기질로 혼합하였고 1시간 동안 배양하였다; 흡광도를 655 nm에서 측정하였다. 도 3A 및 도 3B는 상기 실험으로부터의 데이터를 나타내고, IL-6R의 존재 또는 부재에서 IL-6 활성을 억제하는 020의 능력을 나타낸다.

[0358] **실시예 8: IgG2 IL-6 항체**

[0359] 018을 당업계에 알려진 방법을 사용하여 IgG1으로 포맷된 항체와 비교하여 FcγR 결합이 감소하고 ADCC가 감소된 인간 IgG2 동형(isotype) 골격으로 재포맷되었다. 추가적으로, 018을 전장 형식, 예를 들면, IgG2로 재구성하는 것은 분자의 더 큰 크기에 기인하여 유리체로부터 제거의 속도를 감소시킬 것으로 기대된다.

[0360] 항-IL6 IgG2 항체의 제조/정제

[0361] 상기 설명된 항-IL-6 서열을 사용하여 인간 IgG2 항체를 제조하기 위하여, 인간 IgG2 불변 도메인을 각각 N- 및 C-말단 끝에 NheI 및 MluI 제한 부위(restriction site)를 가지는 cDNA로부터 PCR증폭하였다. PCR 생성물을 정제하였고, NheI 및 MluI 제한 효소로 절단(digested)시킨 후, 항-IL6 가변 도메인, 즉, 서열번호 1(상기를 참조하시오)을 포함하는 pTT5 벡터로 결합시켰다(ligated). 이것은 전장 IgG2 중쇄 서열을 산출하였다. 018 서열을 포함하는 전장 경쇄를 포함하는 플라스미드를 경쇄를 제공하기 위하여 사용하였다.

[0362] 추가적으로 FcRn 결합을 감소시키고 따라서 IL-6a의 재생을 감소시키기 위하여, 점 돌연변이(point mutation)를 중쇄에서 만들었다. 돌연변이를 QuikChange® 돌연변이유발(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)로 만들었다. 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 폴리(에틸렌이민)(poly(ethylenimine))(PEI)를 사용하여 100 ml 일시적 배양의 HEK293-6E 세포로 공동-형질감염시켰고 약 5일 동안 발현을 허용하도록 배양하였다. 이것은 항-IL-6 부위 II 결합 절반(moiety) 및 IgG2 구조를 포함하는 항체를 생성하였다. 018 CDRs을 포함하는 상기 구조를 본 명세서에서 018IgG2 또는 029로 명명하였다. 점 돌연변이를 잔기 I253에서 만들었다.

[0363] IgG2 분자는 잘 발현되었고 020Fab와 비교하여 세포 내 분석에서 약하게 향상된 효력을 가진 IL-6을 차단하였다.

[0364] 029 성숙 서열 (밑줄친 CDRs)

[0365] *029 중쇄*

[0366] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS WDPLYYYALE YWQGTTTVT SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTIVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 11)

[0367] *029 경쇄*

[0368] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMWY QKPGQPPL LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (서열번호 12)

[0369] 변경된 FcRn 결합

[0370] IL-6은 특정한 양성 전신성 효과를 가질 수 있다. 따라서 유리체에서 좋은 유지성을 가지지만 제한된 전신성 반

감기를 가진 IL-6a를 조작하는데 장점을 가진다. FcRn 결합의 감소 또는 제거가 순환기(circulation)로 빠져나가는 임의 약물의 전신성 축적을 전신성 축적을 감소시키므로, IL-6a의 안정성을 향상시킨다.

[0371] 따라서, FcRn 매개된 수송(trafficking)이 눈으로부터 항체의 유출(efflux)을 증가시킬 수 있기 때문에, 020 IgG2를 Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001))에 따른 잔기 I254, H311, 또는 H436 (서열번호 23을 참조) 번호 매김에서 Fc 돌연변이를 도입시켜 FcRn 결합을 제거하기 위하여 추가적으로 수정하였다. 돌연변이된 부위를 서열번호 23에서 볼드체로 나타냈다; I254는 A 또는 R로 돌연변이되었고, H311은 A 또는 E로 돌연변이되었고, H311은 D 313이 T로 돌연변이되는 것과 함께 H311은 N으로 돌연변이되었으며, H436은 A로 돌연변이되었다(서열번호 23에서 밑줄친, 리더 서열 후에 번호 매김 으로 시작함). 상기 서열을 포함하는 IL-6 길항제는 018IgG2m으로 명명되었다.

[0372] 돌연변이 부위 (볼드체)를 나타내는 항-IL-6 중쇄 (IgG2) (일반 서체: VH; 이탤릭 서체: CH) (리더 서열없이)

[0373] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 23)

[0374] 돌연변이 부위 (볼드체)를 나타내는 리더 서열 (밑줄친)을 가진 항-IL-6 중쇄 (IgG2) (일반 서체: VH; 이탤릭 서체: CH)

[0375] MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 28)

[0376] 따라서, 일부 실시형태는 H311이 N으로 돌연변이된 것과 함께 I254 (예를 들면, A 또는 R), H311 (A 또는 E로 돌연변이된), H436 (A로 돌연변이된), 또는 D313 (T로 돌연변이된)에서 돌연변이를 가진 서열번호 23에서 묘사된 중쇄 서열을 가지는 항체를 포함한다.

[0377] 따라서 서열번호 25는 H190(예를 들면, H190N와 함께 D192T)과 함께 I133 (예를 들면, I133A 또는 I133R), H190 (예를 들면, H190A 또는 H190E), H315 (예를 들면, H315A), 또는 D192에서 돌연변이되었을 때, 서열을 포함하지 않는 부모 또는 다른 참고 분자와 비교하여 감소된 전신성 반감기를 가지는 폴리펩타이드 및/또는 낮은 pH, 예를 들면, pH 5.5 또는 라이소좀(lysosomal) pH에서 감소된 Fc 결합을 가지는 폴리펩타이드를 생성하기 위하여 항체, 단편, 또는 이의 유도체에서 사용될 수 있는 서열을 제공한다.

[0378] SASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 25)

[0379] 항-IL-6 경쇄 (IgG2) (일반 서체: VK; 이탤릭 서체: CK)

[0380] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTF GQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (서열번호 22)

[0381] 실시예 9: 제제 안정성

[0382] 항-IL-6/IgG1 Fab 단편(IgG1CH1 도메인을 포함하는)의 안정성을 초기에는 PBS에서 그런 다음 시차 주사 형광 측정법(differential scanning fluorimetry)을 사용하여 완충제(buffers) 및 부형제의 범위에서 T_m을 결정하여 테스트하였다. 시트레이트 버퍼(citrate buffer), pH 5.5가 T_m을 80°C 이상으로 증가시킨다는 것을 발견하였다.

[0383] 응집을 SEC-MALS을 사용하여 테스트하였고 인산염완충식염수(phosphate buffered saline (PBS))의 20 mg/ml에

서 응집이 관찰되지 않았다.

[0384] **실시예 10: 증강된 PK에 대한 pH 민감한 항체**

[0385] IL-6는 특정한 양성 전신성 효과를 가질 수 있다. 따라서 유리체에서 좋은 유지성을 가지나 제한된 전신성 반감기를 가진 IL-6a를 조작하기 위하여 장점이 있다. FcRn 결합의 감소 또는 제거가 순환기(circulation)로 빠져나가는 임의 약물의 전신성 축적을 전신성 축적을 감소시키므로, IL-6a의 안정성을 향상시킨다. 따라서, FcRn 매개된 수송(trafficking)이 눈으로부터 항체의 유출(efflux)을 증가시킬 수 있기 때문에, 020 IgG2를 I253, H310, 또는 H435 (Martin et al. (Molecular Cell, 7:4,867-877 (2001)에 따른 번호 매김))의 잔기에서 Fc 돌연변이를 도입함으로써 FcRn 결합을 제거하기 위하여 추가적으로 수정되었다. 상기 항체는 본 명세서에서 IL-6pH 항체 또는 항-IL-6pH로서 언급되었고 하기에 추가적으로 설명되었다.

[0386] **pH 민감한 결합을 가진 항체의 생성**

[0387] 히스티딘의 pKa는 약 6.0이고 결합 경계면에서 삽입된 히스티딘은 낮은 pH에서 측쇄 양성자 첨가(side-chain protonation)에 따른 결합을 방해할 수 있다. 본 명세서에 설명된 바와 같이 항-IL-6 부위 II가 표적된 항체를 사용하여 018로부터 CDRs의 히스티딘-풍부 변이체를 포함하는 라이브러리를 생성하였고 라이브러리를 효모 디스플레이를 사용하여 pH-민감한 결합에 대하여 스크리닝하였다. 생성된 라이브러리는 각각의 잔기가 야생형 잔기(즉, 부모 항체로서 똑같은) 또는 히스티딘 잔기와 같은 코돈을 생성하여 암호화된 CDRs를 갖는 결합 라이브러리(combinatorial library)이었다. 스크리닝을 생리학적 pH (7.4)에서 높은 결합 및 엔도솜(endosomal) pH (5.5)에서 낮은 결합에 대하여 교번 정렬(alternating sorting)하여 수행하였다.

[0388] 효모-선별된 돌연변이체는 pH 7.4에서 상대적으로 높은 결합(부모 분자에 대한 192 pM와 비교하여 돌연변이체에 대한 407 pM의 1가(monovalent) Kd) 및 pH 5.5 (부모에 대한 195 pM와 비교하여 돌연변이체에 대한 2.362 nM의 1가 Kd)에서 상대적으로 낮은 결합을 가지는 것을 확인하였다. 이것은 pH 5.5의 친화성에서 대략 5.8 배 변화를 구성한다. 상기 돌연변이체는 경쇄 CDR1에서 다수의 히스티딘 돌연변이를 포함한다. 따라서, 돌연변이체는 pH 7.4에서 부모 분자에 대한 유사한 결합 및 pH 5.5에서 친화성의 현저한 손실을 나타냈다. 상기 관찰은 당업계에 알려진 방법으로 ELISA, FACS, 및 SPR 분석을 사용하여 증명되었다.

[0389] 상기 데이터는 항체에 기반된 IL-6a가 IL-6의 시스 및 트랜스 활성 모두를 억제하는데 사용될 수 있는 IL-6의 부위 II를 표적하는 항-IL-6의 특징을 갖는 것으로 만들어 질 수 있고, pH 5.5에서 변형된 결합으로 적어도 부분적으로 영향을 받은 야생형 Fc 도메인을 갖는 부모 항체 또는 다른 항체와 비교하여 증가된 PK를 가지는 것을 나타낸다.

[0390] **실시예 11: 마우스 레이저 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization) (CNV) 모델에서 국소 IL-6 차단 효과**

[0391] 국소 IL-6 차단이 눈 질환, 예를 들면, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema) (DME) 또는 습성황반변성(wet AMD)을 치료하는데 효과적일 수 있는지를 결정하기 위하여, 단클론 항-IL-6 항체를 맥락막혈관신생(choroidal neovascularization)을 위한 모델 시스템에 국소적으로 투여하였다. Saishin et al. Journal of Cellular Physiology, 195:241-248 (2003)에 설명된 바와 같이 레이저-유도된 CNV 모델을 이번 실시예에서 수행하였다. 레이저-유도된 CNV 모델은 염증 및 혈관신생(angiogenesis)을 포함하는, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema) (DME)하의 많은 병리학적 과정을 재생성한다.

[0392] 단클론 항-마우스 IL-6 항체(Bio X Cell, 카탈로그 번호 BE0046로부터 구입한 래트 IgG1 동형(isotype) 항체인, MP5-20F3)를 유리체내(intravitreal)(IVT) 주입으로 테스트 군에 투여하였다. 대조군은 VEGF 트랩(trap)의 유리체내 주사 또는 항-HRP 동형(isotype) 대조군 항체 (BioXCell; 카탈로그 번호 BE0088로부터 구입한, 호스래디쉬 퍼옥시다제에 대한 래트 IgG1, 클론 HRPN)의 유리체내 주사를 투여받았다. 모든 항체 군에 대하여, 1 μ l 부피의 20 μ g의 단백질을 테스트 눈으로 주입한 반면, 반대쪽 눈(contralateral eye)은 추가 대조군으로서 치료하지 않고 남겨 두었다.

[0393] 레이저 후 7일째에 마우스를 안락사시켰고 병변면적을 측정하기 위하여 맥락막 평평한 장착(choroidal flat mount)을 그리포니아 심플리시폴리아 렉틴(Griffonia simplicifolia (GSA) lectin)으로 염색하였다. 도 4는 결과를 나타낸다. 항-IL-6 항체로 처리된 군은 대조군 항체 처리된 군과 비교하여 신혈관형성(neovascularization)에서 통계적으로 현저한 감소를 나타냈다(p<0.05). 평균적으로 항-IL-6 항체로 처리된 군은 항-VEGF 양성 대조군과 비교하여 감소된 신혈관형성을 나타냈다.

- [0394] 상기 데이타는 IL-6a, 예를 들면, 단클론 항-IL-6 항체가 투여된 IVT가 마우스 CNV 모델에서 신혈관형성을 현저히 감소시킬 수 있음을 나타낸다. 추가적으로 상기 결과는 항-IL-6 항체가 신혈관형성에서 항-VEGF 항원보다 적어도 크게, 가능한 더 크게 감소를 생성할 수 있음을 제안한다. 상기 데이타는 IL-6의 국소 억제제가 혈관 누출(vascular leakage), 예를 들면, 습성황반변성(wet AMD) 또는 황반부종(macular edema), 예를 들면, 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema)을 포함하는 질환과 같은 눈 질환을 치료하는데 유용하다.
- [0395] **실시예 12: 향상된 IL-6 항체의 개발**
- [0396] EBI-029 항체의 변이체(Variants)를 생성하였다. 돌연변이 A28V, S30P, I51T, 및 S55G의 기여를 보다 잘 특성화하기 위해, 특이적 조합을 야생형 EBI-029 Fab 디스플레이 벡터로 도입하였고 결합을 측정하였다. 결과를 도 5에 나타냈다. 2 μ m IL-6으로 하룻밤 동안 경쟁한 후, 모든 돌연변이체는 야생형 EBI-029 Fab와 비교하여 디스플레이에 관하여 세포 표면에 남아있는 현저히 높은 수준의 바이오틴화된(biotinylated) IL-6의 수준을 가졌다. 가장 높은 친화성에서 가장 낮은 친화성 결합의 순위는 A28V/S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > I51T/S55G > wt이었다. 또한 4개(quadruple) 돌연변이 A28V/S30P/I51T/S55G는 본 명세서에서 EBI-030로서 언급된다.
- [0397] EBI-030 서열을 하기에 나타냈다.
- [0398]
- [0399] 030 CDR 서열:
- [0400] 030HC의 CDR1 (VH CDR1 030): GYVLPNYLIE (서열번호 31)
- [0401] 030HC의 CDR2 (VH CDR2 030): VTTPGGGTIN (서열번호 32)
- [0402] 030HC의 CDR3 (VH CDR3 030): SRWDPLYYYALEY (서열번호 33)
- [0403] 030LC의 CDR1 (VL CDR1 030): RASESVDNYGIPFMN (서열번호 34)
- [0404] 030LC의 CDR2 (VL CDR2 030): AASNRGS (서열번호 35)
- [0405] 030LC의 CDR3 (VL CDR3 030): QQSEEVPLT (서열번호 36)
- [0406] 030 중쇄 가변영역 서열 (029에 관한 돌연변이를 볼드체로 나타냈다):
- [0407] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV **TTPGGGTIN**Y AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR **WDPLYYYALE** YWGQGTITVTV SS (서열번호 37)
- [0408] 030 경쇄 가변영역 서열:
- [0409] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWKYQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTF GQGTKLEIKRTV (서열번호 38)
- [0410] 030 Fab (IgG1) 중쇄 폴리펩타이드 서열 (밀줄친 CDRs, 029에 관한 돌연변이를 볼드체로 나타냈다):
- [0411] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV **TTPGGGTIN**Y AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR **WDPLYYYALE** YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (서열번호 39)
- [0412] 실시형태에서, 서열번호 39의 카르복시 말단의 DKTHT 서열 (서열번호 30)은 Fab 서열에 포함되지 않는다.
- [0413] 030 Fab 중쇄 핵산 서열:
- [0414] CAAGTGCAGTGGTGCAGTCAGGGGCCAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATC GAATGGGTGAGGCAGGCTCCCGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCCAGAAATTCAGGGACGAGTG ACGATTACCGCCGACGAGTCCACAGTACTGCCTACATGGAGCTGTCTCACTCCGAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGAGTCGATGGGAC CCTCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCATCTGCTAGCACAAAAGGACCATCAGTCTTCCACTTGCTCTCTCA TCTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGGCTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGAACTCCGGTGCAGTGCATCC GGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCTGTCTTCGGTGGTCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATT TGCAACGTCAATCACAAGCCCTCCAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACACA (서열번호 40)
- [0415] 또한 030은 IgG2 Fab 중쇄 폴리펩타이드 서열로서 도입될 수 있다:

[0416] QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRD
PLYYALEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYT
CNVDHKPSNTKVDKTVK (서열번호 54)

[0417] **실시예 13: 변이체(variant) Fab 단편의 발현 및 정제**

[0418] 하기의 돌연변이체 조합을 포함하는 VH 도메인 삽입체, A28V/I51T/S55G, S30P/I51T/S55G, 및 A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030)를 BamHI-HF/NheI-HF으로 이중 절단(double digest)하여 효모 디스플레이 벡터로부터 생성하였다. 삽입체를 1% 아가로우즈 겔 전기영동으로 정제하고 리더 서열, 인간 IgG1 CH1 도메인, 및 C-말단 His 태그를 포함하는 pTT5 유래 포유류 발현 벡터로 결합시켰다(ligated). 형질전환체를 LB-Am 상에서 선별하였고, 미니프렙(miniprep)하였고, 삽입물을 시퀀싱(sequencing)으로 확인하였다. 형질감염 시약으로서 PEI를 사용하여 야생형 EBI-029 경쇄(서열번호 12로서 본 명세서에 개시됨)로 쌍을 이룬 각각의 돌연변이체 Fab 중쇄에 대하여 HEK-6E 세포(Canadian Research Council)에서 일시적 형질감염을 수행하였다. 또한 야생형 EBI-029 Fab를 대조군(야생형 Fab 중쇄는 서열번호 24로서 본 명세서에 개시됨)으로서 나타냈다. 상등액을 5일 후에 수득하였고 발현된 Fabs를 Ni-NTA 아가로우즈(Life Technologies)를 사용하여 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 단백질을 몇 차례의 농축/희석(concentration/dilution)으로 PBS, pH 7.4로 완충교환(buffer exchanged) 하였고 단백질 농도 및 순도를 흡광도 280 및 SDS-PAGE로 결정하였다.

[0419] **실시예 14: 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 평가된 바와 같이 변이체(variant) 항체는 향상된 결합을 나타냄**

[0420] IL-6에 대한 변이체(variant) 029 Fab 분자의 친화성을 레이처트 SR7000Dc 분광기(Reichert SR7000Dc Spectrometer)에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR)로 측정하였다. 10 mM 소듐 아세테이트, pH 4.5에 있는 20 µg/ml의 인간 IL-6을 표준 아민 커플링(standard amine coupling)을 경유하여 500-kDa 카르복시메틸 덱스트란 칩(carboxymethyl dextran chip)에 고정하였다. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.3에 있는 각각의 Fab 분자의 계열 희석(Serial dilutions)을 25 µl/분 유동률(flow rate)로 25°C에서 주입하였다. 4 분후에, 로딩(loading)을 멈추었고 해리(dissociation)를 5분 동안 러닝 버퍼(running buffer)(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.3)로 측정하였다. 센소그램 트래이스는 잠재적으로 칩 또는 비특이적 항체 결합 상의 IL-6의 혼합 된 방향으로 인하여, 1:1 결합 모델에 잘 맞지 않는다. 대신에, 커브는, ka1, kd1 및 KD1은 저(low) 친화성 종에 대한 결합율(association rate), 해리율(dissociation rate) 및 평형 결합 상수(equilibrium binding constant)이고, ka2, kd2 및 KD2은 고(high)친화성 종에 대한 결합율, 해리율 및 평형 결합 상수를 나타내는 트래이스드로워 소프트웨어(TraceDrawer software)의 사용에 적절한 2 종(표 3에 "저친화성" 및 "고친 화성"으로 표시된, 저친화성 및 고친화성 종)에 적합하다. 모든 돌연변이체 Fabs는 wt EBI-029 Fab와 비교하여 하기의 높은 친화성으로부터 낮은 친화성의 순위로 현저히 더 낮은 해리(dissociation)를 가진다- A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > WT (EBI-029).

[0421] [표 3] 돌연변이체 항체에 대한 SPR 결과

Fab	ka1 (*e ⁴)	kd1 (*e ⁴)	KD1 (nM)	ka2 (*e ⁵)	kd2 (*e ⁴)	KD2 (nM)
WT	5.48	6.08	11.1	2.94	4.27	1.45
A28V/I51T/S55G	8.06	2.91	3.6	3.65	1.45	0.40
S30P/I51T/S55G	7.18	2.18	3.04	3.29	0.95	0.29
A28V/S30P/I51T/S55G	7.95	2.70	3.39	3.25	0.66	0.20

고친화성
저친화성

[0422]

[0423] **실시예 15: 변이체(variant) 항체는 HEK-Blue™ IL6 리포터 세포에서 향상된 길항제 효력을 나타냄**

[0424] HEK-Blue™ IL6 리포터 세포주(Invivogen)는 상이한 돌연변이체 EBI-029 Fab 단편 사이의 IL6 신호 억제체의 효과와 비교하여 사용된다. HEK-Blue™ IL6 세포는 IL-6R 유전자를 안정적으로 발현하고 4개의 STAT3 결합 부위에 융합된 IFN β 최소 프로모터의 조절하에서 방출된 알카린 포스파타제 리포터를 안정적으로 포함하는 수정된 HEK293 세포주이다. IL6 길항작용을 측정하기 위하여, 10 μ l의 400 pM 인간 IL-6 (R&D Systems 206-IL-010/CF)을 96 웰 플레이트의 농도 범위로 각각의 Fab 변이체의 10 μ l와 혼합하였고 30 분 동안 RT에서 배양하였다. 대수 증식기(log phase)의 HEK-Blue™ IL6 세포를 트립신화하고 분석 배지 (DMEM, 4.5 g/l 글루코스, 10% 열처리 비활성된 FBS, 2 mM L-글루타민, 펜-스텝(Pen-Step))에서 280,000 세포/ml로 재현탁하였다. 180 μ l의 세포 현탁액을 각각의 웰의 IL-6/Fab 혼합물에 첨가하였고 최종 IL-6 농도를 20 pM로 만들었다. 세포를 20 시간 동안 37°C/5% CO₂에서 배양하였다. 그런 다음 각각의 웰로부터의 20 μ l의 상등액을 180 μ l의 콰티-블루™ 시약(Quanti-Blue™ reagent)(Invivogen)으로 혼합하였고 스펙트라맥스 M5 플레이트 리더(SpectraMax M5 plate reader)에서 650 nm의 흡광도를 측정하기 전에 40분 동안 37°C에서 배양하였다. 분획 신호 값을 유도하기 위하여 IL-6가 없는 웰의 백그라운드 신호를 차감(subtracted)한 후 억제체가 없는 IL-6가 처리된 세포로 나누었다(divided by). 모든 돌연변이체는 wt EBI-029 Fab와 비교하여 하기와 같은 길항제 효력의 순위로 현저한 더 큰 효력을 나타냈다: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > WT (EBI-029). 상기 결과를 도 6에 나타냈다.

[0425] **실시예 16: 변이체 항체는 T1165 증식 분석에서 향상된 길항제 효력을 나타냄**

[0426] T1165.85.2.1 세포 (R&D Systems)는 마우스, 래트, 또는 인간 IL-6에 대해 반응하여 증식하는 마우스 형질 세포 종 세포주(murine plasmacytoma cell line)이다. EBI-029 Fab 돌연변이체로부터 길항작용을 측정하기 위하여, 25 μ l의 2 ng/ml 인간 IL-6 (R&D 시스템 206-IL-010/CF)을 96 웰 플레이트의 농도의 범위로 25 μ l의 각각의 Fab 변이체와 혼합하였고 30 분 동안 RT에서 배양하였다. 대수 증식기(log phase)의 T1165 세포를 펠렛화하고 분석 배지(90% RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 펜-스텝(Pen-Step))에서 2x10⁵ 세포/ml로 재현탁하였다. 50 μ l의 세포 현탁액을 각각의 웰의 IL-6/Fab 혼합물로 첨가하였고 최종 IL-6 농도를 0.5 ng/ml로 가져왔다. 세포를 72 시간 동안 37°C/5% CO₂에서 배양하였다. 세포-역가 글로® 시약(Cell-Titer Glo® reagent)(Promega)을 각각의 웰에 첨가하였고 10 분 동안 RT에서 배양하였다. 루미네스스(luminescence)를 스펙트라맥스 M5 플레이트 리더(SpectraMax M5 plate reader)에서 측정하였다. 모든 돌연변이체는 wt EBI-029 Fab와 비교하여 테스트된 Fab 농도의 범위에 걸쳐 측정 가능한 IL-6 신호 없는 것과 함께 현저한 더 큰 효력을 나타냈다(도 7 참조).

[0427] **실시예 17: 변이체 항체의 약물 성질 비교**

[0428] 각각의 Fab 변이체의 열 안정성(Thermal stability)을 시차 주사 형광 측정법(differential scanning fluorimetry(DSF))으로 결정하였다. 2.5 또는 5 mg/ml의 2 μ l의 단백질을 바이오래드(BioRad) 96 웰 플레이트에서 8 μ l PBS 및 2 μ l의 50x 스피로 오렌지(Sypro Orange)로 혼합하였다. 플레이트를 25°C 및 95°C로 증가하는 선형 온도를 갖는 바이오래드 CFX96 RT-PCR 시스템에서 수행하였고 형광을 시간에 걸쳐 수행하였다. T_m은 용융 곡선(melt curve)의 첫번째 유도체의 가장 낮은 점으로 계산되었다. 변이체는 76°C의 wt EBI-029 Fab의 측정된 T_m과 일치하는, 76 및 78°C 사이의 측정된 T_m 값을 가졌다.

[0429] 응집을 측정하기 위하여, 시료를 AWatt miniDawn TREOS 광산란 기구 및 Wyatt Optilab rEX 굴절률 기구를 결합한 Agilent 1260 HPLC를 SEC-MALS로 평가하였다. 20 - 100 μ g의 단백질을 주입하였고 1 ml/분의 유동률에서 수행하였다. 모든 변이체는 야생형 EBI-029 Fab와 일치하는, 광산란(light scattering)에 의해 측정된 바와 같이 45000 및 52000 Da 사이의 분자량을 가진다. 상기 결과는 EBI-030이 약물과 같은 성질의 측면에서 EBI-029와 비교하여 매우 유사하게 행동함을 나타낸다.

[0430] **실시예 18: 전장 EBI-029 및 EBI-030 IgG2 항체 및 돌연변이체 Fc 도메인을 가진 IgG2 항체의 생성**

[0431] IgG2 및 돌연변이체 Fc IgG2에 대한 EBI-029 및 EBI-030의 재포맷팅(Reformatting)

[0432] 리더 서열(MDWTWRILFLVAAATGAHS; 서열번호 49)을 포함하는 EBI-029 및 EBI-030의 중쇄 가변 도메인을 N-말단 EcoRI 부위 및 C-말단 NheI 부위에 도입된 프라이머를 사용하여 Fab 벡터로부터 PCR 증폭하였다. PCR 생성물을

1% 아가로우즈 겔에서 정제하였고 EcoRI-HF & NheI-HF으로 이중 절단(double digested)하였다. 야생형 IgG2 중쇄 서열 또는 H311A 돌연변이(서열번호 41의 번호 매김에 해당하는 H311; 이것은 Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)에서 제공되는 번호 매김에서 H310에 해당함)를 가진 변이체(variant) IgG2 도메인을 포함하는 pTT5가 기반된 벡터를 EcoRI-FH/NheI-HF로 유사하게 절단하였고 1% 아가로우즈 겔 상에서 정제하였다. 삽입체를 퀵라이게이즈 효소(Quikligase enzyme)(New England Biolabs)를 사용하여 절단된 벡본(backbone)으로 결합시켰고, TOP10 세포 (Life Technologies)에서 형질전환시켰고, LB-Amp 상에서 선별하였다. 클론들을 미니프랩하였고 삽입체를 확인하기 위하여 시퀀싱하였다. H311A 돌연변이를 안구 조직으로부터 탈출하는 분자의 전신성 축적을 감소하기 위하여 FcRn에 대한 Fc 결합 친화성을 감소시키기 위하여 선별하였다.

[0433] 일시적 형질감염에 의한 IgG2 변이체의 발현 및 정제

[0434] EBI-029 IgG2, EBI-029 IgG2-H311A, EBI-030 IgG2, 및 EBI-030 IgG2-H311A를 HEK-6E 세포에서 일시적 형질감염으로 발현시켰다. 각각의 중쇄를 포함하는 pTT5 벡터를 형질감염 시약으로서 PEI를 사용하여 EBI-029 LC 플라스미드와 함께 공동형질감염시켰다. 상등액을 5 일후에 수득하였고 발현된 IgG2 분자를 단백질-A 아가로우즈를 사용하여 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 단백질을 몇차례의 농축/희석(concentration/dilution)으로 PBS, pH 7.4로 버퍼 교환하였고 단백질 농도 및 순도를 흡광도 280 및 SDS-PAGE로 결정하였다.

[0435] CHO 안정적 풀(CHO stable pool) 생성

[0436] EBI-029 IgG2, EBI-030 IgG2, 또는 EBI-030 IgG2-H311A를 생성하는 안정적 CHO 풀을 제조사의 지침에 따른 프리덤 CHO-S 키트(Freedom CHO-S kit)(Life Technologies)를 사용하여 생성하였다. 간단히 말하면, 각각의 중쇄를 표준 절단/결합에 의해 EBI-029 LC와 혼합하여 pCHO 1.0 벡터로 클론하였다. 구성물(Constructs)을 프리스타일 맥스 시약(Freestyle MAX reagent)을 사용하여 CHO-S 세포로 형질감염시켰고 안정적 풀을 증가하는 농도 및 MTX로 선별하였다. 2차례의 선별 후에, 항체 생성을 위하여 분석적 단백질-A 크로마토그래피로 풀을 스크리닝하였고 가장 높은 생성물이 스케일 업(scale-up) 및 서브클로닝(subcloning)을 위해 선택되었다.

[0437] 서열을 하기에 나타낸다.

[0438] 030 중쇄 폴리펩타이드 서열 (IgG2 골격에서, 밑줄친 CDRs):

[0439] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVVYCARSR WDPLYYYALE YWQGQTTTVT SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSTIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 41)

[0440] 030 경쇄 폴리펩타이드 서열 (IgG2 골격에서, 밑줄친 CDRs):

[0441] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWK QKPGQPPKL LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHVKYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (서열번호 42)

[0442] 030 중쇄 핵산 서열:

[0443] GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG CGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA 서열번호 43

[0444] 030 경쇄 핵산 서열:

[0445] GACATAGTGATGACTCAAAGTCCGACAGCCTGGCGGTGCTACTCGGCGAACGGGCAACTATCAACTGCCGAGCCAGCGAGAGCGTCGATAATTACGGCATC CCCTTCATGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGCCGCCAAGCTGCTTATCTACGCCGCTTCCAACCGGGATCAGGGGTGCCGATCGATTTAGTGGAGCGGTAGTGGACCGATTTCACACTGACCATCAGTCCCTTCAGGCCGAGGATGTGGCTGTCTATTATTGTACAGCAATCCGAGGAAGTCCGCTCACGTTT GGTACAGGAACCAAACTGGAGATCAAGCGGACCGTAGCGGCGCTAGTGTCTTCATCTTCCACCTCCGACGAACAGCTGAAGTCTGGCACTGCTTCCGTC GTGTGCTGTCTAACAACTTTTACCCTAGAGAGGCAAAAGTTCAATGGAAGTAGACAATGCCTTGACAGTCCGGGAATCCAGGAGTCTGTACAGAGCAG GATAGTAAGGACTCAACCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACCTCTCCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGCGAAGTTACGCATCAGGGG

CTGTCTCACCCGTTACAAAAAGTTTAAACAGAGGGGAGTGC 서열번호 44

[0446] 030 H311A 돌연변이를 가진 중쇄 폴리펩타이드 서열(311A는 볼드체이고 CDRs 밑줄이 있음)은, 또한 본 명세서에서 **031** 중쇄 폴리펩타이드 서열로서 언급됨:

[0447] QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TPPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWQGTTTVT SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVNDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSTIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열번호 47)

[0448] 031 중쇄 핵산 서열:

[0449] GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (서열번호 48)

[0450] **실시예 19: HEK-Blue-IL6분석에서 EBI-030 대 EBI-029 IgG2 효력의 비교**

[0451] HEK-Blue™ IL6 리포터 세포주(Invivogen)를 EBI-029와 EBI-030 IgG2 항체 사이의 IL6 신호 억제 효력을 비교 하는데 사용하였다. HEK-6E 세포로부터 정제된 3개의 단백질 프래그먼트를 비교하였다-안정적 CHO 풀에서 생성된 EBI-030 IgG2의 조제와 함께, EBI-029 IgG2, EBI-030 IgG2, 및 EBI-030 IgG2-H311A (또한 031 또는 EBI-031로서 언급됨). 추가적으로, 토실리주마브(Tocilizumab), 승인된 항-IL6R 항체는, 대조군으로서 포함된다. IL6 길항작용을 측정하기 위하여, 400 pM의 인간 IL-6 (R&D Systems 206-IL-010/CF)을 96 웰 플레이트에서 다양한 농도의 각각의 항체와 혼합하였고 RT에서 30 분 동안 배양하였다. 대수 증식기(log phase)의 HEK-Blue™ IL6 세포를 트립신하였고 분석 배지(DMEM, 4.5 g/l 글루코오스, 10% 열처리 불활성화된 FBS, 2 mM L-글루타민, 펜-스텝)에서 280,000 세포/ml로 재현탁하였다. 180 µl의 세포 현탁액을 각각의 웰의 IL-6/Fab 혼합물로 첨가하여 최종 IL-6 농도를 20 pM로 가져왔다. 세포를 20 시간 동안 37°C/5% CO₂에서 배양하였다. 그런 다음 각각의 웰로부터의 20 µl의 상등액을 180 µl의 콰нти-블루™ 시약(Quanti-Blue™ reagent)(Invivogen)과 혼합하였고 스펙트러맥스 M5 플레이트 리더의 650 nm에서 흡광도를 측정하기 전에 40 분 동안 37°C에서 배양하였다.

[0452] 결과를 도 8 및 표 5에 나타냈다. EBI-030(H311A 돌연변이가 있거나 없는 HEK 세포에서 생성된 EBI-030 및 CHO 세포에서 생성된 EBI-030을 포함하여)는 EBI-029와 비교하여 크게 향상된 효력(IC₅₀에서 약 50 배 감소 및 IC₉₀에서 >100 배 감소)을 나타낸다. 효력에서 증가는 SPR에 의해 측정된 친화성에서의 증가보다 더 크다.

[0453] 표 5: IC₅₀ 및 IC₉₀ 값

표 5

[0454]

	IC ₅₀ (pM)	IC ₉₀ (pM)
EBI-029	47	4350
EBI-030	0.9	1.1
EBI-030 CHO	1.4	11
EBI-030-H311A	0.6	12.4
토실리주마브	1490	23700

[0455] EBI-031(또한 본 명세서에서 EBI-030 IgG2-H311A로서 언급됨)은 IC₅₀이 EBI-029보다 75배 이상 적고(more than 75 fold less than) IC₉₀이 EBI-029보다 EBI-029보다 약 350배(350 fold less than) 미만이다. HEK 세포에서 생성된 EBI-030은 EBI-029보다 IC₅₀이 50배 이상 적고 EBI-029보다 IC₉₀이 약 4000 배 적다. **실시예 20: 유리체 IL-6 차단 기간 상의 증가된 효력의 모델 분석**

[0456] 유리 체내 주사 후 IL-6 차단의 정도와 지속 기간에 대한 증가된 효력의 영향을 약동학 모델을 사용하여 시뮬레이션 하였다(도 9). 자유 항체(A), 자유 IL-6(IL), 항체/IL-6 복합체(AIL)의 변화를 나타내는 미분 방정식

(Differential equations)을 하기와 같이 정의하였다 :

[0457]

$$d/dt(A) = -A*kae - A*IL*k1 + AIL*k2$$

[0458]

$$d/dt(IL) = kpi - IL*kie - A*IL*k1 + AIL*k2$$

[0459]

$$d/dt(AIL) = -AIL*kaie + A*IL*k1 - AIL*k2$$

[0460]

여기서 kae는 유리체(vitreous)로부터의 자유 항체 제거율이고, k1은 항체/IL-6 결합을 위한 해리 비율이고, k2는 항체/IL6 복합체에 대한 해리 비율이고, kpi는 IL-6 생성율이며, kie는 유리체로부터의 자유 IL-6 제거율이고, kaie는 유리체로부터의 항체/IL-6 복합체 제거율이다. 시작 파라미터 값 및 비율은 표 6에 나타난 바와 같이 정의된다.

[0461]

표 6: 시작 파라미터(Starting parameter) 값 및 비율

표 6

[0462]

파라미터	값
초기 항체 농도 - A_0	3000 nM
초기 IL-6 농도 - IL_0	0.01 nM
초기 복합체 농도 - AIL_0	0
결합율(Association rate) - k1	$8.64 \text{ nM}^{-1} \text{ d}^{-1}$
해리율(Dissociation rate) - k2	0.0086 d^{-1} 부터 0.86 d^{-1} 까지 다양함
항체 제거율 - kae	0.037 d^{-1}
IL6 제거율 - kie	0.69 d^{-1}
IL6 생성율 - kpi	0.0069 nM d^{-1}
복합체 제거율 - kaie	0.037 d^{-1}

[0463]

A_0 는 5 ml 유리체 부피를 가진 인간 눈으로 $50 \mu\text{l}$ 용량의 50 mg/ml 항체를 전제에 기반하여 계산되었다. IL_0 는 DME 환자에서 유리체 IL-6에 대한 임상 적으로 측정된 값 ~ 200 pg/ml에 기반하여 평가되었다. k1은 $1\text{E}5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 의 일반적 항체 결합율에 기반하여 평가된 반면, k2는 100 pM부터 1 pM까지를 범위로 하는 효력을 시뮬레이팅하기에 다양하였다. kae는 이전에 인간 PK에 대해 측정 한 바와 같이 래빗에서 측정된 유리체 제거 반값(clearance half-times)으로부터 1.8 스케일에 의해 유래되었다. kie는 24 시간의 제거 반값에서 평가되었고, kpi는 IL_0*kie 로서 계산되었다. 자유 항체 및 자유 IL-6의 자극은 300 일 시간경과에 걸쳐 버클리 마돈나 소프트웨어(Brkeley Madonna software)를 사용하여 수행되었다(도 10). 95% IL-6 차단 of 중단(cut-off)은 억제 기간을 측정하는데 선별된다. 모델은 항체 효력을 증가시키는 것이 눈에서 IL-6 억제 기간을 $k2/k1 = 100 \text{ pM}$ 의 경우 130 일에서 $k2/k1 = 10 \text{ pM}$ 의 경우 200일까지 $k2/k1 = 1 \text{ pM}$ 의 경우 225일까지 현저히 연장된다는 것을 예측한다.

[0464]

실시예 21: IL-6a의 약동학(Pharmacokinetics)

[0465]

약동학 (PK) 실험은 팜옵티마(PharmOptima)(Portage, MI)에 의해 수컷 뉴질랜드 흰색 래빗로 수행되었다. 모든 동물은 연령 12-13 개월 및 2.61 - 3.42 kg 체중이었다. 하기의 단백질을 비교하였다 - EBI-029-IgG2(서열번호 11 및 서열번호 12), EBI-029-IgG2-H311A(서열번호 10 및 서열번호 12), EBI-030(서열번호 41 및 서열번호 42), EBI-030-IgG2-H311A(서열번호 47 및 서열번호 42), EBI-029 Fab(서열번호 24 및 서열번호 12), 일리아® (VEGF trap), 및 토실리주마브(TCZ; 항-IL6R 항체). 모든 단백질은 PBS, pH 7.4에서 13.8 mg/ml로 제조되었다. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, EBI-029 Fab, 및 토실리주마브는 래빗에서 이들의 표적 항원에 결합하지 않는 반면, 일리아®는 래빗 VEGF에 결합한다.

[0467]

유리체내(intravitreal) PK의 조사를 위해서, 9마리 동물의 각각의 눈에 $50 \mu\text{l}$ 의 테스트 물품을 주입하였다. 주

입하기 전에, 리도카인 하이드로클로라이드(idocaine hydrochloride)(주입가능한 2%), 0.5% 프로파라케인(Proparacaine), 또는 0.5% 테트라케인(Tetracaine)을 안구 표면에 적용하였다. 주입은 눈의 등쪽 관자방향 사분면(dorsotemporal quadrant)을 통해 삽입된 BD 300 μ l의 인슐린 주사기 (31G x 5/16 인치 바늘)로 중간-유리체(vitreous)에 수행되었다. 전신성 PK의 조사를 위하여, 3마리 동물은 귀동맥(ear vein)을 통하여 100 μ l의 테스트 물품을 주입되었다.

[0468] 일련의 혈액 시료(Serial blood sample)는 0.083, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240, 및 336 시간에 IVT 및 iv 팔 모두에서 3마리 동물로부터 수득되었고 시트레이트-포스페이트-덱스트로오스 용액(Citrate-Phosphate-Dextrose solution)으로 1:1 희석되었고 얼음에 방치되었다. 혈액을 4°C에서 10 분 동안 4000 rpm에서 차가운 혈액 시료의 원심분리로 수득되었고 -80°C에서 냉동 저장되었다.

[0469] 안구 조직을 복용 후 0.25, 24, 168, 및 336 시간에 IVT 팔에서 모든 동물의 양쪽 눈으로부터 수득하였다. 동물들은 정맥 내 바르비투르에이트(intravenous barbiturate) 과다 투여를 통해 안락사시켰다. 방수(aqueous humor)를 수득하기 위하여, 안락사후 즉시, 바늘이 있는 주사기를 각막 아래에 삽입하고 방수를 서서히 빼냈다. 방수를 미리 표시된 튜브에 옮기고 드라이 아이스 위에 놓거나 -80°C에서 냉동시켰다. 유리체액(vitreous humor)을 수득하기 위해, 메스(scalpel)를 사용하여 적출된 눈(enucleated eye)의 공막(sclera)에 작은 조각을 주입하고 유리체를 주사기를 통해 개구부를 통해 빼냈다. 시료를 주사기의 눈금을 통해 측정하고, 미리 표시된 튜브로 옮겨서 드라이 아이스에 놓거나 -80°C에서 냉동시켰다.

[0470] 망막(retina) 및 맥락막(choroid)을 수득하기 위해, 가장자리(limbus)에 평행하고 꼬리가 있는, 적출된 눈의 공막(sclera)에 메스로 작은 조각을 도입하였다. 눈의 안구(globe) 주위의 여는데 가위를 계속하여 사용하였고 이것을 2 개의 반쪽으로 분리하였다. 뒤쪽 안구는 내부가 위를 향하도록 배치되었다. 아가미 칼(gill knife)을 사용하여 망막(retina)을 조심스럽게 안구로부터 수득하였다. 일단 망막이 안구로부터 수득되면, 맥락막(choroid)을 남아있는 안구로부터 유사한 방식으로 수득하였다. 미리 무게를 잰 후 미리 표시된 프레셀리스®(Precellys®) 튜브로 양쪽 시료를 각각 옮기고, 무게를 재고, 드라이 아이스 위에 놓거나 -80°C에서 냉동시켰다. 망막(retina) 및 맥락막(choroid) 조직을 인산염 완충 생리 식염수 (PBS)에서 10 배 희석하여 균질화한 후 -80°C에서 보관하였다.

[0471] 각각의 조직에서 단백질 농도는 ELISA에 의해 평가되었다. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, 및 EBI-029 Fab를 위하여, 코스타 절반-부피(Costar half-volume) 플레이트를 실온(RT)에서 1 시간 동안 PBS에서 1 μ g/ml의 인간 IL-6으로 코팅하였다. 웰을 2% BSA를 포함하는 PBS로 차단하였고, 세척하였고 그런 다음 희석제로서 PBS + 5% 래빗 혈장 + 0.05% 트윈-20을 사용하여 각각의 시료에 대하여 희석 범위로 배양하였다. 정제된 단백질을 사용하여 표준 곡선을 각각의 플레이트 상에 포함시켰다. 시료를 60 분 동안 실온에서 배양한 다음 0.05% 트윈-20을 포함하는 300 μ l PBS로 3회 세척하였다. PBS, 1% BSA, 0.05% 트윈-20에서 1:10,000으로 희석된 항-카파(kappa)-HRP (Genway Inc.)를 각각의 웰에 첨가하였고 30 분 동안 배양하였다. 상기와 같이 웰을 세척하였고 그런 다음 3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 기질을 첨가하였고 신호를 스펙트로맥스 플레이트 리더 상의 450 및 550 nm에서 측정하였다. 단백질 농도를 소프트웨어(Softmax Pro 6 software)를 사용하여 표준 곡선에 기반하여 계산하였다. 각각의 ELISA를 적어도 3개의 독립적 플레이트 상에서 재반복하였고 평균 반값(half-time)을 기록하였다.

[0472] 항-토실리주마브 Fab (BioRad HCA252)를 포획제(capture reagent)로서 사용하고 항-인간-IgG-Fc-HRP (Sigma A0170)를 검출 항체로서 사용한 것을 제외하고는 토실리주마브에 대한 단백질 농도를 ELISA로 결정하였다. 2개의 상이한 ELISA 분석이 자유 및 총 일리아®를 측정하는데 사용되었다. 자유 일리아®에 대하여, 웰을 재조합 VEGF (R&D 시스템)으로 코팅하였고 결합 단백질을 항-인간-IgG-Fc-HRP (Sigma A0170)로 검출하였다. 총 일리아®를 측정하기 위하여, 항-인간 Fc 항체 (Sigma I2136)를 포획(capture)하는데 사용하였고 항-인간 IgG-CH2-HRP (BioRad MCA647P)을 검출하는데 사용하였다. 각각의 ELISA를 적어도 3개의 독립적 플레이트 상에서 재반복하였고 평균 반값을 기록하였다.

[0473] **결과 요약**

[0474] 대부분의 동물에서, 주입된 단백질에 대한 팔팔한 항체 형성을 240 및 336 시간의 특정 시점에서 관찰하였다. 상기 항체 형성은 단백질 제거 또는 ELISA로 간섭하는 것에 영향을 줄 수 있기 때문에, 데이터 분석을 168시간을 포함한 시간까지의 시점으로 제한하였다. 유리체내(intravitreal) PK에 대하여, 모든 EBI-029 및 EBI-030 IgG2 단백질을 일리아® (T1/2 = 6.3 일), 토실리주마브 (T1/2 = 4.8 일), 또는 EBI-029 Fab 단편 (T1/2 = 3.9 일)와 비교하여 현저히 더욱 천천히 (각각 EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, 및 EBI-030-H311A에 대하여 T1/2

= 9.3, 9.0, 15.7, 및 9.8 일) 제거하였다(도 11, 요약 7). 일리아® 및 토실리주마브와 비교하여 EBI-030 및 EBI-030-H311A가 높은 수준으로 축적된 경우의 망막(retina), 맥락막(choroid), 및 수용액(aqueous)에서 유사한 추세가 관찰되었다(도 12 및 도 13 참조). 모든 단백질은 일리아® 또는 EBI-030-H311A보다 현저히 높은 수준으로 축적하는 EBI-029, EBI-030, 및 토실리주마브로 IV 투여 후 혈장에서 검출되었다(도 14 참조). 유사하게, 일리아® 및 EBI-030-H311A는 감소된 FeRn 결합에 기인한 야생형 IgG2의 대략 절반의 EBI-030-H311A 반값과 함께, IV 투여 후 혈장에서부터 더 빨리 제거되었다(표 7).

[0475] 표 7: 약동학 결과

표 7

[0476]

유리체(vitreous) PK	
분자	T _{1/2} (일)
EBI-029	9.3
EBI-029-H311A	9.0
EBI-030	15.7
EBI-030-H311A	9.8
EBI-029 Fab	3.9
일리아®(Eylea®)	6.1 (자유), 6.3 (총)
토실리주마브	4.8
IV 투여 후 전신성 PK	
분자	T _{1/2} (시간)
EBI-029	77
EBI-030	69
EBI-030-H311A	33
일리아®(Eylea®)	37 (자유), 42 (총)
TCZ	50

[0477]

실시예 22: 고농도의 EBI-031 용해도 정제된 EBI-031을 아미콘 울트라 스피ن 농축기(Amicon Ultra-15 spin concentrator)를 사용하여 PBS, pH 7.4에서 3 mg/ml로부터 142 mg/ml로 농축하였다. 이전(pre)- 및 이후(post)-농도 프랩(preps)은 와트 미니다윈 트레오스 광산란 기구(Wyatt miniDawn TREOS light scattering instrument) 및 와트 옵티랩 rEX 굴절률 기구(Wyatt Optilab rEX refractive index instrument)가 결합된 Tosoh G3000SWXL 7.8x30 SEC 컬럼(column) 상에서 실행하여 응집에 대하여 평가하였다. 20 µg의 단백질을 주입하였고 PBS에서 1 ml/분의 유동률로 수행하였다. 약 150 kDa의 예상 분자량에서 피크의 질량 분율은 2개의 농도(3 mg/ml에 대하여 90.9% 및 142 mg/ml 프랩에 대하여 91.3%)에 대해 대략 동일했으며, 이는 농축 기간에 단백질 응집의 현저한 증가가 없음을 나타낸다. 상기 결과는 EBI-031이 측정 가능한 응집이 거의없이 142 mg/ml까지 농축될 수 있음을 나타낸다(<10% 응집).

[0478]

실시예 23: EBI-031은 시스(cis)- 및 트랜스(trans)-IL6 신호를 차단한다

[0479]

HEK-Blue™ IL6 리포터 세포주(Invivogen)를 시스- 및 트랜스- IL6 신호를 차단하는데 EBI-031 및 토실리주마브의 효력을 비교하는데 사용하였다. 시스- 신호에 대하여, 자유 IL-6 (총 농도 = 20 pM)를 96 웰 플레이트의 농도 범위로 EBI-031 또는 토실리주마브와 혼합하였고 30 분동안 실온에서 배양하였다. 대수 증식기(log phase)의 HEK-Blue™ IL6 세포를 트립신 처리하였고 분석 배지(DMEM, 4.5 g/l 글루코오스, 10% 열처리 불활성화된 FBS, 2 mM L-글루타민, 페넨-스텝(Pen-Step))에서 재현탁하였고, 50,000 세포를 200 µl의 최종 부피로 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 20 시간동안 37°C/5% CO₂에서 배양하였다. 그런 다음 각각의 웰로부터의 50 µl의 상등액을 150 µl의 Qu항-Blue™ 시약(Invivogen)과 혼합하였고 스펙트로맥스 M5 플레이트 리더의 650 nM에서 흡광도를 측정하기 전에 40 분 동안 37°C에서 배양하였다. 분획 신호 값을 유도하기 위해 IL-6가 없는 웰로부터 백그라운드 신호를 차감한(subtracted) 후 억제제가 없는 IL-6 처리된 세포로 나누었다(divided by). 토실리주

마브 ($IC_{50} = 12.9 \text{ nM}$)와 비교하여 EBI-031($IC_{50} = 14.2 \text{ pM}$)는 >900 배 더 큰 효력을 가진 자유 IL-6을 차단한다(도 16A).

[0480] 트랜스-신호 차단을 측정하기 위하여, 자유 IL-6 대신에 200 pM 최종 농도에서 과도한 IL-6(hyper IL-6)을 사용하는 것을 제외하고는 상기와 같이 실험을 수행하였다. 상기 과도한 IL-6(hyper IL-6)은 IL-6와 가용성 IL-6 수용체 사이의 유전적 융합(genetic fusion)이다(Fischer et al., Nature Biotechnology 15:142-145 (1997)). EBI-031은 과도한 IL-6을 강력히 차단한 반면($IC_{50} = 32 \text{ pM}$), 토실리주마브는 1 μM 농도에서 내보내는 신호를 현저하게 억제할 수 없었다(도 16B).

[0481] 상기 결과는 EBI-031이 부위 II, 또는 gp130과 접촉하는 부위에서 pM 친화성으로, 인간 IL-6와 결합하고 토실리주마브보다 >900 배 더 강력하게 세포 내 분석에서 IL-6 및 IL-6/sIL-6R α 복합체의 신호를 차단하는 것을 나타낸다.

[0482] **실시예 24: IL-6 신호의 유리체내(intravitreal) EBI-031 억제를 위한 컴퓨터 시뮬레이션(Computational simulations)**

[0483] 인간에서 EBI-031의 유리체내 주사가 IL-6 신호의 95%를 억제해야만 하는 시간의 길이를 예상하기 위하여 컴퓨터 시뮬레이션을 실시예 20에서 설명된 바와 같이 수행하였다. k_2 를 0.12 d⁻¹로 설정하여 효력 분석에서 측정된 $k_2/k_1 = 14 \text{ pM}$ 이 되도록 하였다. T1/2 제거는 인간에 대해서 1.8 배로 조정된 래빗의 측정된 유리체내 제거 반감에 기반하여 18 일로 설정되었다. 모든 다른 파라미터를 표 6에 나타냈다. 모델은 유리체 내 주사 후 ~150일 동안 EBI-031이 IL-6 신호의 95%를 차단해야만 한다고 예측했다(도 17). 이러한 모델링 결과는 EBI-031이 긴 시간 동안, 예를 들면, 약 6 개월까지 눈에서 IL-6 신호를 실질적으로 차단할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0484] **실시예 25: EBI-031 아형(isoforms)의 특성**

[0485] EBI-031은 IgG2 항체이다. 이전에 논의된 바와 같이, IgG2 항체는 3개의 상이한 구조적 아형(isoforms), IgG2-A, IgG2-B, 및 IgG2-A/B 아형으로 존재한다(도 18). 이러한 실시예에서, EBI-031 시료에서 구조적 아형을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다.

[0486] RP-HPLC 분석

[0487] 역상 고성능 액체 크로마토그래피(Reversed-phase high-performance liquid chromatograph(RP-HPLC))를 EBI-031의 다양한 구조적 아형(isoforms)을 분석하는데 사용하였다. IgG2 디설피드(IgG2 disulfide)-매개된 구조적 아형을 분석하기 위해 이전에 사용되어온 향상된 분석적 RP-HPLC 방법(Dillon et al., Journal of Chromatography A, 2006, 1120 : 112-120 참조)은 EBI-031 분석에 최적화되었다.

[0488] 대략 30 μg 을 포함하는 EBI-031 시료를 Zorbax 300SB-C8 컬럼 (150 mm X 2.1 mm, 5.0 μm , 300 Å) 상으로 부하하였다. 컬럼 온도를 75°C로 설정하였다. 이동상 A(Mobile phase A)는 0.1% TFA를 포함하는 물이었고, 이동상 B는 55% IPA, 40% ACN, 4.9% 물 및 0.1% TFA이었다. 유동률은 0.5 mL/분이었다. 컬럼(column)을 초기에 2분 동안 90% 이동상 A 및 10% 이동상 B로 평형시킨 다음 10 내지 25% B에서 2분 단계 구배(gradient)로 평형시켰다. 용리(Elution)는 21분에 걸쳐 25-32 % B의 기울기로 달성되었다. UV 흡광도를 214 nm 및/또는 280 nm에서 모니터링 하였다.

[0489] 해상도(resolution)가 디설피드(disulfide)와 관련이 있는지를 결정하기 위해, 시료를 2분간 실온에서 5 mM DTT 및 10 mM 시스테인으로 처리한 다음 RP-HPLC 방법으로 분석하였다(도 19). 강력한 환원제인 DTT를 사용한 처리는, IgG2 항체 감소를 일으키고, 초기 피크(피크 0 및 피크 1)로 용리(elution)되는 결과를 나타낸다(도 19, 중간 패널). DTT와 비교하여 약한 환원제인, 시스테인(cysteine)으로 하는 처리는 DTT로 처리된 시료에서는 보이지 않지만, 초기 피크(피크 0 및 피크 1)를 향하여 아형 분포를 이동시킨다(도 19, 하부 패널).

[0490] 테이타는 RP-HPLC 방법이 상이한 디설피드 연결성을 갖는 구조적 아형을 결정한다는 것을 나타낸다. 상이한 디설피드 결합 구조는 비환원형 펩타이드 매핑 및 질량 분광 분석(mass spectrometry analysis)에 의해 확인되었다: 초기 용리 피크(피크 1)는 IgG2-A/B 아형을 포함하고 후기 용리 피크(피크 2)는 IgG2-A 아형을 포함한다. 중요하게, EBI-031 시료에서 검출된 IgG2-B 아형 B (피크 0)가 없었다(도 19, 상부 패널).

[0491] 상이한 EBI-031 시료의 비교

[0492] 상기 설명된 RP-HPLC 분석을 사용하여, 상이한 EBI-031-발현하는 세포주로부터 수득된 EBI-031 시료를 생성된 항체의 아형 분포를 비교하여 분석하였다. EBI-031 시료를 클론 세포주의 200L 규모 배양, 부모 세포주로부터의

200L 규모 배양, 및 세포의 안정적으로 형질감염된 폴로부터 수득하였다. EBI-031을 클론(clonal) 및 부모(parental) EBI-031을 발현하는 세포주로부터 3단계의 크로마토그래피의 방법을 사용하여 정제하였다. EBI-031을 단백질 A 정제를 사용하여 세포의 안정적으로 형질감염된 폴로부터 정제하였다. 시료를 상기 설명된 방법으로 분석하였다.

[0493] 도 20에 나타낸 결과는 모든 3개의 EBI-031 시료가 아형 IgG2-A 및 IgG2-A/B를 포함했으나, IgG2-B는 다량 함유하지 않았음을 나타낸다. 상기 데이터는, 상기 생성이 클론 EBI-031-발현하는 세포주, 부모 EBI-031-발현하는 세포주로부터, 또는 안정적으로 EBI-031을 발현하는 이질적 세포 집단으로부터 인지의 여부에 관계없이, EBI-031 IgG2 항체가 다른 IgG2 항체와 비교하여 덜 이질적인 혼합물로 생성됨을 나타낸다. 도 21은 클론 EBI-031 발현하는 세포주의 200L 규모 배양으로부터의 EBI-031 시료, 예를 들면, 도 20의 상단 패널로부터 아형 분포를 나타낸다. 또한 커브 아래의 면적을 측정하였고, 아형 사이의 분포를 도 아래의 요약에 나타냈다.

[0494] **실시예 26: 영장류 연구에서 약동학**

[0495] EBI-031의 약동학을 영장류 연구에서 조사하였다. 2 마리의 수컷 아프리카 녹색 원숭이를 테스트하였다. 50 mg/ml의 EBI-031의 50 μ l를 눈으로 유리체내 주입하였다. 마돈나 소프트웨어(Madonna software)를 커브 피팅(curve fitting)하는데 사용하였다.

[0496] 영장류 연구로부터의 데이터를 커브 피트를 사용하여 모델시켰다. 유리체(vitreous)에서의 항체(A) 및 유리체(vitreous) 외부, 예를 들면, 전신성의 항체(Ap)에서의 변화를 설명하는 미분 방정식(Differential equations)을 하기에 정의하였다:

[0497] $d/dt(A) = -A \cdot k_{ae}$

[0498] $d/dt(A_p) = A \cdot k_{ae}(Dil) - A_p \cdot k_{ape}$

[0499] 시작 파라미터 값 및 비율은 하기의 요약에서 나타낸 바와 같이 정의된다:

[0500] 표 8: 시작 파라미터 값 및 비율

표 8

파라미터	값
Dil - 희석(Dilution)	100
k _{ae} - 유리체 제거의 비율	0.2
k _{ape} - 전신성 제거의 비율	1.4
Init A - 유리체(vitreous)에서 초기 항체	1000000
Init A _p - 유리체(vitreous) 외부의 초기 항체	0

[0502] 적합성에 포함된 다른 고려 사항은 하기를 포함한다: 희석 및 비율 불변은 적합성을 위해 유동적(floated)이었다. 초기 A는 상수(5 ml 눈에서 50 mg/ml의 2 x 50ml)을 가졌다. 도 22A, 22B, 및 23에 나타낸 모델의 결과는 유리체 제거율 상수(vitreous elimination rate constant)가 2마리 원숭이에 대해 각각 4.6 및 5.7 일의 반감기 결과를 나타냈다. 평균 유리체 제거율 상수는 5.2 일로 계산되었다. 전신성 제거는 1.1 일, 및 0.63 일 (평균 0.85 일)로서 모델화되었다. 상기 결과는 유리체에서 EBI-031의 반감기가 영장류의 전신성 반감기보다 현저하게 길다는 것을 나타낸다. **실시예 27: EBI-031의 약동학**

[0503] EBI-031의 20 mg/ml 용액의 50 μ l가 래빗의 눈으로 유리체내 주입된 경우의 다른 약동학 (PK) 실험이 수행되었다. 검사된 시간 포인트는 1, 3, 7 및 14 일 (예를 들면, 24, 72, 168, 및 336 시간)이었다. 2개의 동물(4개의 눈)을 각각의 시간 포인트에 대해서 분석하였다. EBI-031 제제를 투여, 안구 조직을 수득, 및 단백질 농도를 결정하는 방법들을 실시예 21에서 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0504] 결과를 도 24A 내지 24I에 나타냈다. 유리체액(vitreous humor)에서 1-14일 동안 단백질 농도를 분석하는 경우에, EBI-031 반감기를 8.95 일이 되도록 결정하였다(도 24A). 그러나, 강력한 항체 반응은 14일째에 검출되었고, 이는 상기 결과에 영향을 줄 수 있다. 유리체액에서 1-7일 동안 단백질 농도를 분석하는 경우에, EBI-031 반감기를 18.88일이 되도록 결정하였다.

[0505] 또한 유리체내 주사 후에 눈의 다른 구획(compartment)에서 EBI-031이 검출되었다. 또한 EBI-031을 방수(aqueous humor)(도 24B), 맥락막(choroid) (도 24C), 결막(conjunctiva)(도 24D), 각막(cornea)(도 24E), 섬

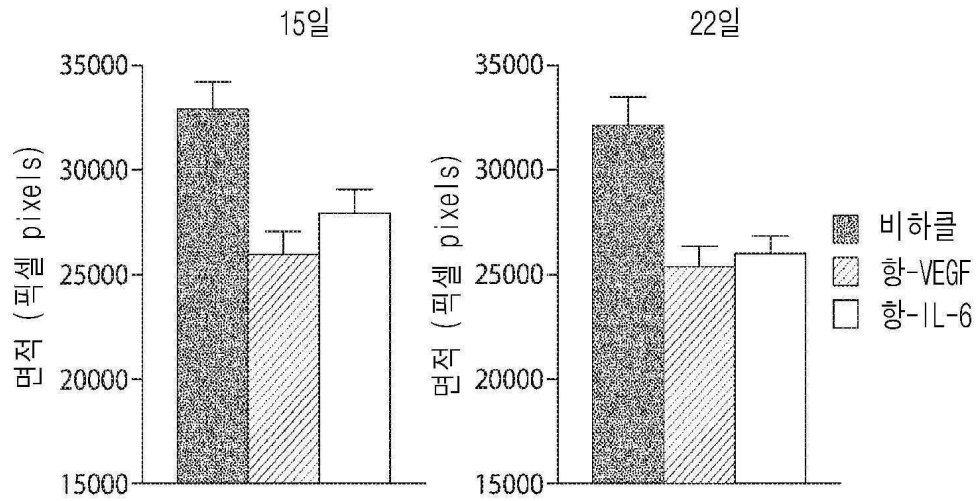
모체(ciliary body)(도 24F), 수정체(lens)(도 24G), 망막(retina)(도 24H), 및 공막(sclera)(도 24I)에 침투시켰다. 상기 조직에 있는 약물 농도는 유리체에서 검출된 농도보다 1 내지 2 자릿수 낮았다.

[0506]

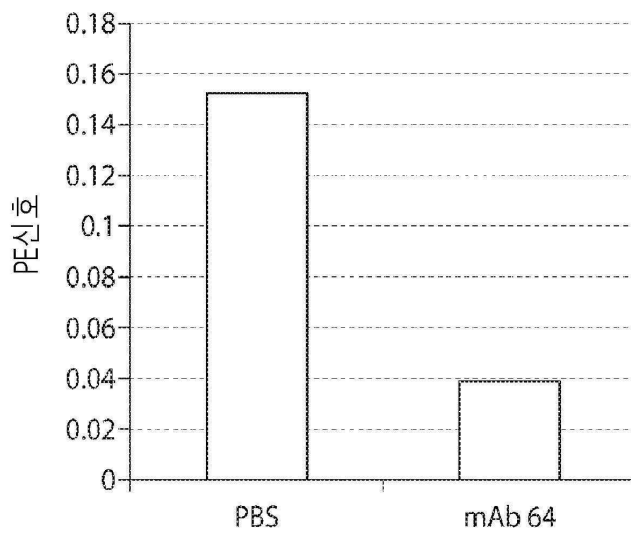
다른 실시형태는 하기의 청구항 범위 내에 있다.

도면

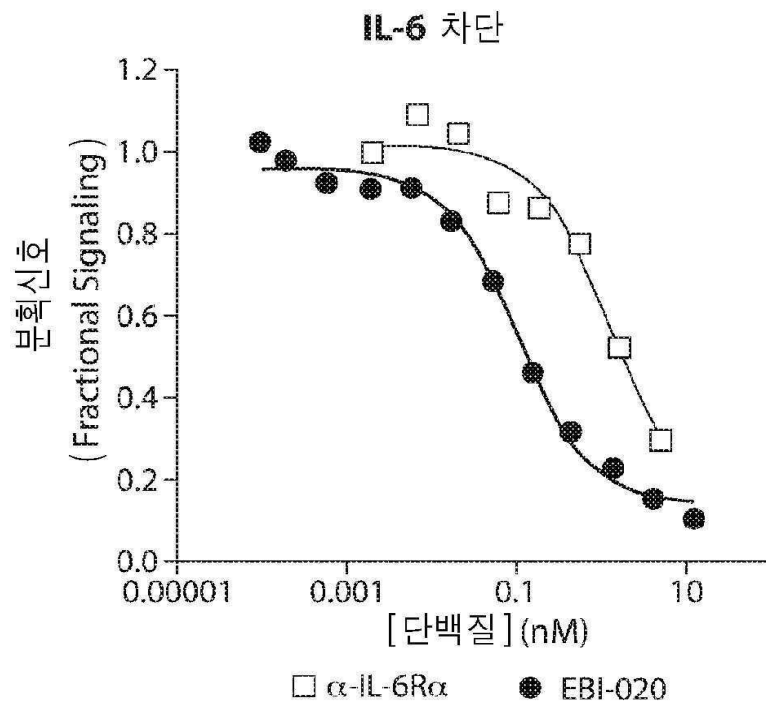
도면1



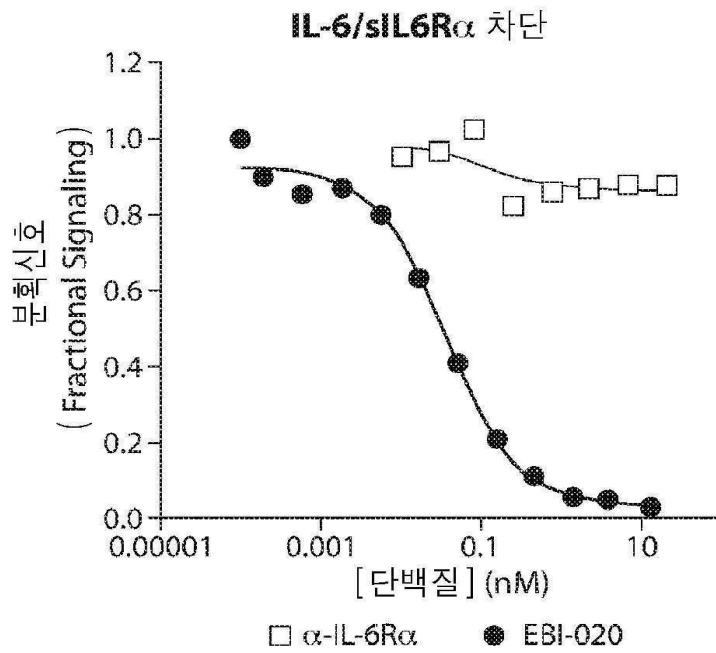
도면2



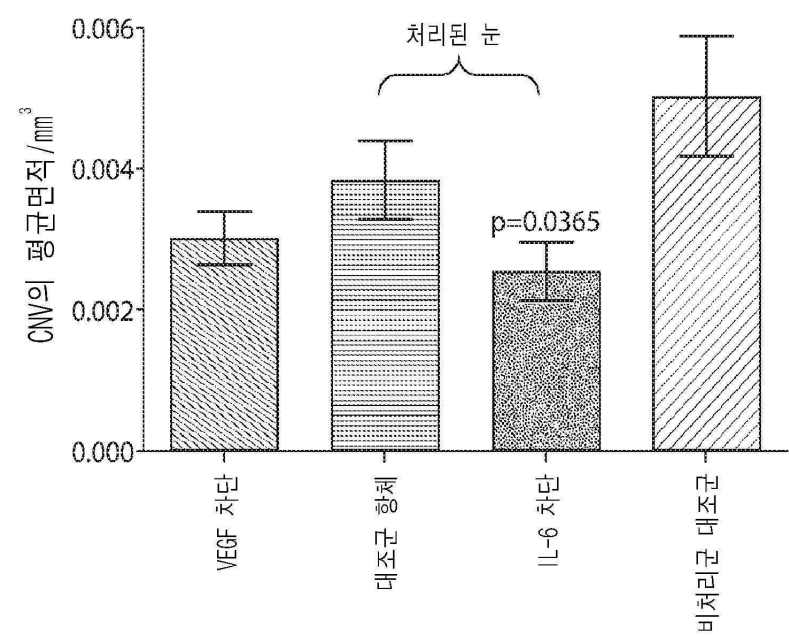
도면3a



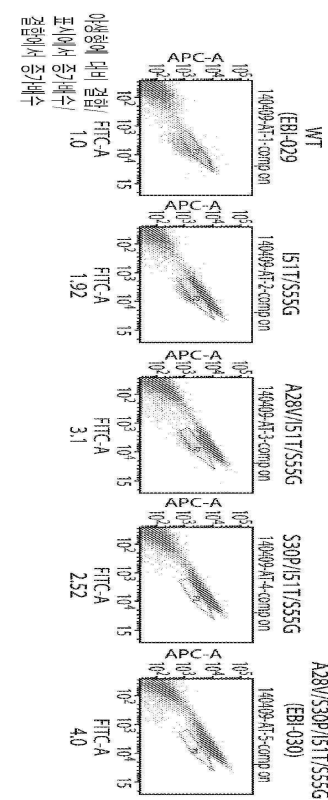
도면3b



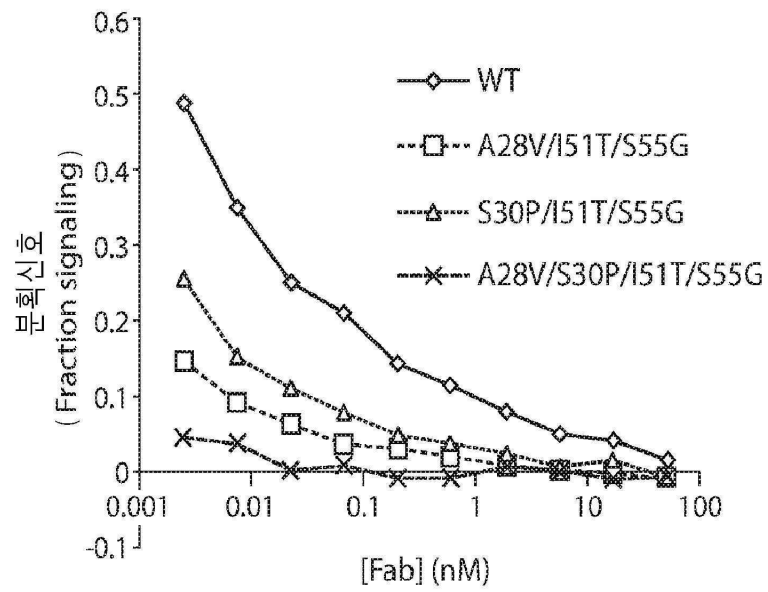
도면4



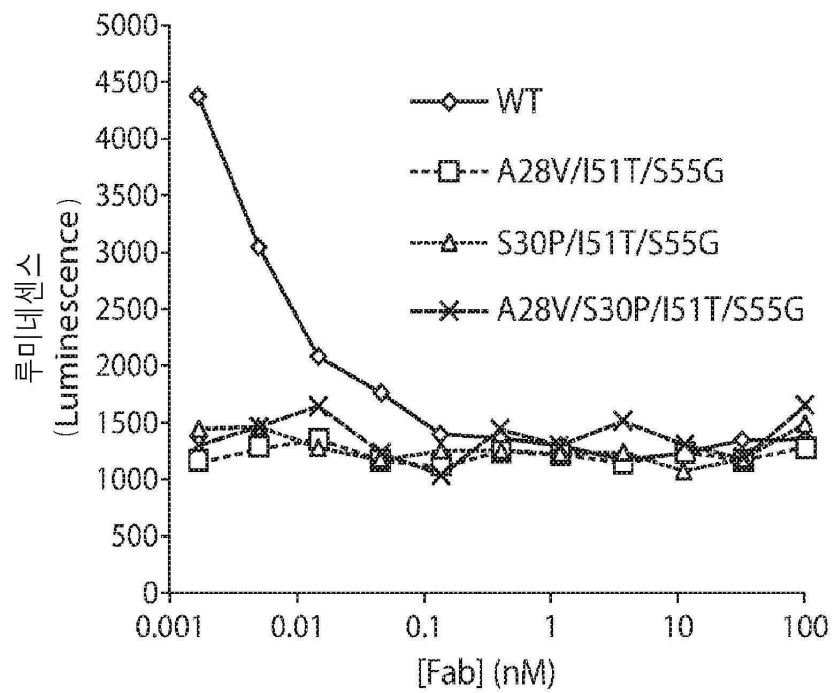
도면5



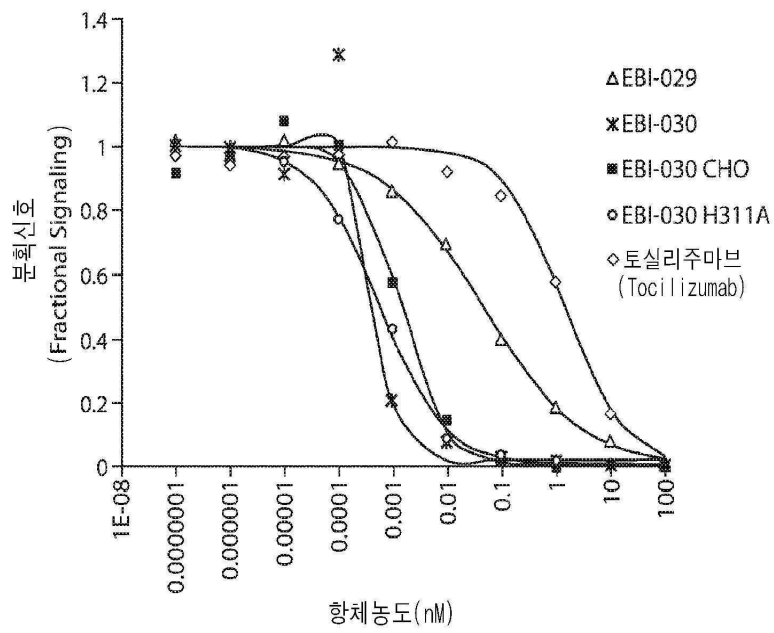
도면6



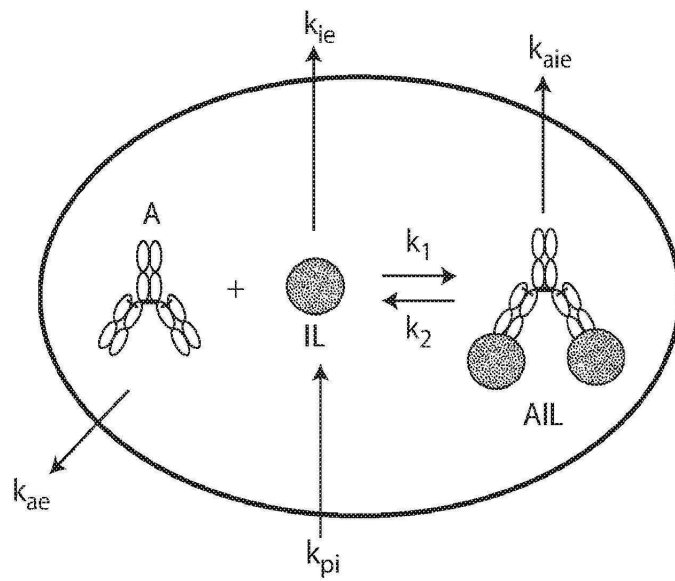
도면7



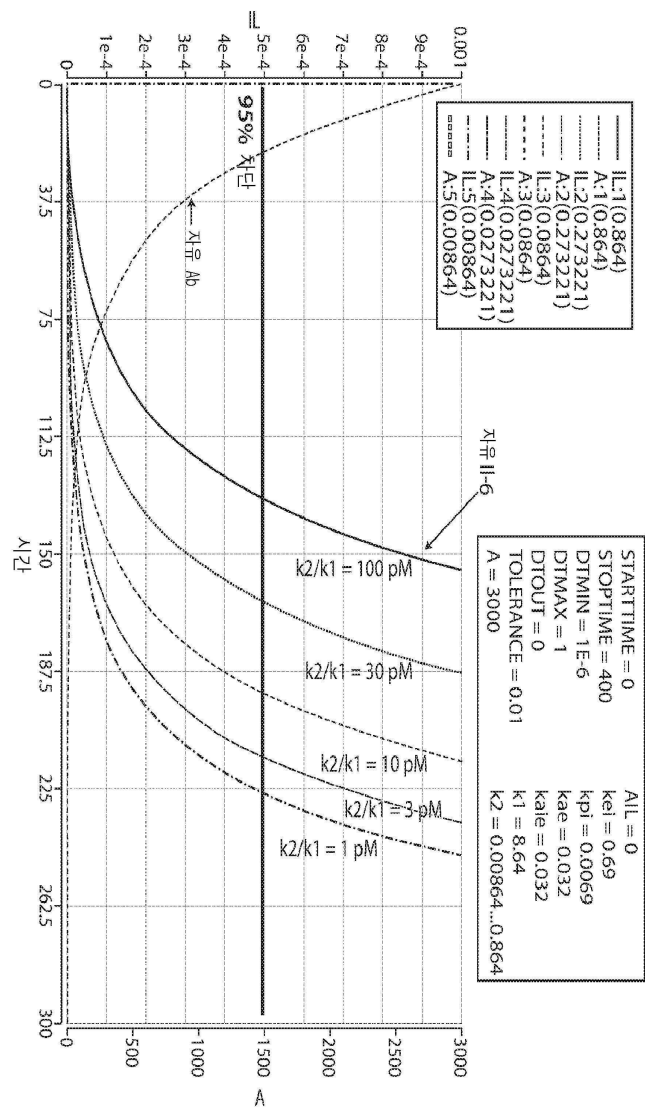
도면8



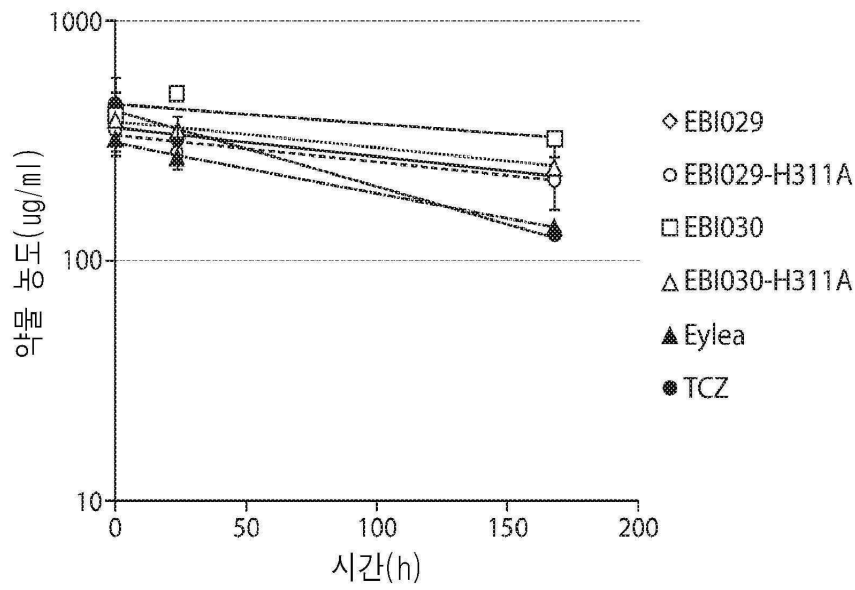
도면9



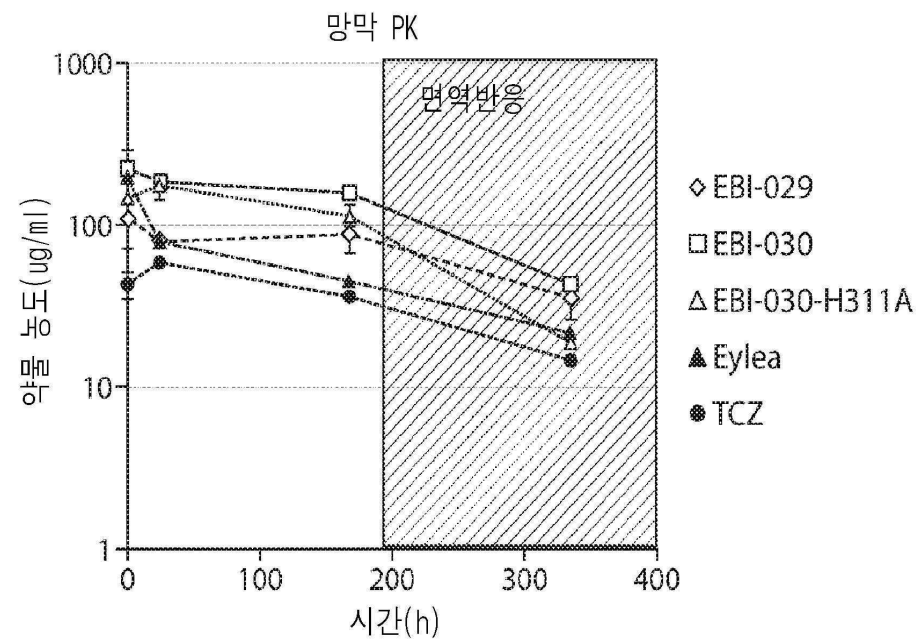
도면10



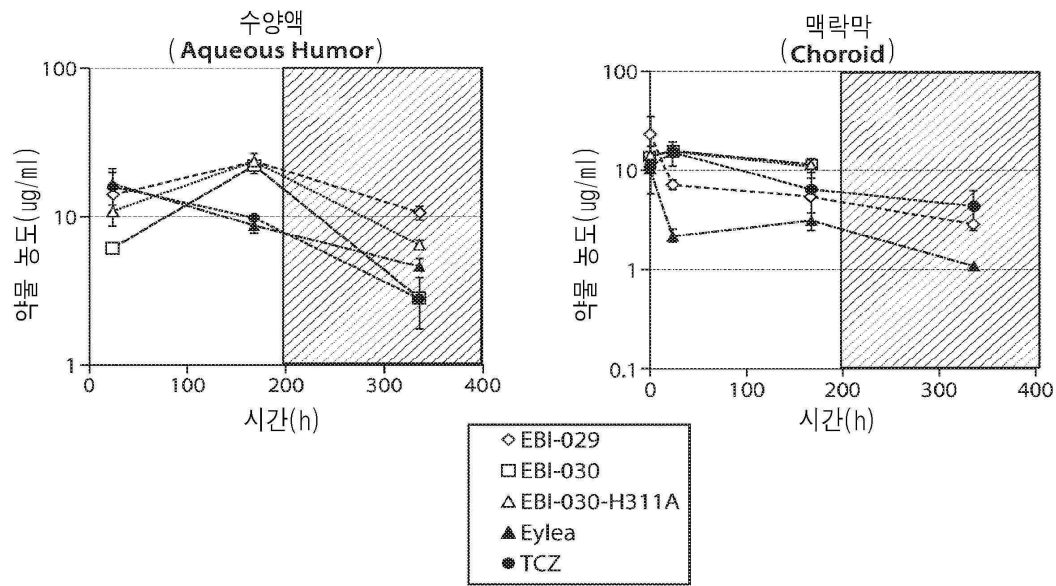
도면11



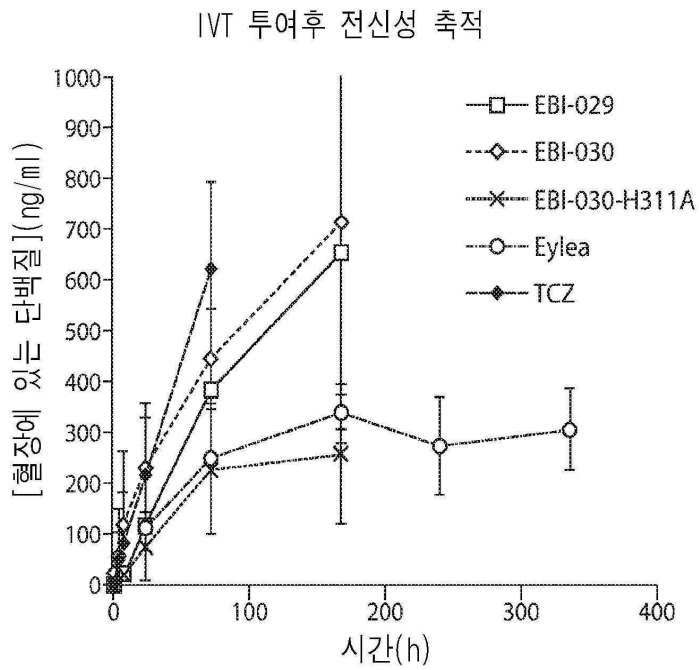
도면12



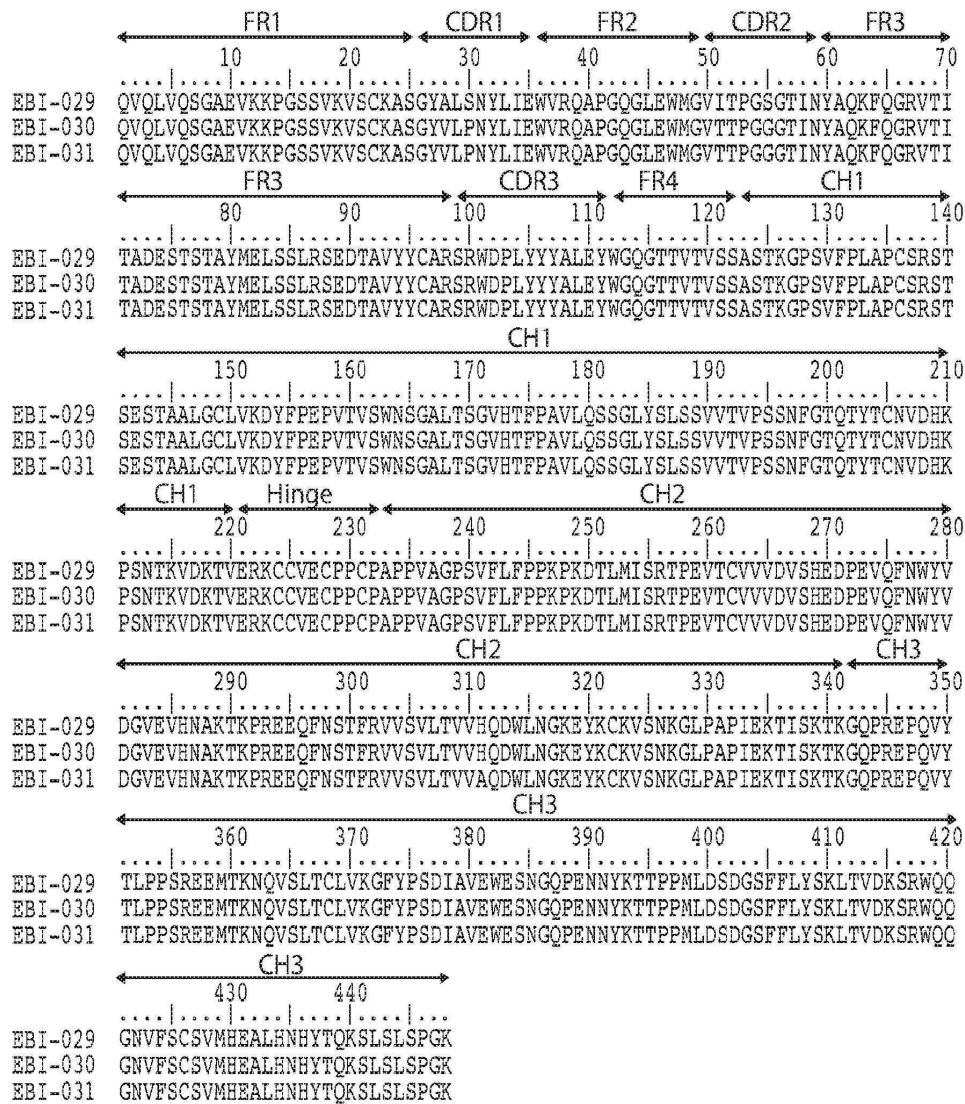
도면13



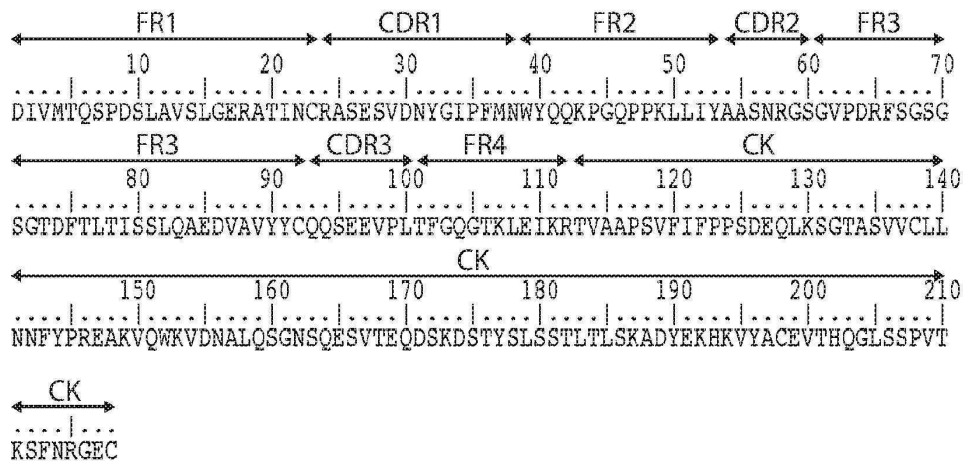
도면14



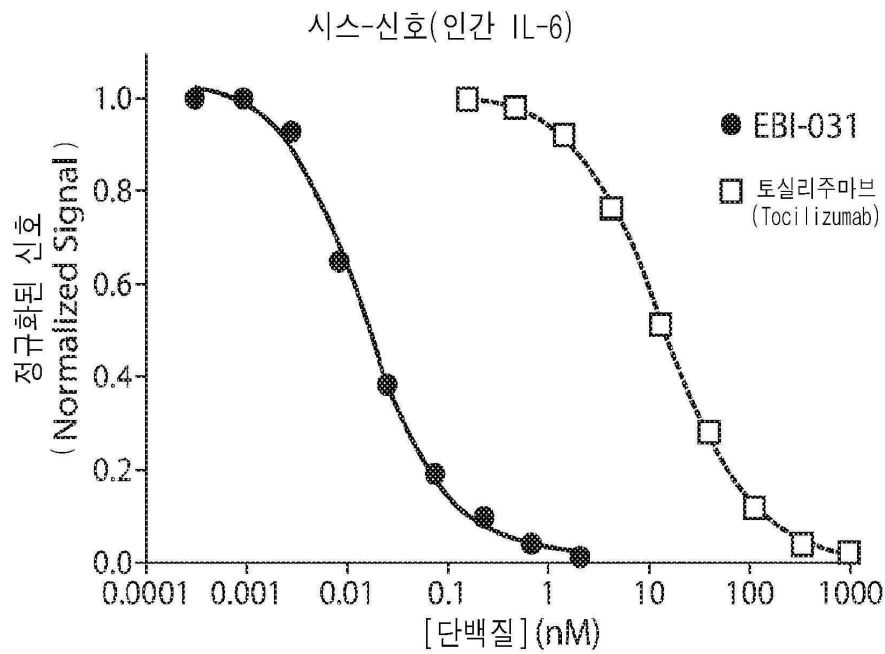
도면15a



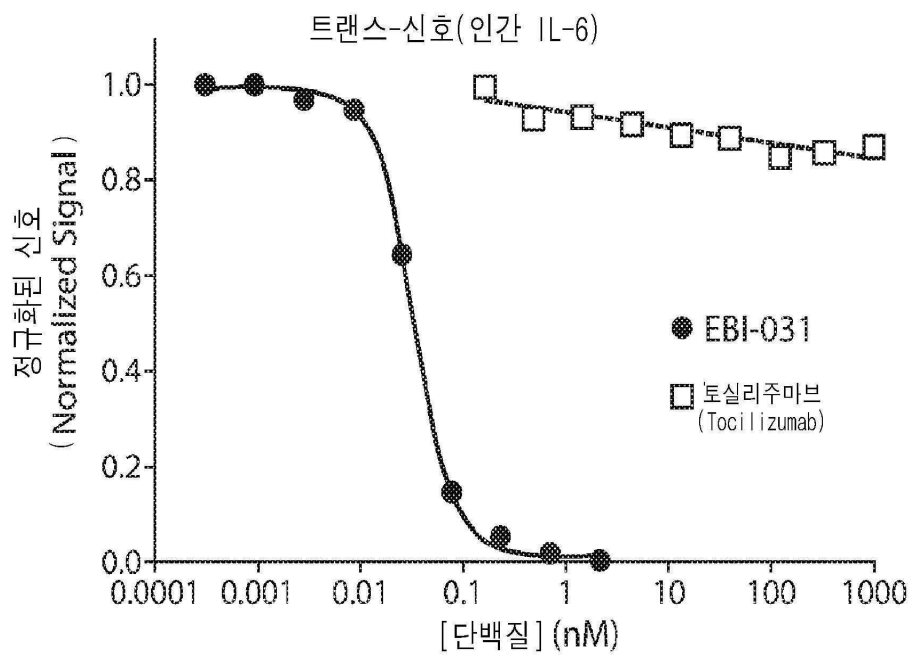
도면15b



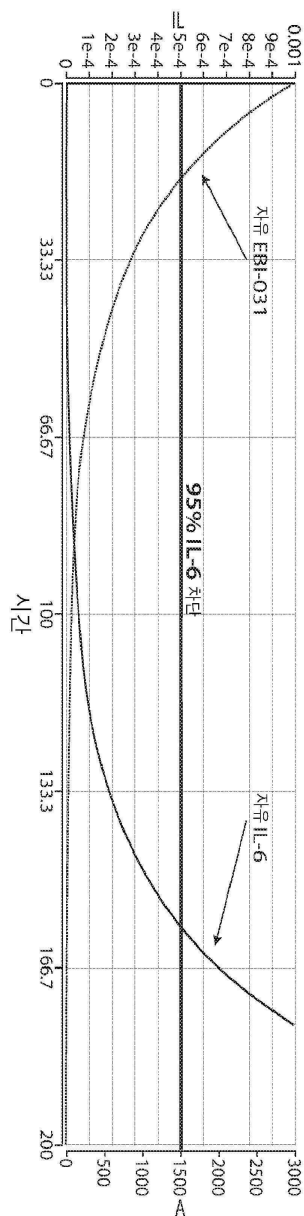
도면16a



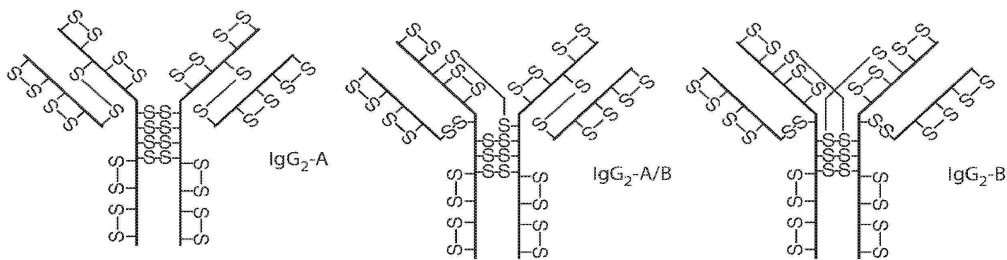
도면16b



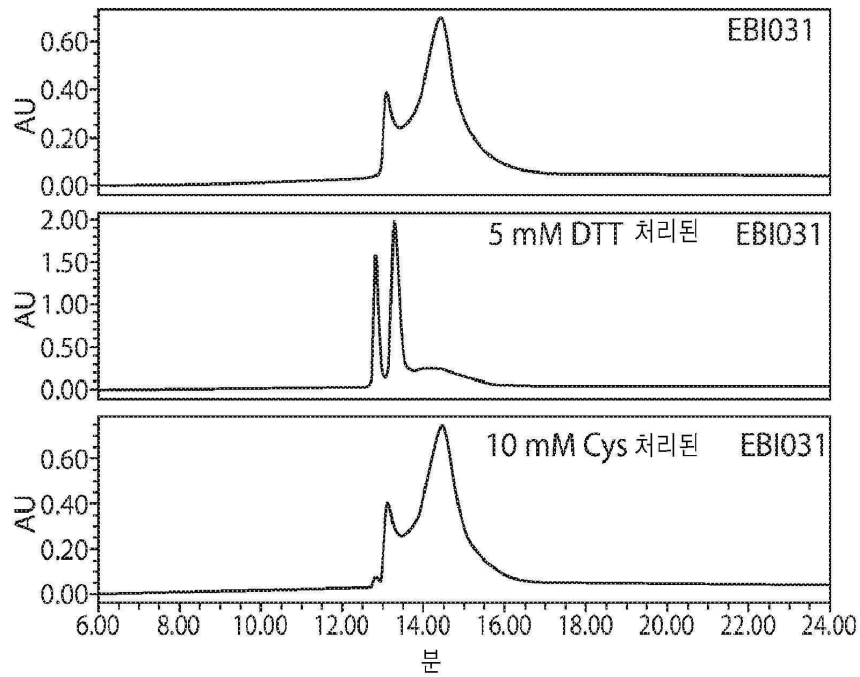
도면17



도면18

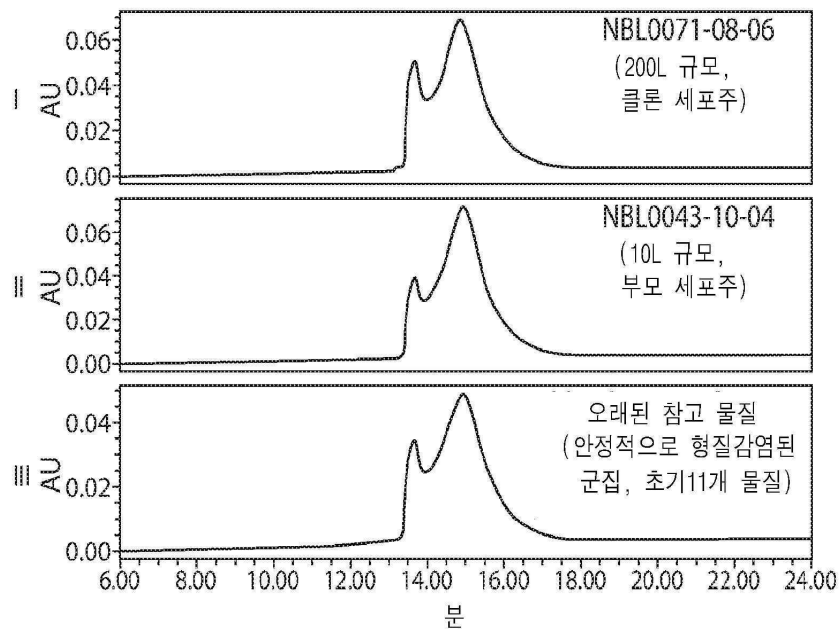


도면19



도면20

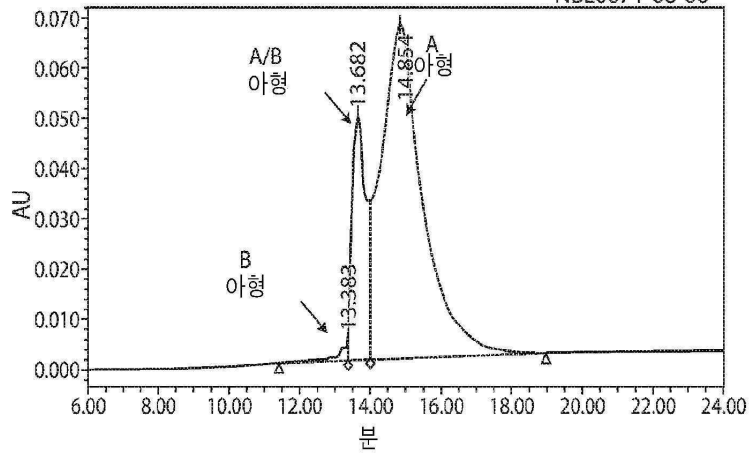
디설피드 결합 아형 RP-HPLC-EBI-031
시료의 비교



도면21

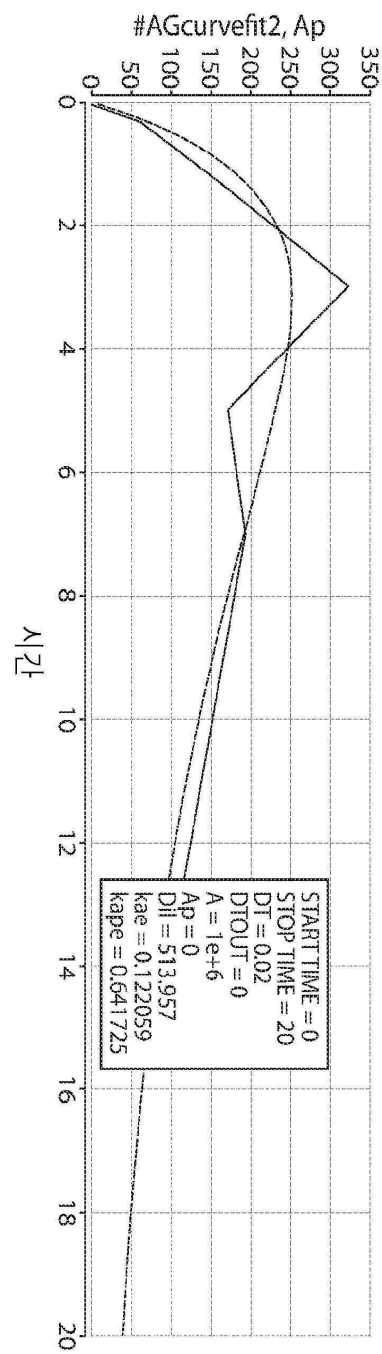
EBI-031(NBL0071-08-06,
200L 생물반응기로부터 BDS, 클론 세포주)
이황화 결합 아형 RP-HPLC

NBL0071-08-06

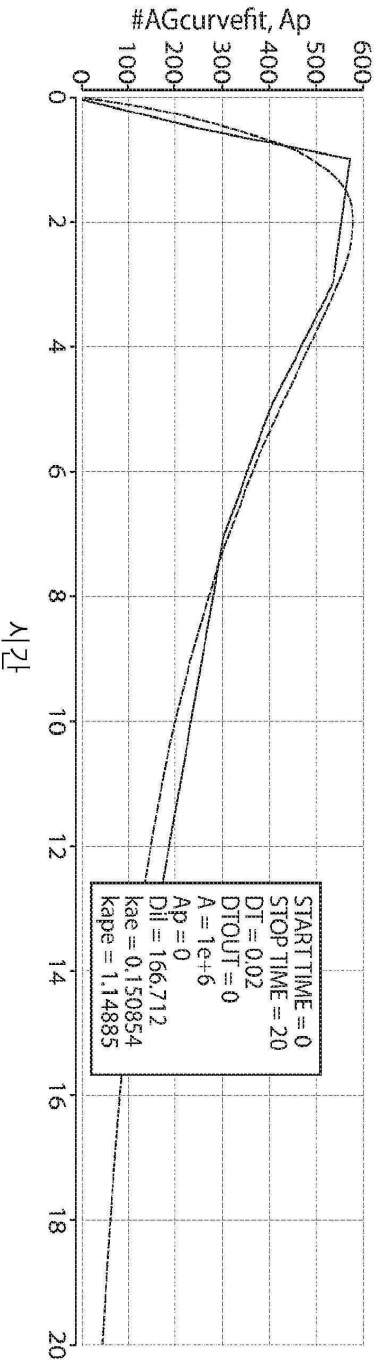


명칭	RT	면적	% 면적
B 아형	13.383	58509	0.85
A/B 아형	13.682	1349980	19.67
A 아형	14.854	5453505	79.47

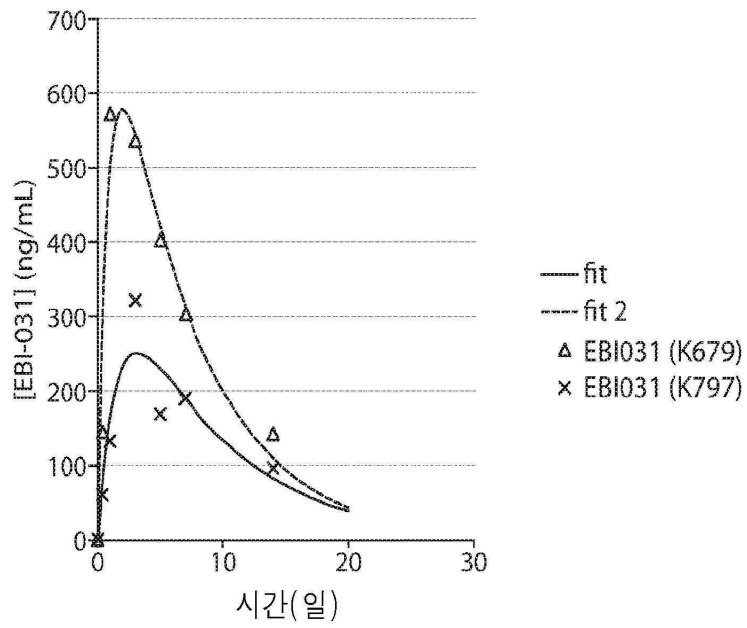
도면22a



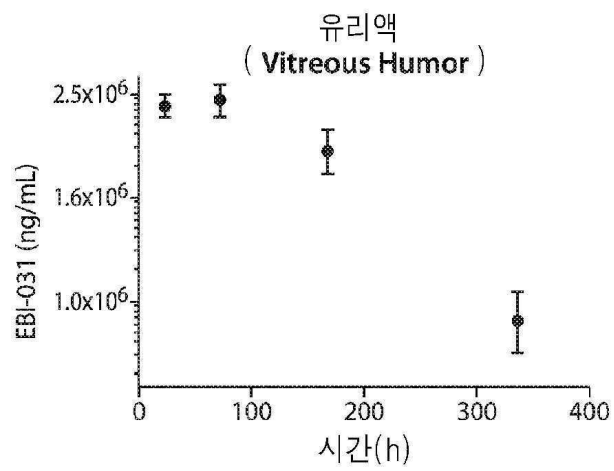
도면22b



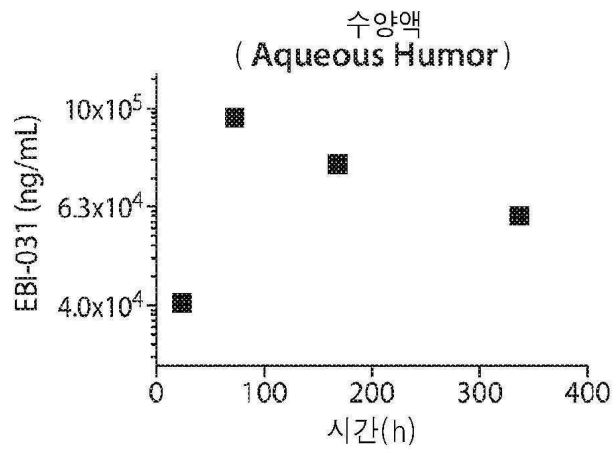
도면23



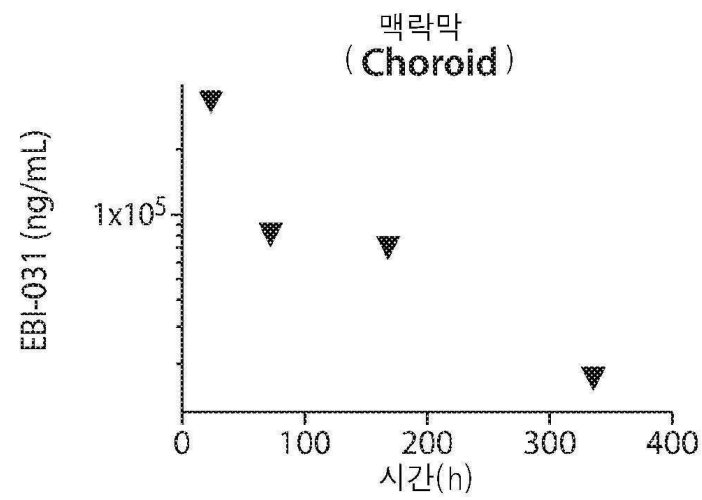
도면24a



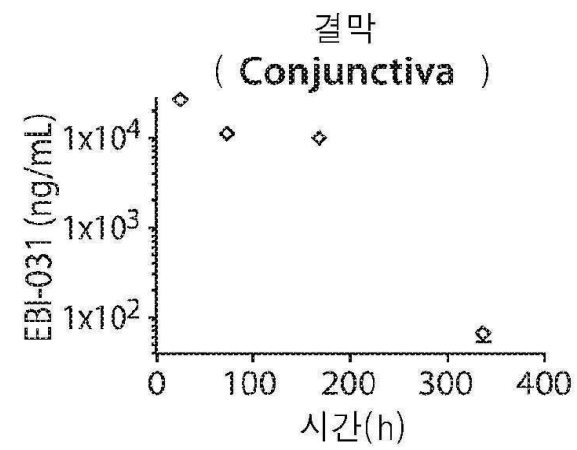
도면24b



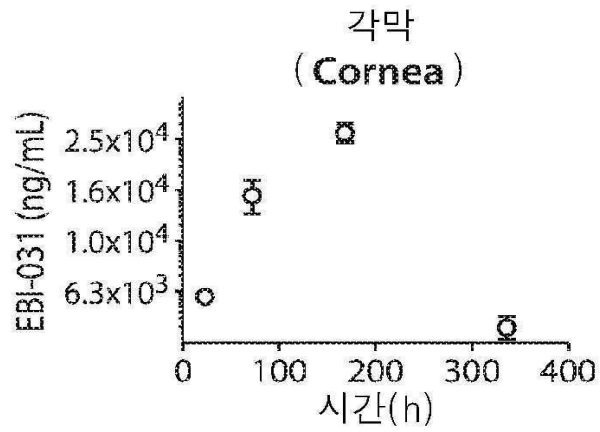
도면24c



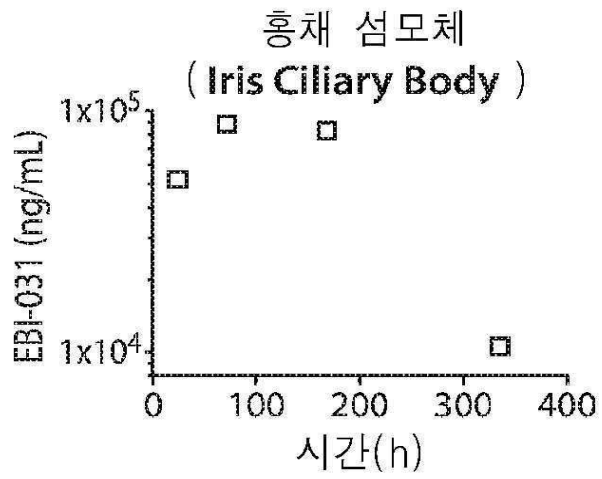
도면24d



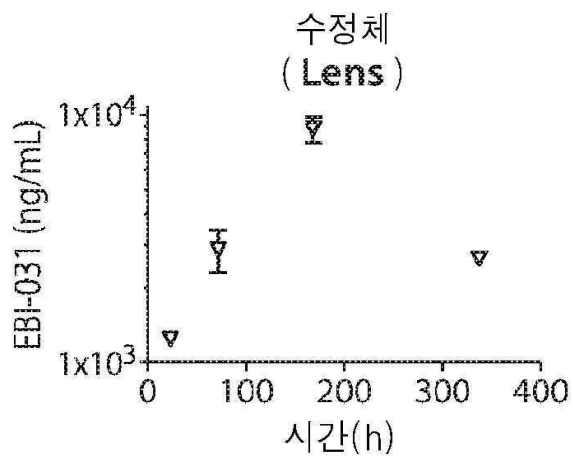
도면24e



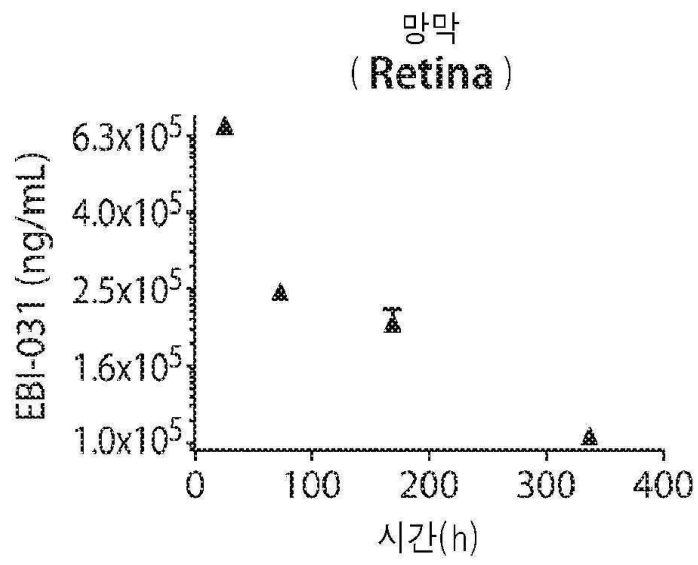
도면24f



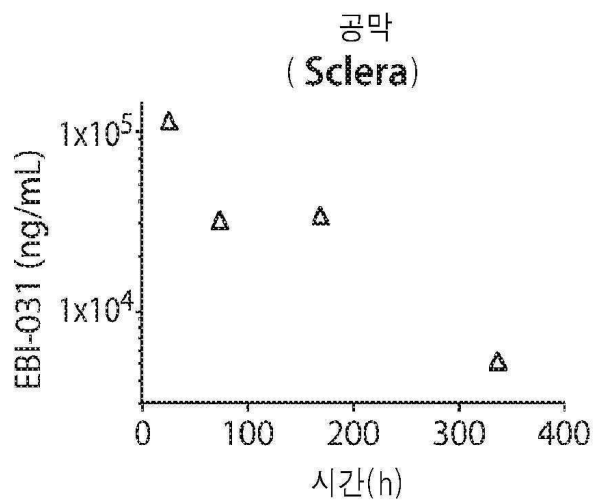
도면24g



도면24h



도면24i



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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