



등록특허 10-2304136



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월23일
(11) 등록번호 10-2304136
(24) 등록일자 2021년09월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032026(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년03월06일
심사청구일자 2020년03월05일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월03일
- (65) 공개번호 10-2017-0125420
- (43) 공개일자 2017년11월14일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7027411
원출원일자(국제) 2015년03월06일
심사청구일자 2016년10월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/019225
- (87) 국제공개번호 WO 2015/134894
국제공개일자 2015년09월11일
- (30) 우선권주장
61/949,932 2014년03월07일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020080110800 A*
Nat. Biotechnol., 28(2):157-159(2010)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
알렉시온 파마슈티칼스, 인코포레이티드
미국 02210 매사추세츠주 보스턴 시포트 블리바드
121
- (72) 발명자
안드리안, 브루스, 에이., 주니어
미국 06437 코네티컷주 길퍼드 펜치 레인 7
쉐리단, 더글라스, 엘.
미국 06405 코네티컷주 브렌포드 웬웨이 로드 33
탐부리니, 폴, 피.
미국 06037 코네티컷주 켄싱턴 데본셔 웨이 80
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 개선된 약동학을 가지는 항-C5 항체

(57) 요약

본 개시내용은 무엇보다도 말단 보체(예를 들어, C5b-9 TCC의 조립 및/또는 활성) 및 C5a 아나필라토xin 매개 염증을 저해하고 따라서 보체 관련 장애를 치료하기에 유용한 항체를 제공한다. 항체는 예를 들어 인간에서 증가한 혈청 반감기를 포함하는 에콜리주맙에 대비된 다수의 개선된 특성을 가진다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 서열 번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
 - (ii) 서열 번호 19에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2,
 - (iii) 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
 - (iv) 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
 - (v) 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
 - (vi) 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3
- 을 포함하는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

- (i) 서열 번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1,
- (ii) 서열 번호 19에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2
- (iii) 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3,
- (iv) 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1,
- (v) 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및
- (vi) 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하고, 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 변이체 인간 Fc 불변 영역을 추가로 포함하며, 상기 변이체 인간 Fc CH3 불변 영역은 EU 넘버링 시스템 하에서, 네이티브 인간 IgG 불변 영역의 428번 위치에서의 메티오닌 및 434번 위치에서의 아스파라гин에 상응하는 위치에 Met-429-Leu 및 Asn-435-Ser 치환을 포함하는 것인, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 번호 12에 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 번호 13에 기재된 중쇄 불변 영역을 포함하는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 번호 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 폴리펩타이드 및 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, $0.1 \text{ nM} \leq K_D \leq 1 \text{ nM}$ 의 범위인 친화도 해리 상수(K_D)로 pH 7.4 및 25°C에서 인간 C5에 결합하는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, $K_D \geq 10 \text{ nM}$ 로 pH 6.0 및 25°C에서 인간 C5에 결합하는, 단리된 항체, 또는 이의 항

원 결합 단편.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, [(pH 6.0 및 25°C에서의 인간 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)/(pH 7.4 및 25°C에서의 인간 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)]가 25 초파인, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 검출 가능한 시알산 잔기를 함유하지 않는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에서 적어도 30일인 혈청 반감기를 가지는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에서 적어도 40일인 혈청 반감기를 가지는, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

약제학적으로 허용되는 담체 및 제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, C5 매개 보체 관련 병태를 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 C5 매개 보체 관련 병태는 류마티스 관절염, 항인지질 항체 증후군, 루프스 신염, 허혈-재관류 손상, 정형 용혈성 요독 증후군, 조밀침착병(dense deposit disease), 시신경 척수염, 다초점 운동 신경병증, 다발성 경화증, 황반변성, HELLP 증후군, 자연 유산, 혈전성 혈소판감소성 자반병, 소수면역 혈관염(Pauci-immune vasculitis), 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa), 재발성 유산, 외상성 뇌 손상, 심근염, 뇌혈관 장애, 말초 혈관 장애, 신혈관 장애, 장간막/장 혈관 장애, 혈관염, 헤노흐-쇤라인 자색반 신장염(Henoch-Schönlein purpura nephritis), 전신 홍반성 낭창 관련 혈관염, 류마티스 관절염을 수반한 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야슈병(Takayasu's disease), 확장성 심근병증, 당뇨병 혈관증, 가와사키병(Kawasaki's disease), 정맥 가스 색전증, 스텐트 배치 후 재협착, 회전죽상반절 제술(rotational atherectomy), 경피적 관상동맥 확장술(percutaneous transluminal coronary angioplasty), 중증 근무력증, 한냉 응집소 질환, 피부근염, 발작성 한냉 혈색소뇨증, 항인지질 증후군, 그레이브병(Graves' disease), 죽상동맥경화증, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전신 염증성 반응 패혈증, 패혈성 쇼크, 척수 손상, 사구체신염, 이식 거부, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 1형 당뇨병, 건선, 천포창, 자가 면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소성 자반병, 굿페스쳐 증후군(Goodpasture's syndrome), 데고스병(Degos disease), 재해성 항인지질 증후군, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH) 및 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 13

(i) 제1항 또는 제2항의 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 (ii) 인간에게 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 전달하기 위한 수단을 포함하는, C5 매개 보체 관련 병태를 겪는 환자의 치료에 사용하기 위한 치료학적 키트로서, 상기 C5 매개 보체 관련 병태는 류마티스 관절염, 항인지질 항체 증후군, 루프스 신염, 허혈-재관류 손상, 정형 용혈성 요독 증후군, 조밀침착병(dense deposit disease), 시신경 척수염, 다초점 운동 신경병증, 다발성 경화증, 황반변성, HELLP 증후군, 자연 유산, 혈전성 혈소판감소성 자반병, 소수면역 혈관염(Pauci-immune vasculitis), 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa), 재발성 유산, 외상성 뇌 손상, 심근염, 뇌혈관 장애, 말초 혈관 장애, 신혈관 장애, 장간막/장 혈관 장애, 혈관염, 헤노흐-쇤라인 자색반 신장염(Henoch-Schönlein purpura nephritis), 전신 홍반성 낭창 관련 혈관염, 류마티스 관절염을 수반한 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야슈병(Takayasu's disease), 확장성 심근병증, 당뇨병 혈관증, 가와사키병(Kawasaki's disease), 정맥 가스 색전증, 스텐트 배치 후 재협착, 회전죽상반절 제술(rotational atherectomy), 경피적 관상동맥 확장술(percudaneous transluminal coronary angioplasty), 중증 근무력증, 한냉 응집소 질환, 피부근염, 발작성 한냉 혈색소뇨증, 항인지질 증후군, 그레이브병(Graves' disease), 죽상동맥경화증, 알츠하이머병(Alzheimer's disease),

disease), 전신 염증성 반응 패혈증, 패혈성 쇼크, 척수 손상, 사구체신염, 이식 거부, 하시모토 갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis), 1형 당뇨병, 건선, 천포창, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소성 자반병, 궤폐스쳐 증후군(Goodpasture's syndrome), 데고스병(Degos disease), 재해성 항인지질 증후군, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH) 및 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 치료학적 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 수단은 주사기인, 치료학적 키트.

청구항 15

제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 16

제2항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 17

서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)을 코딩하는 핵산.

청구항 18

각각 서열 번호 12 및 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)을 코딩하는 핵산.

청구항 19

서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산.

청구항 20

각각 서열 번호 12 및 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산.

청구항 21

서열 번호 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산.

청구항 22

보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산으로서, 상기 중쇄 폴리펩타이드는 서열 번호 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 폴리펩타이드는 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산.

청구항 23

2개의 가변 영역 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자로서, 서열은, 그의 배향과 독립적으로, 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 것인 핵산 분자.

청구항 24

2개의 핵산을 포함하는 혼합물로서, 제1 핵산은 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 코딩하고, 제2 핵산은 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 것인 혼합물.

청구항 25

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제25항에 따른 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, CHO 세포인 세포.

청구항 28

보체 성분 인간 C5에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 핵산에 의해 코딩된 상기 항체의 세포에 의한 발현을 허용하기에 충분한 조건 하에 그리고 충분한 시간 동안 제26항의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리시키는 단계를 추가로 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 30

제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH)을 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 31

제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS)을 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 32

제12항의 약제학적 조성물을 포함하는, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH)을 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 33

제12항의 약제학적 조성물을 포함하는, 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS)을 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 34

C5 매개 보체 관련 병태를 치료하기에 효과적인 양의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 보체 성분 인간 C5에 결합하며, 단편 C5a 및 C5b로의 C5 절단을 저해하고, 또한 서열 번호 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 폴리펩타이드 및 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는, C5 매개 보체 관련 병태를 겪는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 C5 매개 보체 관련 병태는 류마티스 관절염, 항인지질 항체 증후군, 루프스 신염, 허혈-재판류 손상, 정형 용혈성 요독 증후군, 조밀침착병(dense deposit disease), 시신경 척수염, 다초점 운동 신경병증, 다발성 경화증, 항반변성, HELLP 증후군, 자연 유산, 혈전성 혈소판감소성 자반병, 소수면역 혈관염(Pauci-immune vasculitis), 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa), 재발성 유산, 외상성 뇌 손상, 심근염, 뇌혈관 장애, 말초 혈관 장애, 신혈관 장애, 장간막/장 혈관 장애, 혈관염, 헤노흐-쇤라인 자색반 신장염(Henoch-Schönlein purpura nephritis), 전신 홍반성 낭창 관련 혈관염, 류마티스 관절염을 수반한 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야슈병(Takayasu's disease), 확장성 심근병증, 당뇨병 혈관증, 가와사키병(Kawasaki's disease), 정맥 가스 색전증, 스텐트 배치 후 재협착, 회전죽상반절제술(rotational atherectomy), 경피적 관상동맥 확장술(percutaneous transluminal coronary angioplasty), 중증 근무력증, 한냉 응집소 질환, 피부근염, 발작성 한냉 혈색소뇨증, 항인지질 증후군, 그레이브병(Graves' disease), 죽상동맥경화증, 알츠하이머병(Alzheimer's

disease), 전신 염증성 반응 패혈증, 패혈성 쇼크, 척수 손상, 사구체신염, 이식 거부, 하시모토 갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis), 1형 당뇨병, 건선, 천포창, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소성 자반병, 굿페스쳐 증후군(Goodpasture's syndrome), 데고스병(Degos disease), 재해성 항인지질 증후군, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH) 및 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본원은 (2014년 3월 7일에 출원된) 미국 가특허 출원 제61/949,932호에 대한 우선권 및 이의 이익을 주장하고, 이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

본 발명의 분야는 의학, 면역학, 분자 생물학 및 단백질 화학이다.

배경 기술

[0005]

보체 시스템은 세포 및 바이러스 병원균의 침범에 대해 방어하기 위해 신체의 다른 면역계와 함께 작용한다. 혈장 단백질 및 막 보조인자의 복잡한 수집으로서 발견되는 적어도 25개의 보체 단백질이 존재한다. 혈장 단백질은 척추동물 혈청에서 약 10%의 글로불린을 구성한다. 보체 성분은 일련의 복잡하지만, 정확한 효소 절단 및 막 결합 사건에서 상호작용함으로써 이의 면역 방어 기능을 달성한다. 생성된 보체 캐스케이드는 읍소닌, 면역조절 및 용해 기능을 가지는 생성물을 생성시킨다. 보체 활성화와 연관된 생물학적 활성의 정확한 요약이 예를 들어 문헌[The Merck Manual, 16th Edition]에 제공된다.

[0006]

보체 캐스케이드는 전통적인 경로(classical pathway: CP), 렉틴 경로 또는 대안적인 경로(alternative pathway: AP)를 통해 진행할 수 있다. 렉틴 경로는 통상적으로 고만노스 기질에 대한 만노스 결합 렉틴(mannose-binding lectin: MBL)의 결합에 의해 개시된다. AP는 항체 독립적일 수 있고, 병원균 표면에서의 소정의 분자에 의해 개시될 수 있다. CP는 통상적으로 표적 세포 상의 항원 부위의 항체 인식 및 이 부위에 대한 결합에 의해 개시된다. 이 경로는 보체 성분 C3이 활성 프로테아제에 의해 절단되어서 C3a 및 C3b를 생성하는 지점인 C3 전환효소에서 집중된다.

[0007]

AP C3 전환효소는 보체 성분 C3의 자발적 가수분해에 의해 개시되고, 이것은 혈액의 혈장 분획에서 풍부하다. 또한 "틱오버(tickover)"로 공지된 이 과정은 C3에서의 티오에스터 결합의 자발적 절단을 통해 발생하여서 C3i 또는 C3(H₂O)을 형성한다. 틱오버는 활성화된 C3의 결합을 지지하고/하거나, 중성 또는 양전하 특징을 가지는 표면(예를 들어, 박테리아 세포 표면)의 존재에 의해 촉진될 수 있다. 이 C3(H₂O)의 형성은 혈장 단백질 B 인자의 결합을 허용하여서, 결국 D 인자가 B 인자를 절단하여 Ba 및 Bb가 되게 한다. Bb 단편은 C3에 결합된 채 있어서 C3(H₂O)Bb - "유체 상" 또는 "개시" C3 전환효소를 함유하는 복합체를 형성한다. 적은 양으로만 생성되지만, 유체 상 C3 전환효소는 다수의 C3 단백질을 C3a 및 C3b로 절단할 수 있고, C3b를 생성시키고 이에 후속하여 표면(예를 들어, 박테리아 표면)에 공유 결합한다. 표면 결합된 C3b에 결합된 B 인자는 D 인자에 의해 절단되어서, C3b, Bb를 함유하는 표면 결합된 AP C3 전환효소를 형성한다. (예를 들어, 문헌[Muller-Eberhard (1988) *Ann Rev Biochem* 57:321-347] 참조.)

[0008]

(C3b)₂, Bb인 AP C5 전환효소는 AP C3 전환효소에 대한 제2 C3b 단량체의 첨가 시 형성된다. (예를 들어, 문헌 [Medicus et al. (1976) *J Exp Med* 144:1076-1093 및 Fearon et al. (1975) *J Exp Med* 142:856-863] 참조.) 제2 C3b 분자의 역할은 C5에 결합하고 이것을 Bb에 의한 절단에 제시하는 것이다. (예를 들어, 문헌[Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124:326-331] 참조.) AP C3 및 C5 전환효소는 예를 들어 상기 문헌[Medicus et al. (1976)]에 기재된 바대로 삼합체 단백질 프로퍼딘의 첨가에 의해 안정화된다. 그러나, 프로퍼딘 결합은 기능적인 대안적인 경로 C3 또는 C5 전환효소를 형성하는 데 필요하지 않다. (예를 들어, 문헌[Schreiber et al. (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3948-3952 및 Sissons et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 559-562] 참조).

[0009]

CP C3 전환효소는 C1q, C1r 및 C1s와 표적 항원(예를 들어, 미생물 항원)에 결합한 항체의 복합체인 보체 성분 C1의 상호작용 시 형성된다. 항체-항원 복합체에 대한 C1의 C1q 부분의 결합은 C1r을 활성화하는 C1에서 임체구성 변화를 발생시킨다. 이후, 활성 C1r은 C1 관련 C1s를 절단하여서 활성 세린 프로테아제를 생성한다. 활성 C1s는 보체 성분 C4를 C4b 및 C4a로 절단한다. C3b과 같이, 새로 생성된 C4b 단편은 표적 표면(예를 들어, 미생물 세포 표면)에서 적합한 분자와 아마이드 또는 에스터 결합을 용이하게 형성하는 매우 반응성인 티올을 함유한다. C1s는 또한 보체 성분 C2를 C2b 및 C2a로 절단한다. C4b 및 C2a에 의해 형성된 복합체는 CP C3 전환효소이고, 이것은 C3을 C3a 및 C3b로 처리할 수 있다. C4b, C2a, C3b인, CP C5 전환효소는 CP C3 전환효소에 대한 C3b 단량체의 첨가 시 형성된다. (예를 들어, 상기 Muller-Eberhard 문헌(1988) 및 문헌[Cooper et al. (1970) *J Exp Med* 132:775-793] 참조.)

[0010]

C3 및 C5 전환효소에서의 이의 역할 이외에, C3b는 항원 제시 세포, 예컨대 대식세포 및 수지상 세포의 표면에 존재하는 보체 수용체와의 이의 상호작용을 통해 옵소닌으로서 또한 작용한다. C3b의 옵소닌 기능은 일반적으로 보체 시스템의 가장 중요한 감염보호 기능 중 하나인 것으로 생각된다. C3b 기능을 차단하는 유전적 병변을 가지는 환자는 매우 다양한 병원성 유기체에 의한 감염에 걸리기 쉬운 반면, 차후 보체 캐스케이드 서열에서 병변을 가지는 환자, 즉 C5 기능을 차단하는 병변을 가지는 환자는 네이세리아(*Neisseria*) 감염에만 더 걸리기 쉽고, 이후 오직 약간 더 걸리기 쉬운 것으로 발견되었다.

[0011]

AP 및 CP C5 전환효소는 C5를 C5a 및 C5b로 절단한다. C5의 절단은 C5a, 강력한 아나필라토신 및 주화성 인자, 및 C5b를 방출하고, 이것은 용해 말단 보체 복합체, C5b-9의 형성을 허용한다. C5b는 C6, C7 및 C8과 조합되어 표적 세포의 표면에서 C5b-8 복합체를 형성한다. 여러 C9 분자의 결합 시, 막 공격 복합체(MAC, C5b-9, 말단 보체 복합체-TCC)가 형성된다. 충분한 수의 MAC가 표적 세포막으로 삽입될 때, 이들이 생성하는 개구(MAC 기공)는 표적 세포의 신속한 삼투 용해를 매개한다.

[0012]

적절히 작용하는 보체 시스템이 미생물을 감염시키는 것에 대한 탄탄한 방어를 제공하지만, 보체 경로의 부적절한 조절 또는 활성화는 예를 들어 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis: RA); 루프스 신염; 천식; 허혈-재관류 손상; 비정형 용혈성 요독 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS); 조밀침착병(dense deposit disease: DDD); 빨작성 야간혈색소 높증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH); 황반변성(예를 들어, 연령 관련 황반변성(age-related macular degeneration: AMD)); 용혈, 간 효소 상승, 및 저혈소판(hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets: HELLP) 증후군; 혈전성 혈소판감소성 자반병(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP); 자연 유산; 소수면역 혈관염(Pauci-immune vasculitis; 수포성 표피박리증; 재발성 유산; 다발성 경화증(multiple sclerosis: MS); 외상성 뇌 손상; 및 심근경색, 심폐 우회술 및 혈액투석으로부터 생긴 손상을 포함하는 다양한 장애의 발병에 관련된다. (예를 들어, 문헌[Holers et al. (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316] 참조.) 보체 활성화의 하향조절은 다양한 동물 모델에서의 여러 질환 표시를 치료하는 데 있어서 효과적인 것으로 입증되었다. 예를 들어, 문헌[Rother et al. (2007) *Nature Biotechnology* 25(11):1256-1264; Wang et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8563-8568; Wang et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8955-8959; Rinder et al. (1995) *J Clin Invest* 96:1564-1572; Kroshus et al. (1995) *Transplantation* 60:1194-1202; Homeister et al. (1993) *J Immunol* 150:1055-1064; Weisman et al. (1990) *Science* 249:146-151; Amsterdam et al. (1995) *Am J Physiol* 268:H448-H457; 및 Rabinovici et al. (1992) *J Immunol* 149:1744-1750]을 참조한다.

발명의 내용

[0013]

본 개시내용은, 예를 들어 치료학적 목적에 사용되는 공지된 항-C5 항체에 대비된, 하나 이상의 개선된 특징을 가지는 항-C5 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 에콜리주맙의 혈청 제거 반감기에 대비된 증가한 혈청 수명을 나타낸다. 이의 개선된 약동학적 특성으로 인해, 본 명세서에 기재된 항체는 다수의 이점, 예를 들어 전장 또는 성숙 C5에 결합하고 이의 절단을 저해하는 다른 항-C5 항체에 대비된 이점을 특징으로 한다. 이러한 항-C5 항체와 같이, 본 명세서에 기재된 항체는 C5a 매개 염증성 반응 및 C5의 절단으로부터 생긴 C5b (MAC) 의존적 세포 용해를 저해할 수 있다. 그러나, 인간 혈장에서의 C5의 농도가 대략 0.37 μ M 이므로(Rawal and Pangburn (2001) *J Immunol* 166(4):2635-2642), 항-C5 항체, 예컨대 에콜리주맙의 고농도 및/또는 빈번한 투여의 사용은 인간에서 C5를 효과적으로 저해하는 데 대개 필요하다. 본 개시내용은 실험예에서 항-C5 항체가 실험실내 및 생체내 보체를 저해하는 데 있어서 매우 효과적이라는 것을 입증하는 실험 데이터를 기재하였다(예를 들어, 문헌[Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552] 참조), 항체는 혈액 중의 C5의 높은 농도로 인해 표적 매개 청소에 특히 민감하다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 새로운 항체가 표적 매

개 청소에 대한 감소한 감수성을 가지고, 이에 따라 이전에 공지된 항-C5 항체와 비교하여 혈액 중에 더 긴 혈청 제거 반감기(반감기)를 가진다는 것을 또한 보여준다.

[0014] 이의 더 긴 반감기의 관점에서, 본 명세서에 기재된 항체는 이전에 공지된 항-C5 항체(예컨대, 에콜리주맙)보다 훨씬 더 낮은 용량에서 및/또는 덜 빈번하게 인간에게 투여되고, 인간에서 C5와 동일하거나 이것 초과의 저해를 효과적으로 제공할 수 있다. 예를 들어, 에콜리주맙의 용량과 비교하여 더 낮은 용량의 항체를 투여하는 능력은 또한 추가적인 전달 경로, 예를 들어 피하 투여, 근육내 투여, 폐내 전달, 및 생물학적으로 분해 가능한 마이크로구의 사용을 통한 투여를 허용한다.

[0015] 따라서, 일 양상에서, 본 개시내용은 에콜리주맙에 대비된 하나 이상의 개선된 특성(예를 들어, 개선된 약동학적 특성)을 가지는 항-C5 항체를 특징으로 한다. 항체 또는 이의 C5 결합 단편은 (a) 보체 성분 C5에 결합하고; (b) 단편 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 저해하고; (c) (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, (ii) 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, (iii) 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, (iv) 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, (v) 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 것(여기서, (i)-(vi) 중 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개)의 아미노산(들)은 상이한 아미노산에 의해 치환됨)이다. 몇몇 실시형태에서, C5는 인간 C5이다.

[0016] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR1의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR2의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR3의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0017] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR1의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 4에 대해 8번 위치에서의 글리신은 상이한 아미노산(예를 들어, 히스티딘)에 의해 치환된다.

[0018] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR2의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR3의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0019] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 1번 위치에서의 글리신, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 3번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 1에 대한 4번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 1에 대한 5번 위치에서의 세린, 서열 번호 1에 대한 6번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 1에 대한 7번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 8번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 1에 대한 10번 위치에서의 글루타민, 서열 번호 2에 대한 1번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 2번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신, 서열 번호 2에 대한 4번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 2에 대한 5번 위치에서의 글리신, 서열 번호 2에 대한 6번 위치에서의 세린, 서열 번호 2에 대한 7번 위치에서의 글리신, 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린, 서열 번호 2에 대한 9번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 2에 대한 10번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 11번 위치에서의 티로신, 서열 번호 2에 대한 12번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 2에 대한 13번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 14번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 2에 대한 15번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 2에 대한 16번 위치에서의 라이신, 서열 번호 2에 대한 17번 위치에서의 아스파르트산, 서열 번호 3에 대한 1번 위치에서의 티로신, 서열 번호 3에 대한 2번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 3번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 4번 위치에서의 글리신, 서열 번호 3에 대한 5번 위치에서의 세린, 서열 번호 3에 대한 6번 위치에서의 세린, 서열 번호 3에 대한 7번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 3에 대한 8번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 3에 대한 9번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 3에 대한 10번 위치에서의 티로신, 서열 번호 3에 대한 11번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 12번 위치에서의 아스파르트산 및 서열 번호 3에 대한 13번 위치에서의 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다.

[0020] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 4에 대한 8번 위치에서의 글리신, 서열 번호 4에 대한 10번 위치에서의 류신, 서열 번호 6에 대한 3번 위치에서의 발린 및 서열 번호 6에 대한 6번 위치에서의 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다.

- [0021] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다.
- [0022] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신 둘 다는 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.
- [0023] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린 둘 다는 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신 및 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신 둘 다는 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.
- [0024] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린 둘 다는 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 1로부터 선택된 아미노산 치환의 조합을 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.
- [0025] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 아미노산 치환의 조합은 (i) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 4에 대한 8번 위치에서의 글리신에 대한 상이한 아미노산의 치환; (ii) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 글리신에 대한 상이한 아미노산의 치환; 및 (iii) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린에 대한 상이한 아미노산의 치환을 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.
- [0026] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린은 히스티딘에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.
- [0027] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편은 $0.1\text{nM} \leq K_D \leq 1\text{nM}$ 의 범위인 친화도 해리 상수 (K_D)로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편은 $0.2\text{nM} \leq K_D \leq 1\text{nM}$ 의 범위인 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편은 $0.5\text{nM} \leq K_D \leq 1\text{nM}$ 의 범위인 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다.
- [0028] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편은 1nM 이상(예를 들어, 50nM 이상, 100nM 이상 또는 1 μM 이상)인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합한다.
- [0029] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, $[(\text{pH } 6.0 \text{ 및 } 25^\circ\text{C} \text{에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 } K_D) / (\text{pH } 7.4 \text{ 및 } 25^\circ\text{C} \text{에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 } K_D)]$ 는 25 초과이다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, $[(\text{pH } 6.0 \text{ 및 } 25^\circ\text{C} \text{에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 } K_D) / (\text{pH } 7.4 \text{ 및 } 25^\circ\text{C} \text{에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 } K_D)]$ 는 100 초과(예를 들어, 200 초과, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000 또는 8500)이다.
- [0030] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, pH 7.4 및 25°C에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D 는 1nM 미만(예를 들어, 0.9 미만, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 또는 0.1)이다.
- [0031] 실험예에 기재된 바와 같은 여러 변이체 에콜리주맙 분자의 규명에 기초하여, 본 발명자들은 에콜리주맙과 비교하여 개선된 약동학적 특성을 가지는 새로운 항체의 속을 발견하였다. 이 속 내의 항체는 pH 7.4에서 C5에 대한 에콜리주맙의 친화도보다 약한 C5에 대한 친화도를 가진다. 그런데도, 항체는 1nM 이하인 pH 7.4에서 C5에 대한 친화도 해리 상수(K_D)를 가진다. 본 개시내용이 어떤 특정한 이론 또는 작용 기전에 구속되지 않지만, 본 발명자들은 pH 7.4에서 C5에 대한 에콜리주맙의 친화도를 약간 감소시키는 것, 및 pH 7.4 및 pH 6.0에서 친화도의 동

일한/유사한 비율을 유지하면서 pH 6.0에서 C5에 대한 항체의 친화도에 대한 이의 후속하는 효과가 환자에서 생성된 항체의 보체 저해 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 항체의 C5 매개 청소를 실질적으로 감소시킬 것이라는 것을 믿는다. 따라서, 본 발명자들은, 각각 에콜리주맙에 대비된, 필요한 약물학적 특성을 보전하면서, 개선된 약동학적 특성을 발생시키는 항-C5 항체에 대한 최적 친화도 범위를 한정하였다. 따라서, 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 (a) 1nM 이하인 친화도 해리 상수(K_D)로 pH 7.4 및 25°C에서 보체 성분 C5에 결합하고; (b) 10nM 이상인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합하고; (c) 단편 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 저해하고, [(pH 6.0 및 25°C에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)/(pH 7.4 및 25°C에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)]가 25 이상인, 단리된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 특징으로 한다.

[0032] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $0.1nM \leq K_D \leq 1nM$ 의 범위인 친화도 해리 상수(K_D)로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $0.2nM \leq K_D \leq 1nM$ 의 범위인 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $0.5nM \leq K_D \leq 1nM$ 의 범위인 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1nM 이상인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 50nM 이상인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 100nM 이상인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1 μM 이상인 K_D 로 pH 6.0 및 25°C에서 C5에 결합한다.

[0033] 몇몇 실시형태에서, [(pH 6.0 및 25°C에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)/(pH 7.4 및 25°C에서 C5에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 K_D)]는 50 초과(예를 들어, 60 초과, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000 또는 8500)이다.

[0034] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1nM 미만의 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 0.8nM 미만의 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 0.5nM 미만의 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 0.2nM 미만의 K_D 로 pH 7.4 및 25°C에서 C5에 결합한다.

[0035] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (i) 서열 번호 1에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, (ii) 서열 번호 2에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, (iii) 서열 번호 3에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, (iv) 서열 번호 4에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, (v) 서열 번호 5에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 6에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하고, (i)-(vi) 중 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 상이한 아미노산은 임의의 아미노산(예를 들어, 히스티딘)일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR1의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR2의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR1의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR2의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR3의 적어도 하나의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0036] 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 4에 대한 8번 위치에서의 글리신, 서열 번호 4에 대한 10번 위치에서의 류신, 서열 번호 6에 대한 3번 위치에서의 발린 및 서열 번호 6에 대한 6번 위치에서의 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다. 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 1로부터 선택된 아미노산 치환의 조합을 포함한다.

[0037] 몇몇 실시형태에서, CDR로 도입된 아미노산 치환의 조합은 (i) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 4에 대한 8번 위치에서의 글리신에 대한 상이한 아미노산의 치환; (ii) 항체 또는 이의 항

원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 글리신에 대한 상이한 아미노산의 치환; 및 (iii) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린에 대한 상이한 아미노산의 치환을 포함한다.

[0038] 몇몇 실시형태에서, 아미노산 치환의 조합은 (i) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 글리신에 대한 상이한 아미노산의 치환; 및 (ii) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 폴리펩타이드의 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린에 대한 상이한 아미노산의 치환을 포함한다.

[0039] 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린은 (예를 들어, 히스티딘에 의해) 치환된다.

[0040] 몇몇 실시형태에서, 임의의 항체 또는 이의 단편은 변이체 인간 Fc 불변 영역이 유래한 네이티브 인간 Fc 불변 영역보다 큰 친화도로 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 변이체 인간 Fc 불변 영역(예를 들어, 변이체 인간 IgG Fc 불변 영역)을 포함한다. 변이체 Fc 불변 영역은 변이체 인간 Fc 불변 영역이 유래한 네이티브 인간 Fc 불변 영역에 대한 1개 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이상)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 치환은 네이티브 인간 Fc 불변 영역에 대해 예를 들어 237번, 238번, 239번, 248번, 250번, 252번, 254번, 255번, 256번, 257번, 258번, 265번, 270번, 286번, 289번, 297번, 298번, 303번, 305번, 307번, 308번, 309번, 311번, 312번, 314번, 315번, 317번, 325번, 332번, 334번, 360번, 376번, 380번, 382번, 384번, 385번, 386번, 387번, 389번, 424번, 428번, 433번, 434번, 또는 436번 아미노산 위치(EU 넘버링)에서 있을 수 있다. 치환은 237번 위치에서의 글리신에 대한 메티오닌; 238번 위치에서의 프롤린에 대한 알라닌; 239번 위치에서의 세린에 대한 라이신; 248번 위치에서의 라이신에 대한 아이소류신; 250번 위치에서의 트레오닌에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 아이소류신, 메티오닌, 글루타민, 세린, 발린, 트립토판 또는 티로신; 252번 위치에서의 메티오닌에 대한 페닐알라닌, 트립토판 또는 티로신; 254번 위치에서의 세린에 대한 트레오닌; 255번 위치에서의 아르기닌에 대한 글루탐산; 256번 위치에서의 트레오닌에 대한 아스파르트산, 글루탐산 또는 글루타민; 257번 위치에서의 프롤린에 대한 알라닌, 글리신, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 또는 발린; 258번 위치에서의 글루탐산에 대한 히스티딘; 265번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌; 270번 위치에서의 아스파르트산에 대한 페닐알라닌; 286번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 글루탐산; 289번 위치에서의 트레오닌에 대한 히스티딘; 297번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌; 298번 위치에서의 세린에 대한 글리신; 303번 위치에서의 발린에 대한 알라닌; 305번 위치에서의 발린에 대한 알라닌; 307번 위치에서의 트레오닌에 대한 알라닌, 아스파르트산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 발린, 트립토판 또는 티로신; 308번 위치에서의 발린에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 프롤린, 글루타민 또는 트레오닌; 309번 위치에서의 류신 또는 발린에 대한 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 프롤린 또는 아르기닌; 311번 위치에서의 글루타민에 대한 알라닌, 히스티딘 또는 아이소류신; 312번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌 또는 히스티딘; 314번 위치에서의 류신에 대한 라이신 또는 아르기닌; 315번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 히스티딘; 317번 위치에서의 라이신에 대한 알라닌; 325번 위치에서의 아스파라긴에 대한 글리신; 332번 위치에서의 아이소류신에 대한 발린; 334번 위치에서의 라이신에 대한 류신; 360번 위치에서의 라이신에 대한 히스티딘; 376번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌; 380번 위치에서의 글루탐산에 대한 알라닌; 382번 위치에서의 글루탐산에 대한 알라닌; 384번 위치에서의 아스파라긴 또는 세린에 대한 알라닌; 385번 위치에서의 글리신에 대한 아스파르트산 또는 히스티딘; 386번 위치에서의 글루타민에 대한 프롤린; 387번 위치에서의 프롤린에 대한 글루탐산; 389번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 세린; 424번 위치에서의 세린에 대한 알라닌; 428번 위치에서의 메티오닌에 대한 알라닌, 아스파르트산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판 또는 티로신; 433번 위치에서의 히스티딘에 대한 라이신; 434번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 히스티딘, 세린, 트립토판 또는 티로신; 및 436번 위치에서의 티로신 또는 페닐알라닌에 대한 히스티딘(모두 EU 넘버링임)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0041] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편의 몇몇 실시형태에서, 변이체 인간 Fc 불변 영역은 각각 EU 넘버링에서 428번 위치에서의 메티오닌 및 434번 위치에서의 아스파라긴을 포함한다.

[0042] 몇몇 실시형태에서, 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 12 또는 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 폴리펩타이드 및 서열 번호 8 또는 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

- [0043] 본 개시내용은 또한 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역(서열 번호 7) 또는 에콜리주맙의 중쇄 영역의 CDR(서열 번호 1-3) 및 본 명세서에 기재된 임의의 변이체 인간 Fc 불변 영역, 예를 들어 각각 EU 넘버링에서 428번 위치에서의 메티오닌 및 434번 위치에서의 아스파라гин을 포함하는 변이체 인간 Fc 불변 영역을 포함하는 항체를 특징으로 한다.
- [0044] 일 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 에콜리주맙의 혈청 중의 반감기에 대비된 인간에서 증가한 반감기를 가진다. 반감기는 본 명세서에 사용되는 바대로 신체에서의 항체 약물의 혈장 농도가 절반 또는 50%로 감소하는 데 걸리는 시간으로 정의된다. 혈청 농도에서의 이 50% 감소는 항체 청소의 천연 방법에 의해 제거되지 않는 순환하는 약물의 양을 반영한다. 에콜리주맙의 반감기는 PNH 환자에서 272 + 82시간 또는 11.3일 및 aHUS 환자에서 12.1일인 것으로 결정되었다(솔리리스(Soliris) 처방 정보 참조). 본 명세서에 기재된 항체 또는 단편의 인간에서의 반감기는 에콜리주맙의 인간에서의 반감기에 대비해 증가할 수 있다. 에콜리주맙에 대비된 반감기 증가는 에콜리주맙의 반감기의 적어도 1.5배, 에콜리주맙의 반감기의 적어도 2배, 에콜리주맙의 반감기의 적어도 2.5배 또는 에콜리주맙의 반감기의 적어도 3배일 수 있다.
- [0045] 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편의 몇몇 실시형태에서, 항체는 적어도 10일 또는 초과(예를 들어, 적어도 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 33일, 34일, 35일, 36일, 37일, 38일, 39일 또는 40일)인 인간에서의 혈청 반감기를 가진다. 이 반감기(또는 에콜리주맙에 대비된 반감기의 연장)는 몇몇 실시형태에서 천연 발생 인간 Fc 불변 영역을 함유하는 본 명세서에 기재된 항체에 의해 달성될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 반감기는 본 명세서에 기재된 변이체 인간 Fc 불변 영역을 포함하는 항체에 대비되어 측정된다. 본 명세서에 기재된 항체 또는 단편의 인간에서의 반감기는 에콜리주맙의 인간에서의 반감기에 대비해 증가할 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체의 인간에서의 반감기는 적어도 25일, 적어도 26일, 적어도 27일, 적어도 28일, 적어도 29일, 적어도 30일, 적어도 31일, 적어도 32일, 적어도 33일, 적어도 34일 또는 적어도 35일이다.
- [0046] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 단편은 인간화, 완전 인간, 탈면역화 또는 키메라이다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 단편은 예를 들어 재조합 항체, 단쇄 항체, 다이아바디, 인트라바디, Fv 단편, Fd 단편, Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab')₂ 단편일 수 있다.
- [0047] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 단편은 비상동성 모이어티, 예를 들어 당을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 글라이코실화될 수 있다. 비상동성 모이어티는 또한 검출 가능한 라벨, 예를 들어 형광 라벨, 발광 라벨, 중금속 라벨, 방사성 라벨 또는 효소 라벨일 수 있다.
- [0048] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CHO 세포에서 제조될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 시알산 잔기를 함유하지 않는다.
- [0049] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a) 순환 시 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 안정화 및 (b) 순환 시 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 보유 중 하나 또는 둘 다를 개선하는 모이어티에 의해 변형될 수 있다. 이러한 모이어티는 PEG(PEG화)일 수 있다.
- [0050] 훨씬 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 다를 코딩하는 핵산을 특징으로 한다. 핵산을 포함하는 벡터(예를 들어, 클로닝 또는 발현 벡터) 및 벡터를 포함하는 세포(예를 들어, 곤충 세포, 박테리아 세포, 진균 세포, 또는 포유동물 세포)를 또한 특징으로 한다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 임의로 발현 벡터(통합된 또는 염색체외)를 함유하는 상기 기재된 세포(또는 세포의 배양)를 제공하는 단계를 포함하고, 벡터는 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 다를 코딩하는 핵산을 함유한다. 세포 또는 세포의 배양물은 핵산에 의해 코딩된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 세포(또는 세포의 배양물)에 의한 발현을 허용하기에 충분한, 시간 동안 및 조건 하에, 배양된다. 상기 방법은 세포(또는 배양물의 세포)로부터 또는 세포 또는 세포들이 배양되는 배지로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리시키는 것을 또한 포함할 수 있다.
- [0051] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 약제학적으로 허용되는 담체 및 하나 이상의 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0052] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 (i) 하나 이상의 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 (ii) 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인간에게 전달하기 위한 수단을 포함하는 치료학적 키트를 특징으로

한다. 수단은 예를 들어 주사기 또는 펌프일 수 있다.

[0053] 훨씬 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 라벨 및 하나 이상의 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 용기를 포함하는 제조 물품을 특징으로 하고, 라벨은 조성물이 보체 관련 병태를 가지거나, 이것을 가지는 것으로 의심되거나, 이것이 발병할 위험에 처해있는 인간에게 투여된다는 것을 표시한다. 제조 물품은 보체 관련 병태를 가지거나, 이것을 가지는 것으로 의심되거나, 이것이 발병할 위험에 처해있는 인간을 치료하기 위한 용도를 위해 하나 이상의 추가적인 활성 치료제를 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 보체 관련 병태를 겪는 환자를 치료하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 보체 관련 병태를 치료하기에 효과적인 양으로 하나 이상의 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 보체 관련 병태는 예를 들어 류마티스 관절염, 항인지질 항체 증후군, 루프스 신염, 허혈-재판류 손상, 비정형 용혈성 요독 증후군, 정형 용혈성 요독 증후군, 발작성 야간혈색소 높증, 조밀침착병, 시신경 척수염, 다초점 운동 신경병증, 다발성 경화증, 황반변성, HELLP 증후군, 자연유산, 혈전성 혈소판감소성 자반병, 소수면역 혈관염, 수포성 표피박리증, 재발성 유산, 외상성 뇌 손상, 심근염, 뇌혈관 장애, 말초 혈관 장애, 신혈관 장애, 장간막/장 혈관 장애, 혈관염, 헤노호-쇤라인 자색반 신장염, 전신 홍반성 낭창 관련 혈관염, 류마티스 관절염을 수반한 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야수병, 확장성 심근병증, 당뇨병 혈관증, 가와사키병, 정맥 가스 색전증, 스텐트 배치 후 재협착, 회전죽상반절제술, 경피적 관상동맥 확장술, 중증 근무력증, 한냉 응집소 질환, 피부근염, 발작성 한냉 혈색소뇨증, 항인지질 증후군, 그레이브병, 죽상동맥경화증, 알츠하이머병, 전신 염증성 반응 폐혈증, 폐혈성 쇼크, 척수 손상, 사구체신염, 이식 거부(예를 들어, 신장 이식), 하시모토 갑상선염, 1형 당뇨병, 건선, 천포창, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소성 자반병, 굿페스쳐 증후군, 테고스병 및 재해성 항인지질 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "항체"는 2개의 경쇄 폴리펩타이드 및 2개의 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 전체 항체를 의미한다. 전체 항체는 IgM, IgG, IgA, IgD, 및 IgE 항체를 포함하는 상이한 항체 아이소타입을 포함한다. 용어 "항체"는 다중클론 항체, 단일클론 항체, 키메라화 또는 키메라 항체, 인간화된 항체, 원시류화 항체, 탈면역화 항체, 및 완전 인간 항체를 포함한다. 항체는 임의의 다양한 종, 예를 들어 포유동물, 예컨대 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 오랑우탄, 개코원숭이 또는 침팬지), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 게르빌루스쥐, 햄스터, 랙트 및 마우스에서 제조되거나 이로부터 유래할 수 있다. 항체는 정제된 또는 재조합 항체일 수 있다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "항체 단편", "항원 결합 단편" 또는 유사한 용어는 표적 항원에 결합하고 표적 항원의 활성을 저해하는 능력을 보유하는 항체(예를 들어, 인간 C5)의 단편을 의미한다. 이러한 단편은 예를 들어 단쇄 항체, 단쇄 Fv 단편(scFv), Fd 단편, Fab 단편, Fab' 단편 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다. scFv 단편은 scFv가 유래한 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다를 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬이다. 또한, 인트라바디, 미니바디, 트리아바디 및 다이아바디가 항체의 정의에 또한 포함되고, 본 명세서에 기재된 방법에서 사용하기에 적합하다. 예를 들어, 문헌[Todorovska et al. (2001) *J Immunol Methods* 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283](각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)을 참조한다.

[0057] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "항체 단편"은 또한 예를 들어 단일 도메인 항체, 예컨대 낙타화 단일 도메인 항체를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38]; PCT 출원 공보 WO 제94/04678호 및 WO 제94/25591호; 및 미국 특허 제6,005,079호(모두 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)를 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 단일 도메인 항체가 형성되도록 변형을 가지는 2개의 VH 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공한다.

[0058] 몇몇 실시형태에서, 항원 결합 단편은 중쇄 폴리펩타이드의 가변 영역 및 경쇄 폴리펩타이드의 가변 영역을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항원 결합 단편은 항체의 경쇄 및 중쇄 폴리펩타이드의 CDR을 포함한다.

[0059] 달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 분야의 당업자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 바람직한 방법 및 재료가 하기 기재되어 있지만, 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료는 현재 개시된 방법 및 조성물의 실행 또는 시험에서 또한 사용될

수 있다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특히 출원, 특히 및 다른 참조문헌은 참조문헌으로 그 전문이 인용된다.

[0060] 본 개시내용, 예를 들어 보체 관련 병태를 치료하거나 예방하는 방법의 다른 특징 및 이점은 하기 설명, 예 및 청구항으로부터 명확할 것이다.

서열의 간단한 설명

[0062] **서열 번호 1**은 (통합 카밧-쵸티아 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열을 도시한다.

[0063] **서열 번호 2**는 (카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 중쇄 CDR2의 아미노산 서열을 도시한다.

[0064] **서열 번호 3**은 (통합 카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 중쇄 CDR3의 아미노산 서열을 도시한다.

[0065] **서열 번호 4**는 (카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 경쇄 CDR1의 아미노산 서열을 도시한다.

[0066] **서열 번호 5**는 (카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 경쇄 CDR2의 아미노산 서열을 도시한다.

[0067] **서열 번호 6**은 (카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 경쇄 CDR3의 아미노산 서열을 도시한다.

[0068] **서열 번호 7**은 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0069] **서열 번호 8**은 에콜리주맙 및 BNJ441 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0070] **서열 번호 9**는 에콜리주맙의 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0071] **서열 번호 10**은 에콜리주맙의 전체 중쇄의 아미노산 서열을 도시한다.

[0072] **서열 번호 11**은 에콜리주맙 및 BNJ441 항체의 전체 경쇄의 아미노산 서열을 도시한다.

[0073] **서열 번호 12**는 BNJ441 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0074] **서열 번호 13**은 BNJ441 항체의 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0075] **서열 번호 14**는 BNJ441 항체의 전체 중쇄의 아미노산 서열을 도시한다.

[0076] **서열 번호 15**는YTE 치환을 포함하는 IgG2 중쇄 불변 영역 변이체의 아미노산 서열을 도시한다.

[0077] **서열 번호 16**은 (상기) 서열 번호 15에 기재된 중쇄 불변 영역을 포함하는 에콜리주맙 변이체의 전체 중쇄의 아미노산 서열을 도시한다.

[0078] **서열 번호 17**은 서열 번호 4에 대한 8번 위치에서의 히스티딘에 대한 글리신 치환을 가지는 (카밧 정의 하에 정의된 바와 같은) 에콜리주맙의 경쇄 CDR1의 아미노산 서열을 도시한다.

[0079] **서열 번호 18**은 EHG303 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

[0080] **서열 번호 19**는 8번 위치에서의 서열 번호 2에 대한 세린이 히스티딘에 의해 치환된 에콜리주맙의 중쇄 CDR2의 아미노산 서열을 도시한다.

[0081] **서열 번호 20**은 소위 "FLAG" 태그의 아미노산 서열을 도시한다.

[0082] **서열 번호 21**은 항원 태그로서 흔히 사용되는 폴리히스티딘 서열을 도시한다.

[0083] **서열 번호 22**는 소위 헤마글루티닌 태그의 아미노산 서열을 도시한다.

[0084] **서열 번호 23**은 (서열 번호 1에 대한) 2번 위치에서의 티로신이 히스티딘에 의해 치환된 에콜리주맙의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열을 도시한다.

[0085] **서열 번호 24**는 EHG303 항체의 중쇄 폴리펩타이드 아미노산 서열을 도시한다.

[0086] **서열 번호 25**는 EHG303 항체의 경쇄 폴리펩타이드 아미노산 서열을 도시한다.

[0087] **서열 번호 26**은 EHL049 항체의 중쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 도시한다.

[0088] **서열 번호 27**은 EHL049 항체의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 도시한다.

[0089] **서열 번호 28**은 EHL000 중쇄 폴리펩타이드 아미노산 서열을 도시한다.

- [0090] 서열 번호 29는 EHL000 항체의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0091] 서열 번호 30은 BHL006의 경쇄 폴리펩타이드 아미노산 서열을 도시한다.
- [0092] 서열 번호 31은 BHL006 항체의 중쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0093] 서열 번호 32는 BHL009 항체의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0094] 서열 번호 33은 BHL009 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0095] 서열 번호 34는 BHL0011 항체의 경쇄의 아미노산 서열을 도시한다.
- [0096] 서열 번호 35는 BHL011 항체의 중쇄의 아미노산 서열을 도시한다.

도면의 간단한 설명

- [0097] 도 1은 외인성 인간 C5의 존재 또는 부재 하의 인간 FcRn 형질전환 마우스의 혈청으로부터의 에콜리주맙의 청소를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 혈청에 남은 항체의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.
- 도 2는 IgG2 불변 영역을 가지는 에콜리주맙 변이체(Ecu-IgG2) 및 마우스로부터의 혈청으로부터YTE 치환을 함유하는 Ecu-IgG2 항체(Ecu-IgG2(YTE))의 청소를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 혈청에 남은 항체의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.
- 도 3은 IgG2 불변 영역불변 영역을 가지는 에콜리주맙 변이체(Ecu-IgG2) 및 마우스로부터의 혈청으로부터YTE 치환을 함유하는 Ecu-IgG2 항체(Ecu-IgG2(YTE))의 청소를 도시하는 선 그래프이다. 실험을 외인성 인간 C5의 존재 또는 부재 하에 수행한다. Y축은 혈청에 남은 항체의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.
- 도 4는 EHL000, EHG303 및 EHL049의 3개의 항-C5 항체에 대한 (pH 7.4에서의) 결합 및 (pH 7.4 및 pH 6.0에서의) 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 임의 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다.
- 도 5a는 EHG303(Y27H-S57H 이중 치환) 항체, 에콜리주맙의 Y27H 단일 치환 변이체 및 에콜리주맙(ecu; Ec293F)에 대한 pH 7.4 및 pH 6.0에서의 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 나노미터(nm) 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다.
- 도 5b는 EHG304(I34H-L52H 이중 치환) 항체, 에콜리주맙의 I34H 단일 치환 변이체 및 에콜리주맙(ecu; Ec293F)에 대한 pH 7.4 및 pH 6.0에서의 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 나노미터(nm) 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다. EHG304 항체는 선택에 대한 제2 한계치를 충족하지 않고, 즉 이것은 pH 7.4에서의 해리에 대해 (에콜리주맙으로부터의) 최대 허용 변경을 초과하였다.
- 도 5c는 EHG303(Y27H-S57H 이중 치환) 항체 및 에콜리주맙(ecu; Ec293F)에 대한 pH 7.4 및 pH 6.0에서의 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 나노미터(nm) 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다.
- 도 5d는 EHL049 [G31H(경쇄)/Y27H-S57H 이중 치환(중쇄)] 항체, 에콜리주맙의 Y27H-S57H(EHG303) 이중 치환 변이체 및 에콜리주맙(ecu)에 대한 pH 7.4 및 pH 6.0에서의 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 나노미터(nm) 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다.
- 도 5e는 EHL058 [G31H(경쇄)/L52H-S57H 이중 치환(중쇄)] 항체, 에콜리주맙의 L52H-S57H 이중 치환 (중쇄) 변이체 및 에콜리주맙(ecu)에 대한 pH 7.4 및 pH 6.0에서의 해리의 동역학을 도시하는 센서그램 도면이다. Y축은 나노미터(nm) 단위인 반면, X축은 (초 단위의) 시간을 나타낸다. EHL058 항체는 선택에 대한 제2 한계치를 충족하지 않고, 즉 이것은 pH 7.4에서의 해리에 대해 (에콜리주맙으로부터의) 최대 허용 변경을 초과하였다.
- 도 6은 NOD/scid/C5 결핍 마우스의 혈청으로부터의 EHL000, BNJ421 및 BNJ423의 청소를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 혈청에 남은 항체의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.
- 도 7은 인간 C5의 존재 또는 부재 하의 NOD/scid/C5 결핍 마우스의 혈청으로부터의 EHL000, BNJ421 및 BNJ423의 청소를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 혈청에 남은 항체의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.
- 도 8은 생체외 용혈성 검정에서 EHL000, BNJ423, 및 BNJ421 항체의 활성을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 용혈

의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 9a는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL011 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 9b는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL011 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 각각의 시점에서의 혈청에 남은 1일에서의 항체의 농도(%)를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 10a는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL006 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 10b는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL006 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 각각의 시점에서의 혈청에 남은 1일에서의 항체의 농도(%)를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 11a는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL009 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 11b는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL009 항체의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 상이한 동물을 나타낸다. Y축은 각각의 시점에서의 혈청에 남은 1일에서의 항체의 농도(%)를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 12는 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL011, BHL006 및 BHL009 항체의 평균 약동학의 로그 도면을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 표시된 바와 같은 상이한 항체를 나타낸다. Y축은 각각의 시점에서의 혈청에 남은 1일에서의 항체의 농도(%)를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 13은 hFcRn-형질전환 마우스에서의 BHL011, BHL006 및 BHL009 항체의 평균 약동학의 선형 도면을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 표시된 바와 같은 상이한 항체를 나타낸다. Y축은 각각의 시점에서의 혈청에 남은 1일에서의 항체의 농도(%)를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 14는 단일 투약 후 생체외 혈청 용혈성 검정에서 BHL011 항체의 차단 능력을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 15는 단일 투약 후 생체외 혈청 용혈성 검정에서 BHL006 항체의 차단 능력을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 16은 단일 투약 후 생체외 혈청 용혈성 검정에서 BHL009 항체의 차단 능력을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 17은 단일 투약 후 BHL011 혈청 농도와 생체외 혈청 용혈성 활성의 상관관계를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체 농도를 나타낸다.

도 18은 단일 투약 후 BHL006 혈청 농도와 생체외 혈청 용혈성 활성의 상관관계를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체 농도를 나타낸다.

도 19는 단일 투약 후 BHL009 혈청 농도와 생체외 혈청 용혈성 활성의 상관관계를 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체 농도를 나타낸다.

도 20은 hFcRn-형질전환 마우스에서 BHL011, BHL009 또는 BHL006의 단일 투약 후 평균 생체외 용혈성 활성을 도시하는 선 그래프이다. 각각의 선은 표시된 바와 같은 상이한 항체를 나타낸다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 21a 및 **도 21b**는 pH의 함수로서 BNJ441 및 에콜리주맙의 친화도의 반로그(도 21a) 및 선형(도 21b) 도면을 도시하는 한 쌍의 선 그래프이다. Y축은 해리(%)를 나타내고, X축은 pH이다.

도 22는 NOD/scid 마우스에서의 및 인간 C5의 부재 하에 BNJ441 및 에콜리주맙의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 23은 NOD/scid 마우스에서의 및 인간 C5의 존재 하의 BNJ441 및 에콜리주맙의 약동학을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 24는 시간의 함수로서 인간 C5의 존재 하의 NOD/scid 마우스의 혈청에 남은 BNJ441 및 에콜리주맙의 백분율을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위의 항체의 농도를 나타낸다. X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 25는 시간의 함수로서 단일 투약 후 BNJ441 항체 및 에콜리주맙의 생체외 혈청 용혈성 차단 활성을 도시하는 선 그래프이다. Y축은 (투약 전 수준에 대한) 용혈의 백분율을 나타내고, X축은 일 단위의 시간을 나타낸다.

도 26은 건강한 지원자에 대한 200mg 또는 400mg의 용량의 정맥내 투여 후 평균 혈청 BNJ441 농도-시간 프로필 (상부 패널 - 선형 스케일; 하부 패널 - 로그-선형 스케일)을 도시한다.

도 27은 건강한 지원자에 대한 위약, 200mg의 BNJ441 또는 400mg의 BNJ441의 정맥내 투여 후 평균 닦 적혈구 용혈-시간 프로필을 도시한다.

도 28은 건강한 인간 지원자에 대한 BNJ441의 정맥내 투여 후 BNJ441 농도와 닦 적혈구 용혈(%) 사이의 관계식을 도시한다.

도 29는 말단 보체 활성 검정에서의 에콜리주맙과 비교된 BNJ441의 효력을 도시한다.

도 30은 BNJ441의 구조를 도시한다.

도 31은 BNJ441의 사슬간 다이설파이드 결합을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098]

본 개시내용은 무엇보다도 말단 보체(예를 들어, C5b-9 TCC의 조립 및/또는 활성) 및 C5a 아나필라톡신 매개 염증을 저해하고 따라서 보체 관련 장애를 치료하기에 유용한 항체를 제공한다. 항체는 예를 들어 인간에서 증가한 혈청 반감기를 포함하는 에콜리주맙에 대비된 다수의 개선된 특성을 가진다. 어떤 방식으로든 제한이도록 의도되지 않으면서, 예시적인 항체, 접합체, 약제학적 조성을 및 제제, 및 임의의 이들을 사용한 방법이 하기 기술되고, 실험예에 예시되어 있다.

[0099]

항체

[0100]

본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 보체 성분 C5(예를 들어, 인간 C5)에 결합하고, 단편 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 저해한다. 상기 기재된 바와 같이, 이러한 항체는 또한 치료학적 목적에 사용되는 다른 항-C5 항체(예를 들어, 에콜리주맙)에 대비된 예를 들어 개선된 약동학적 특성을 가진다.

[0101]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, (ii) 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, (iii) 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, (iv) 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, (v) 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 (vi) 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하고, (i)-(vi) 중 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상)의 아미노산(들)은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0102]

CDR의 정확한 경계는 상이한 방법에 따라 상이하게 한정된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 또는 중쇄 가변 도메인 내의 CDR 또는 프레임워크 영역의 위치는 카밧 등[(1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest." NIH Publication No. 91-3242, 미국 보건사회복지부(메릴랜드주 베데스다)]에 의해 정의될 수 있다. 이러한 경우에, CDR은 "카밧 CDR"(예를 들어, "카밧 LCDR2" 또는 "카밧 HCDR1")이라 칭해질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 CDR의 위치는 췌티아 등[(1989) *Nature* 342:877-883]에 의해 정의될 수 있다. 따라서, 이 영역은 "촘티아 CDR"(예를 들어, "촘티아 LCDR2" 또는 "촘티아 HCDR3")이라 칭해질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 CDR의 위치는 카밧-촘티아 통합 정의에 의해 정의될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 이 영역은 "조합 카밧-촘티아 CDR"이라 칭해질 수 있다. 토마스(Thomas) 등[(1996) *Mol Immunol* 33(17/18):1389-1401]은 카밧 및 췌티아 정의에 따라 CDR 경계의 확인을 예시한다.

[0103]

임의의 아미노산은 임의의 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 치환은 보존적 치환이다. 보존적 치환은 통상적으로 하기 기 내의 치환을 포함한다: 글리신 및 알라닌; 발린, 아이소류신 및 류신; 아스파르트산 및 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민, 세린 및 트레오닌; 라이신, 히스티딘 및 아르기닌; 및 페닐알라닌 및 티로신. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산은 히스티딘에 의해 치환된다.

[0104]

몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR1의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR2의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는

5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 CDR3의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0105] 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR1의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR2의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 CDR3의 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산은 상이한 아미노산에 의해 치환된다.

[0106] 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 1에 대한 1번 위치에서의 글리신, 서열 번호 1에 대한 2번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 3번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 1에 대한 4번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 1에 대한 5번 위치에서의 세린, 서열 번호 1에 대한 6번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 1에 대한 7번 위치에서의 티로신, 서열 번호 1에 대한 8번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 1에 대한 9번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 1에 대한 10번 위치에서의 글루타민, 서열 번호 2에 대한 1번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 2번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 2에 대한 3번 위치에서의 류신, 서열 번호 2에 대한 4번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 2에 대한 5번 위치에서의 글리신, 서열 번호 2에 대한 6번 위치에서의 세린, 서열 번호 2에 대한 7번 위치에서의 글리신, 서열 번호 2에 대한 8번 위치에서의 세린, 서열 번호 2에 대한 9번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 2에 대한 10번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 11번 위치에서의 티로신, 서열 번호 2에 대한 12번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 2에 대한 13번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 2에 대한 14번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 2에 대한 15번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 2에 대한 16번 위치에서의 라이신, 서열 번호 2에 대한 17번 위치에서의 아스파르트산, 서열 번호 3에 대한 1번 위치에서의 티로신, 서열 번호 3에 대한 2번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 3번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 4번 위치에서의 글리신, 서열 번호 3에 대한 5번 위치에서의 세린, 서열 번호 3에 대한 6번 위치에서의 세린, 서열 번호 3에 대한 7번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 3에 대한 8번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 3에 대한 9번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 3에 대한 10번 위치에서의 티로신, 서열 번호 3에 대한 11번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 3에 대한 12번 위치에서의 아스파르트산 및 서열 번호 3에 대한 13번 위치에서의 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 치환이 이루어진다.

[0107] 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 8에 대한 31번 위치에서의 글리신은 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 예를 들어, 에콜리주맙의 경쇄의 CDR1에서의 밀줄표시된 글리신은 상이한 아미노산에 의해 치환될 수 있다: GASENIY~~GALN~~(서열 번호 4). 치환은 글리신에 대한 히스티딘, 즉 GASENIY~~HALN~~(서열 번호 17)일 수 있다.

[0108] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 7에 대한 26번 위치에서의 글리신, 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 28번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 29번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 7에 대한 30번 위치에서의 세린, 서열 번호 7에 대한 31번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 7에 대한 32번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 33번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 35번 위치에서의 글루타민, 서열 번호 7에 대한 50번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 7에 대한 51번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신, 서열 번호 7에 대한 53번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 7에 대한 54번 위치에서의 글리신, 서열 번호 7에 대한 55번 위치에서의 세린, 서열 번호 7에 대한 56번 위치에서의 글리신, 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린, 서열 번호 7에 대한 58번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 7에 대한 59번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 7에 대한 60번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 61번 위치에서의 트레오닌, 서열 번호 7에 대한 62번 위치에서의 글루탐산, 서열 번호 7에 대한 63번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 7에 대한 64번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 7에 대한 65번 위치에서의 라이신, 서열 번호 7에 대한 66번 위치에서의 아스파르트산, 서열 번호 7에 대한 99번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 100번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 7에 대한 101번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 7에 대한 102번 위치에서의 글리신, 서열 번호 7에 대한 103번 위치에서의 세린, 서열 번호 7에 대한 104번 위치에서의 세린, 서열 번호 7에 대한 105번 위치에서의 프롤린, 서열 번호 7에 대한 106번 위치에서의 아스파라긴, 서열 번호 7에 대한 107번 위치에서의 트립토판, 서열 번호 7에 대한 108번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 109번 위치에서의 페닐알라닌, 서열 번호 7에 대한 110번 위치에서의 아스파르트산 및 서열 번호 7에 대한 111번 위치에서의 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 항-C5 항체는 임의의 조합으로 2개 이상(예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상)의 임의의 상기 치환을 포함한다.

[0109] 몇몇 실시형태에서, 항-C5 항체는 에콜리주맙과 관련하여 하기 기준을 충족시키는 적어도 하나의 치환을 포함한

다:

[0110] (1) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에서의 33% 더 작은 피크 상 이동의 pH 7.4에서의 결합 동력학에 대한 최대 변경;

[0111] (2) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에서의 3배 이하의 피크 상 이동 감소의 pH 7.4에서의 해리 동력학에 대한 최대 변경; 및

[0112] (3) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에 걸쳐 적어도 3배의 피크 상 이동 감소의 pH 6.0에서의 해리 동력학에 대한 최대 변경.

[0113] 예를 들어, 상기 기준 (1)과 관련하여, 에콜리주맙과의 결합의 800초 후의 평균 피크 상 이동이 대략 0.75nm인 경우, 0.5nm 미만의 상 이동(예를 들어, 2회 이상 재현)을 가지는 시험 항체는 상기 기준을 충족시키지 않을 것이다. 반대로, 800초에 0.5nm 초과의 피크 상 이동을 가지는 항-C5 항체는 제1 기준을 충족시킨다. 이러한 치환은 pH 7.4에서 에콜리주맙의 k_a 및 k_d 로부터 적은 정도로 오직 편차가 생기지만, pH 6.0에서 더 상당히 에콜리주맙의 k_d 로부터 편차가 생기는 항-C5 항체를 생성시킨다.

[0114] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 8에 대한 31번 위치에서의 글리신, 서열 번호 8에 대한 33번 위치에서의 류신, 서열 번호 8에 대한 91번 위치에서의 발린 및 서열 번호 8에 대한 94번 위치에서의 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 3개 또는 4개)의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신 및 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 적어도 1개(예를 들어, 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0115] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 8에 대한 31번 위치에서의 글리신, 서열 번호 8에 대한 33번 위치에서의 류신, 서열 번호 8에 대한 91번 위치에서의 발린 및 서열 번호 8에 대한 94번 위치에서의 트레오닌으로부터 선택된 적어도 하나의 치환을 이의 경쇄 가변 영역에서 함유한다. 하기 표 1을 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신 및 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린으로부터 선택된 적어도 하나의 치환을 이의 중쇄 가변 영역에서 함유한다. 하기 표 1을 참조한다.

[0116] 몇몇 실시형태에서, 항체는 서열 번호 1-6에 의해 기재된 CDR에 대해 적어도 2개(예를 들어, 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 아미노산 치환을 포함한다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 표 1에 기재된 아미노산 위치에서 조합으로 2개 이상의 치환을 포함한다.

표 1

아미노산 치환 조합

아미노산 위치/ Ab Cmb 번호	(서열 번호 8에 대한) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.				(서열 번호 7에 대한) 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
1	•				•			
2	•					•		
3	•						•	
4	•							•
5		•			•			
6		•				•		
7		•					•	
8		•						•
9			•		•			
10			•			•		
11			•				•	
12			•					•
13	•	•			•	•		
14	•	•			•		•	
15	•	•			•			•
16	•	•				•	•	
17	•	•				•		•

[0117]

아미노산 위치/ Ab Cmb 번호	(서열 번호 8에 대한) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.				(서열 번호 7에 대한) 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
18	•	•					•	•
19	•		•		•	•		
20	•		•		•		•	
21	•		•		•			•
22	•		•			•	•	
23	•		•			•		•
24	•		•				•	•
25		•	•		•	•		
26		•	•		•		•	
27		•	•		•			•
28		•	•			•	•	
29		•	•			•		•
30		•	•				•	•
31	•	•			•			
32	•	•				•		
33	•	•					•	
34	•	•						•
35	•		•		•			

[0118]

아미노산 위치/ Ab Cmb 번호	(서열 번호 8에 대한) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.				(서열 번호 7에 대한) 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
36	•		•			•		
37	•		•				•	
38	•		•					•
39		•	•		•			
40		•	•			•		
41		•	•				•	
42		•	•					•
43	•				•	•		
44		•			•	•		
45			•		•	•		
46	•				•		•	
47		•			•		•	
48			•		•		•	
49	•				•			•
50		•			•			•
51			•		•			•
52	•					•	•	
53		•				•	•	

[0119]

아미노산 위치/ Ab Cmb 번호	(서열 번호 8에 대한) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.				(서열 번호 7에 대한) 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
54			•			•	•	
55	•					•		•
56		•				•		•
57			•			•		•
58	•						•	•
59		•					•	•
60			•				•	•
61	•	•	•		•			
62	•	•	•			•		
63	•	•	•				•	
64	•	•	•					•
65	•				•	•	•	•
66		•			•	•	•	•
67			•		•	•	•	•
68	•				•	•	•	
69	•				•	•		•
70	•				•		•	•
71	•					•	•	•

[0120]

아미노산 위치/ Ab Cmb 번호	(서열 번호 8에 대한) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.				(서열 번호 7에 대한) 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역 CDR 내의 치환.			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
72				•	•	•	•	
73				•	•	•		•
74				•	•		•	•
75				•		•	•	•
76	•	•	•		•	•	•	•

"•"는 어떤 아미노산이 소정의 항체에서 치환되는지를 나타낸다. 예를 들어, Ab Cmb. 번호 76은 에콜리주맙의 6개의 CDR을 포함하는 항체를 한정하고, 여기서 경쇄 CDR은 서열 번호 8에 대한 31번, 33번 및 91번 위치에서의 치환을 포함하고, 중쇄 CDR은 서열 번호 7에 대한 27번, 34번, 52번 및 57번 위치에서의 치환을 포함한다.

"Ab Comb. 번호"는 표에 언급된 특정한 변이체 항-C5 항체에 주어진 숫자 지침을 의미한다. 명확히 하면, 표 1에 언급된 변이체 항-C5 항체는 소정의 표시된 아미노산 치환이 이루어지는 에콜리주맙의 여섯 개(6)의 CDR의 아미노산 서열을 오직 가질 필요는 없다. 변이체 항체는 임의로 서열 번호 7 또는 서열 번호 8의 프레임워크 영역을 포함할 수 있다.

[0121]

[0122] 표 1에 기재된 치환은 표시된 아미노산 잔기와 다른 임의의 아미노산에 대한 것일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다.

[0123]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신, 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신 및 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에서 이루어진 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신 둘 다는 각각 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신 및 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린 둘 다는 각각 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 7에 대한 34번 위치에서의 아이소류신 및 서열 번호 7에 대한 52번 위치에서의 류신 둘 다는 각각 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 몇몇 실시형태에서, 서열 번호 7에 대한 27번 위치에서의 티로신 및 서열 번호 7에 대한 57번 위치에서의 세린 둘 다는 각각 상이한 아미노산에 의해 치환된다. 본 명세서에 기재된 임의의 항-C5 항체의 몇몇 실시형태에서, 상이한 아미노산은 히스티딘이다. 예를 들어, 27번 위치에서의 티로신 및 57번 위치에서의 세린은 각각 히스티딘에 의해 치환될 수 있다.

[0124]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 GHIFSNYWIQ(서열 번호 23)의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 중쇄 CDR1을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 EILPGSGHTEYTENFKD(서열 번호 19)의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 중쇄 CDR2를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARYFFG SSPNWFYFDVWGQGTLVTVSS(서열 번호 12).

[0125]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFQGQTKVEIK(서열 번호 8).

[0126]

본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 적어도 0.1nM(예를 들어, 적어도 0.15, 0.175, 0.2, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35, 0.375, 0.4, 0.425, 0.45, 0.475, 0.5, 0.525, 0.55, 0.575, 0.6, 0.625, 0.65, 0.675, 0.7, 0.725, 0.75, 0.775, 0.8, 0.825, 0.85, 0.875, 0.9, 0.925, 0.95 또는 0.975nM)인 친화도 해리 상수(K_D)로 pH 7.4 및 25°C에서 (그리고, 달리, 생리학적 조건 하에) C5에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항-C5 항체의

K_D 는 1nM 이하(예를 들어, 0.9nM 이하, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 또는 0.2nM)이다.

[0127] 본 명세서에 기재된 임의의 항-C5 항체의 몇몇 실시형태에서, [($^{\circ}\text{C}$ 에서의 pH 6.0에서의 C5에 대한 항체의 K_D)/(25 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 pH 7.4에서의 C5에 대한 항체의 K_D)]는 21 초과(예를 들어, 22 초과, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500 또는 8000)이다.

[0128] 항체가 단백질 항원에 결합하는지를 결정하는 방법 및/또는 단백질 항원에 대한 항체의 친화도는 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 단백질 항원에 대한 항체의 결합은 다양한 기법, 예컨대 웨스턴 블롯, 도트 블롯, 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 방법(예를 들어, 비아코어 시스템(BIAcore system); 파마시아 바이오센서 에이비(Pharmacia Biosensor AB), 스웨덴 옵살라 및 뉴저지주 퍼츠카타웨이), 또는 효소 연결 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)(이들로 제한되지는 않음)을 이용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols," Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide," W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering," 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; Johne et al. (1993) *J Immunol Meth* 160:191-198; Jonsson et al. (1993) *Ann Biol Clin* 51:19-26; 및 Jonsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627]을 참조한다. 또한, 친화도(예를 들어, 해리 및 결합 상수)를 결정하는 방법이 실험예에 기재되어 있다.

[0129] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 " k_a "는 항원에 대한 항체의 결합에 대한 속도 상수를 의미한다. 용어 " k_d "는 항체/항원 복합체로부터 항체의 해리에 대한 속도 상수를 의미한다. 및 용어 " K_D "는 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 의미한다. 평형 해리 상수는 동역학 속도 상수의 비율, $K_D = k_a/k_d$ 로부터 추론된다. 이러한 결정은 바람직하게는 25 $^{\circ}\text{C}$ 또는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 측정된다(실험예 참조). 예를 들어, 인간 C5에 대한 항체 결합의 동역학은 항체를 부동화하기 위해 항-Fc 포획 방법을 사용하여 비아코어 3000 장치에서 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통해 pH 8.0, 7.4, 7.0, 6.5 및 6.0에서 결정될 수 있다.

[0130] 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 C5 단백질(예를 들어, 인간 C5 단백질)의 C5a 및/또는 C5b 활성 단편의 생성 또는 활성을 차단하는 데 있어서 활성을 가질 수 있다. 이 차단 효과를 통해, 항체는 예를 들어 C5a의 전염증성 효과 및 세포의 표면에서 C5b-9 막 공격 복합체(membrane attack complex: MAC)의 생성을 저해한다.

[0131] 본 명세서에 기재된 특정한 항체가 C5 절단을 저해하는지를 결정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 인간 보체 성분 C5의 저해는 대상체의 체액에서의 보체의 세포 용해 능력을 감소시킬 수 있다. 체액(들)에 존재하는 보체의 세포 용해 능력의 이러한 감소는 당해 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 종래의 용혈성 검정, 예컨대 문헌[Kabat and Mayer (eds.), "Experimental Immunoochemistry, 2nd Edition," 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), 페이지 135-139]에 의해 기재된 용혈 검정, 또는 이 검정의 종래의 변형, 예를 들어 문헌[Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552]에 기재된 닦 적혈구 용혈 방법 등에 의해 측정될 수 있다. 후보 화합물이 C5a 및 C5b의 형태로의 인간 C5의 절단을 저해하는지를 결정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Moongkarndi et al. (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al. (1983) *Immunobiol* 165:323; Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124(1):326-31; Thomas et al. (1996) *Mol Immunol* 33(17-18):1389-401; 및 Evans et al. (1995) *Mol Immunol* 32(16):1183-95]에 기재되어 있다. 예를 들어, 체액에서의 C5a 및 C5b의 농도 및/또는 생리학적 활성은 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. C5a 농도 또는 활성을 측정하는 방법은 예를 들어 주화성 검정, RIA 또는 ELISA를 포함한다(예를 들어, 문헌[Ward and Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50(3):606-16 및 Wurzner et al. (1991) *Complement Inflamm* 8:328-340] 참조). C5b의 경우, 용혈성 검정 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 가용성 C5b-9에 대한 검정을 이용할 수 있다. 당해 분야에 공지된 다른 검정을 또한 이용할 수 있다. 이들 또는 다른 적합한 유형의 검정을 이용하여, 인간 보체 성분 C5를 저해할 수 있는 후보 물질이 스크리닝될 수 있다.

[0132] 면역학적 기법, 예컨대 ELISA(이것으로 제한되지는 않음)는 생물학적 활성 생성물로의 C5의 절단을 저해하는 항-C5 항체의 능력을 결정하기 위해 C5 및/또는 이의 분할 생성물의 단백질 농도를 측정하기 위해 이용될 수

있다. 몇몇 실시형태에서, C5a 생성이 측정된다. 몇몇 실시형태에서, C5b-9 네오에피토프-특이적 항체가 말단 보체의 형성을 검출하기 위해 사용된다.

[0133] 용혈성 검정은 보체 활성화에 대한 항-C5 항체의 저해 활성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 실험실내 혈청 시험 용액에서 전통적인 보체 경로 매개 용혈에 대한 항-C5 항체의 효과를 결정하기 위해, 예를 들어 헤몰리신에 의해 코팅된 양 적혈구 또는 항-닭 적혈구 항체에 의해 감작화된 닭 적혈구를 표적 세포로서 사용한다. 용해의 백분율은 저해제의 부재 하에 생긴 용해와 동일한 100%의 용해를 고려함으로써 정규화된다. 몇몇 실시형태에서, 전통적인 보체 경로는 예를 들어 위스랩(Wieslab)(등록상표) 클래시컬 패스웨이 컴플리먼트 키트(Classical Pathway Complement Kit)(Wieslab(등록상표) COMPL CP310, 유로-다이아그노스티카(Euro-Diagnostica), 스웨덴)에서 사용되는 바와 같은 인간 IgM 항체에 의해 활성화된다. 간단히 말하면, 시험 혈청은 인간 IgM 항체의 존재 하에 항-C5 항체와 항온처리된다. 혼합물을 효소 접합된 항-C5b-9 항체 및 형광성 기질과 접촉시키고 적절한 과정에서 흡광도를 측정함으로써 생성된 C5b-9의 양이 측정된다. 대조군으로서, 시험 혈청을 항-C5 항체의 부재 하에 항온처리한다. 몇몇 실시형태에서, 시험 혈청은 C5 폴리펩타이드와 재구성된 C5 결핍 혈청이다.

[0134] 대안적인 경로 매개 용혈에 대한 항-C5 항체의 효과를 결정하기 위해, 비감작화된 토키 또는 기니아 피그 적혈구는 표적 세포로서 사용된다. 몇몇 실시형태에서, 혈청 시험 용액은 C5 폴리펩타이드와 재구성된 C5 결핍 혈청이다. 용해의 백분율은 저해제의 부재 하에 생긴 용해와 동일한 100%의 용해를 고려함으로써 정규화된다. 몇몇 실시형태에서, 대안적인 보체 경로는 예를 들어 위스랩(등록상표) 클래시컬 패스웨이 컴플리먼트 키트(Wieslab(등록상표) COMPL AP330, 유로-다이아그노스티카, 스웨덴)에서 사용되는 바와 같은 리포폴리사카라이드 분자에 의해 활성화된다. 간단히 말하면, 시험 혈청은 리포폴리사카라이드의 존재 하에 항-C5 항체와 항온처리된다. 혼합물을 효소 접합된 항-C5b-9 항체 및 형광성 기질과 접촉시키고 적절한 과정에서 흡광도를 측정함으로써 생성된 C5b-9의 양이 측정된다. 대조군으로서, 시험 혈청을 항-C5 항체의 부재 하에 항온처리한다.

[0135] 몇몇 실시형태에서, C5 활성 또는 이의 저해는 CH50eq 검정을 이용하여 정량화된다. CH50eq 검정은 혈청에서 전체 전통적인 보체 활성을 측정하는 방법이다. 이 시험은 용해 검정이고, 이것은 전통적인 보체 경로의 활성화로서 항체 감작화된 적혈구 및 시험 혈청의 다양한 희석액을 사용하여 50%의 용해(CH50)를 얻기 위해 필요한 양을 결정한다. 용혈의 백분율은 예를 들어 분광광도계를 사용하여 결정될 수 있다. CH50eq 검정은 말단 보체 복합체(TCC) 형성의 간접 측정을 제공하는데, 왜냐하면 TCC 자체가 측정되는 용혈을 직접적으로 담당하기 때문이다.

[0136] 검정은 널리 공지되어 있고, 당해 분야의 당업자에 의해 흔히 실행된다. 간단히 말하면, 전통적인 보체 경로를 활성화하기 위해, 비희석된 혈청 샘플(예를 들어, 재구성된 인간 혈청 샘플)은 항체 감작화된 적혈구를 함유하는 마이크로검정 웰에 첨가되어서 TCC를 생성한다. 다음에, 활성화된 혈청은 마이크로검정 웰 중에 희석되고, 이것은 포획 시약(예를 들어, TCC의 하나 이상의 성분에 결합하는 항체)에 의해 코팅된다. 활성화된 샘플에 존재하는 TCC는 마이크로검정 웰의 표면을 코팅하는 단일클론 항체에 결합한다. 웰을 세척하고, 각각의 웰에 검출 가능하게 표지되고 결합된 TCC를 인식하는 검출 시약을 첨가한다. 검출 가능한 라벨은 예를 들어 형광 라벨 또는 효소 라벨일 수 있다. 검정 결과는 밀리리터당 CH50 단위 당량(CH50 U Eq/ml)으로 표현된다.

[0137] 저해는, 예를 들어 이것이 말단 보체 활성에 관한 것으면서, 유사한 조건 하에 및 등물 농도에서 대조군 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 효과와 비교하여 예를 들어 용혈성 검정 또는 CH50eq 검정에서 말단 보체의 활성의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60%) 감소를 포함한다. 실질적인 저해는, 본 명세서에 사용되는 바대로, 적어도 40%(예를 들어, 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95% 이상)의 소정의 활성(예를 들어, 말단 보체 활성)의 저해를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 에콜리주맙의 CDR(즉, 서열 번호 1-6)에 대해 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하지만, 용혈성 검정 또는 CH50eq 검정에서 에콜리주맙의 보체 저해 활성의 적어도 30%(예를 들어, 적어도 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95%)를 보유한다.

[0138] 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 적어도 20일(예를 들어, 적어도 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 33일, 34일, 35일 또는 36일)인 인간에서의 혈청 반감기를 가진다. 항체의 혈청 반감기를 측정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고 실험예에 예시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-23524; Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216; Hinton et al. (2006) *J Immunol* 176:346-356; 및 Petkova et al. (2006) *Int Immunol* 18(12):1759-69] 각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)을 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 예를 들어 실험예에 기재된 마우스 모델 시스템 중 하나(예를 들어, C5 결핍/NOD/scid 마우스 또는 hFcRn 형

질전환 마우스 모델 시스템)에서 측정된 바대로 에콜리주맙의 혈청 반감기의 적어도 20% 초과(예를 들어, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%)인 혈청 반감기를 가진다.

[0139] Fc 영역에 대한 변형

[0140] 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 몇몇 실시형태에서 변이체 인간 Fc 불변 영역이 유래한 네이티브 인간 Fc 불변 영역의 것보다 큰 친화도로 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 변이체 인간 Fc 불변 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 불변 영역은 변이체 인간 Fc 불변 영역이 유래한 네이티브 인간 Fc 불변 영역에 대한 1개 이상(예를 들어, 2개의, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 이상)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 치환은 상호작용의 pH 의존성을 유지시키면서 pH 6.0에서 FcRn에 대한 변이체 Fc 불변 영역을 함유하는 IgG 항체의 결합 친화도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌[Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216 및 Datta-Mannan et al. (2007) *Drug Metab Dispos* 35:1-9]을 참조한다. 항체의 Fc 불변 영역에서의 하나 이상의 치환이 (상호작용의 pH 의존성을 유지시키면서) pH 6.0에서 FcRn에 대한 Fc 불변 영역의 친화도를 증가시키는지를 시험하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 실험예에 예시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Datta-Mannan et al. (2007) *J Biol Chem* 282(3):1709-1717]; 국제 공보 WO 제98/23289호; 국제 공보 WO 제97/34631호; 및 미국 특허 제6,277,375호(각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)을 참조한다.

[0141] FcRn에 대한 항체 Fc 불변 영역의 결합 친화도를 증대시키는 치환은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 (1) 문헌[Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-23524]에 의해 기재된 M252Y/S254T/T256E 3중 치환; (2) 문헌[Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216 및 Hinton et al. (2006) *J Immunol* 176:346-356]에 기재된 M428L 또는 T250Q/M428L 치환; 및 (3) 문헌[Petkova et al. (2006) *Int Immunopharmacol* 18(12):1759-69]에 기재된 N434A 또는 T307/E380A/N434A 치환을 포함한다. 추가적인 치환 쌍 지음: P257I/Q311I, P257I/N434H 및 D376V/N434H는 예를 들어 문헌[Datta-Mannan et al. (2007) *J Biol Chem* 282(3):1709-1717](이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0142] 몇몇 실시형태에서, 변이체 불변 영역은 발린에 대한 255번 EU 아미노산 잔기에서의 치환을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 불변 영역은 아스파라гин에 대한 309번 EU 아미노산 잔기에서의 치환을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 불변 영역은 아이소류신에 대한 312번 EU 아미노산 잔기에서의 치환을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 불변 영역은 386번 EU 아미노산 잔기에서의 치환을 가진다.

[0143] 몇몇 실시형태에서, 변이체 Fc 불변 영역은 이것이 유래한 네이티브 불변 영역에 대한 30개 이하(예를 들어, 29개 이하, 28개, 27개, 26개, 25개, 24개, 23개, 22개, 21개, 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개, 13개, 12개, 11개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개)의 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 Fc 불변 영역은 M252Y, S254T, T256E, N434S, M428L, V259I, T250I 및 V308F로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 인간 Fc 불변 영역은 각각 EU 넘버링에서 428번 위치에서의 메티오닌 및 434번 위치에서의 아스파라гин을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 Fc 불변 영역은 예를 들어 미국 특허 제8,088,376호에 기재된 바와 같은 428L/434S 이중 치환을 포함한다.

[0144] 몇몇 실시형태에서, 변이체 불변 영역은 네이티브 인간 Fc 불변 영역에 대한 237번, 238번, 239번, 248번, 250번, 252번, 254번, 255번, 256번, 257번, 258번, 265번, 270번, 286번, 289번, 297번, 298번, 303번, 305번, 307번, 308번, 309번, 311번, 312번, 314번, 315번, 317번, 325번, 332번, 334번, 360번, 376번, 380번, 382번, 384번, 385번, 386번, 387번, 389번, 424번, 428번, 433번, 434번 또는 436번 아미노산 위치(EU 넘버링)에서의 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 치환은 모두 EU 넘버링으로 237번 위치에서의 글리신에 대한 메티오닌; 238번 위치에서의 프롤린에 대한 알라닌; 239번 위치에서의 세린에 대한 라이신; 248번 위치에서의 라이신에 대한 아이소류신; 250번 위치에서의 트레오닌에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 아이소류신, 메티오닌, 글루타민, 세린, 발린, 트립토판 또는 티로신; 252번 위치에서의 메티오닌에 대한 페닐알라닌, 트립토판 또는 티로신; 254번 위치에서의 세린에 대한 트레오닌; 255번 위치에서의 아르기닌에 대한 글루탐산; 256번 위치에서의 트레오닌에 대한 아스파르트산, 글루탐산 또는 글루타민; 257번 위치에서의 프롤린에 대한 알라닌, 글리신, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 또는 발린; 258번 위치에서의 글루탐산에 대한 히스티딘; 265번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌; 270번 위치에서의 아스파르트산에 대한 페닐알라닌; 286번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 글루탐산; 289번 위치에서의 트레오닌에 대한 히스티딘; 297번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌; 298번 위치에서의 세린에 대한 글리신; 303번 위치에서의 발린에 대한

알라닌; 305번 위치에서의 발린에 대한 알라닌; 307번 위치에서의 트레오닌에 대한 알라닌, 아스파르트산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 발린, 트립토판 또는 티로신; 308번 위치에서의 발린에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 프롤린, 글루타민 또는 트레오닌; 309번 위치에서의 류신 또는 발린에 대한 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 프롤린 또는 아르기닌; 311번 위치에서의 글루타민에 대한 알라닌, 히스티딘 또는 아이소류신; 312번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌 또는 히스티딘; 314번 위치에서의 류신에 대한 라이신 또는 아르기닌; 315번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 히스티딘; 317번 위치에서의 라이신에 대한 알라닌; 325번 위치에서의 아스파라긴에 대한 글리신; 332번 위치에서의 아이소류신에 대한 발린; 334번 위치에서의 라이신에 대한 류신; 360번 위치에서의 라이신에 대한 히스티딘; 376번 위치에서의 아스파르트산에 대한 알라닌; 380번 위치에서의 글루탐산에 대한 알라닌; 382번 위치에서의 글루탐산에 대한 알라닌; 384번 위치에서의 아스파라긴 또는 세린에 대한 알라닌; 385번 위치에서의 글리신에 대한 아스파르트산 또는 히스티딘; 386번 위치에서의 글루타민에 대한 프롤린; 387번 위치에서의 프롤린에 대한 글루탐산; 389번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌 또는 세린; 424번 위치에서의 세린에 대한 알라닌; 428번 위치에서의 메티오닌에 대한 알라닌, 아스파르트산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판 또는 티로신; 433번 위치에서의 히스티딘에 대한 라이신; 434번 위치에서의 아스파라긴에 대한 알라닌, 페닐알라닌, 히스티딘, 세린, 트립토판 또는 티로신; 및 436번 위치에서의 티로신 또는 페닐알라닌에 대한 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0145] 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 몇몇 실시형태에서 서열 번호 12 또는 14에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 서열 번호 8 또는 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

항-C5 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법

[0147] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 임의의 항-C5 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 특징으로 한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체를 제조하는 방법은 대상체(예를 들어, 비인간 포유동물)를 적절한 면역원에 의해 면역화하는 단계를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 항체를 생성하기에 적합한 면역원은 본 명세서에 기재되어 있다. 예를 들어, C5에 결합하는 항체를 생성하기 위해, 당업자는 적합한 대상체(예를 들어, 비인간 포유동물, 예컨대 랙트, 마우스, 게르빌루스쥐, 햄스터, 개, 고양이, 돼지, 염소, 말 또는 비인간 영장류)를 전장 C5 폴리펩타이드, 예컨대 전장 인간 C5 폴리펩타이드에 의해 면역화할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 비인간 포유동물은 C5 결핍 마우스, 예를 들어 문헌[Levy and Ladda (1971) *Nat New Biol* 229(2):51-52; Crocker et al. (1974) *J Clin Pathol* 27(2):122-124; Wetsel et al. (1990) *J Biol Chem* 265:2435-2440; 및 Jungi and Pepys (1981) *Immunology* 43(2):271-279]에 기재된 예를 들어 C5 결핍 마우스이다.

[0148] 적합한 대상체(예를 들어, 비인간 포유동물)는 포유동물에 의한 항체의 생성을 발생시키기 위해 충분한 수회 후속하는 부스터 면역화와 함께 적절한 항원에 의해 면역화된다. 면역원은 아쥬번트와 함께 대상체(예를 들어, 비인간 포유동물)에게 투여될 수 있다. 대상체에서 항체를 생성하는 데 유용한 아쥬번트는 단백질 아쥬번트; 박테리아 아쥬번트, 예를 들어 전체 박테리아(BCG, 코리네박테륨 파르븀(*Corynebacterium parvum*) 또는 살모넬라 미네소타(*Salmonella minnesota*)) 및 세포 벽 골격을 포함하는 박테리아 성분, 트레할로스 다이마이콜레이트, 모노포스포릴 지질 A, 결핵균(투베르클 바실러스: *tubercle bacillus*)의 메탄올 추출 가능한 잔류물(methanol extractable residue: MER), 완전 또는 불완전 프로인드 아쥬번트; 바이러스 아쥬번트; 화학 아쥬번트, 예를 들어 수산화알루미늄, 및 요오도아세테이트 및 콜레스테릴 헤미숙시네이트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 면역 반응을 유도하는 방법에서 사용될 수 있는 다른 아쥬번트는 예를 들어 콜레라 독소 및 파라폭스바이러스 단백질을 포함한다. 또한, 문헌[Bieg et al. (1999) *Autoimmunity* 31(1):15-24]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌[Lodmell et al. (2000) *Vaccine* 18:1059-1066; Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-4649; Baldridge et al. (1999) *Methods* 19:103-107; 및 Gupta et al. (1995) *Vaccine* 13(14): 1263-1276]을 참조한다.

[0149] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 면역원에 결합하는 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 제조하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 적합한 포유동물, 예컨대 실험실 마우스를 상기 기재된 바와 같은 C5 폴리펩타이드에 의해 면역화한다. 면역화된 포유동물의 항체 생성 세포(예를 들어, 비장의 B 세포)를 면역원의 적어도 하나의 부스터 면역화 후 2일 내지 4일에 단리하고 이후 간단히 배양물 중에 성장시킨 후 적합한 골수종 세포주의 세포에 의해 융합시킬 수 있다. 세포를 융합 프로모터, 예를 들어 백시니아 바이러스 또는 폴리에틸렌 글리콜

등의 존재 하에 융합할 수 있다. 융합에서 얻은 하이브리드 세포를 클로닝하고, 원하는 항체를 분비하는 세포 클론을 선택된다. 예를 들어, 적합한 면역원에 의해 면역화된 Balb/c 마우스의 비장 세포를 골수종 세포주 PAI 또는 골수종 세포주 Sp2/0-Ag 14의 세포와 융합할 수 있다. 융합 후, 세포를 적합한 배양 배지 중에 증식시키고, 이 배지는 정상 골수종 세포가 원하는 하이브리도마 세포를 과성장시키는 것을 막도록 정기적 간격으로 선택 배지, 예를 들어 HAT 배지에 의해 보충된다. 원하는 항체, 예를 들어 C5에 결합하고 단편 C5a 및 C5b로의 C5의 절단을 저해하는 항체의 분비를 위해 얻은 하이브리드 세포는 이후 분비된다.

[0150] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CHO 세포에서 제조될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 시알산 잔기를 함유하지 않는다.

[0151] 몇몇 실시형태에서, 당업자는 예를 들어 미국 특허 제6,300,064호(Knappik 등; Morphosys AG에 허여) 및 문헌 [Schoonbroodt et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(9):e81]에 기재된 바대로 비면역 바이어스 라이브러리로부터 항-C5 항체를 확인할 수 있다.

[0152] 상기 방법을 이용하여 스크리닝되는 항체의 하위집단은 당해 분야에 공지된 임의의 면역학적 또는 생화학 기반 방법을 이용하여 특정한 면역원(예를 들어, C5)에 대한 이의 특이성 및 결합 친화도에 대해 규명될 수 있다. 예를 들어, C5a와 비교하여 네이티브, 전장 C5에 대한 항체의 특이적 결합은 예를 들어 면역학적 또는 생화학적 기반 방법, 예컨대 상기 기재된 바와 같은 ELISA 검정, SPR 검정, 면역침전 검정, 친화도 크로마토그래피, 및 평형 투석(이들로 제한되지는 않음)을 이용하여 결정될 수 있다. 항체의 면역특이적 결합 및 교차 반응성을 분석하기 위해 사용될 수 있는 면역검정은 예컨대 웨스턴 블로트, RIA, ELISA(효소 연결 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 면역학산 검정, 응집 검정, 보체 고정 검정, 면역방사측정 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기법을 이용하는 경쟁적 및 비경쟁적 검정 시스템을 포함하지만 이들로 제한되지는 않고, 이러한 검정은 일상적이고, 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0153] 항체는 항체와 C5의 상호작용의 동역학 매개변수를 규명하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 SPR 기반 검정을 이용하여 또한 평가될 수 있다. 비아코어 장치(BIAcore Instrument)(Biacore AB(스웨덴 읍살라)); IAsys 장치 (Affinity Sensors(메사추세츠주 프랭클린)); IBIS 시스템(Windsor Scientific Limited(영국 벅스)), SPR-CELLIA 시스템(Nippon Laser and Electronics Lab(일본 훗카이도)), 및 SPR 검출기 스프렉타(Spreeta)(Texas Instruments(텍사스주 댈러스))(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 상업적으로 구입 가능한 임의의 SPR 장치는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol Biotech* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9: 97-101; 및 Rich et al. (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11: 54-61]을 참조한다.

[0154] 예를 들어, 항-C5 항체가 전장, 네이티브 C3 및/또는 C4 단백질에 결합하지 않는지를 결정하기 위해 또한 상기 방법을 이용할 수 있는 것으로 이해된다.

[0155] 상기 참조문헌에 기재된 바대로, 과지 선택 후, 과지로부터의 항체 코딩 영역은 단리되고 인간 항체, 또는 임의의 원하는 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하기 위해 사용되고, 예를 들어 하기 자세히 기재된 바와 같은 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는 임의의 원하는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합으로 생성하는 기법은 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대 PCT 공보 WO 제92/22324호; 문헌[Mullinax et al. (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; 및 Sawai et al. (1995) *Am J Repr Immunol* 34:26-34; 및 Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043]에 개시된 것을 이용하여 또한 사용될 수 있다. 단체 Fv 및 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 기법의 예는 미국 특허 제4,946,778호 및 5,258,498호; 문헌[Huston et al. (1991) *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al. (1993) *Proc Nat Acad Sci USA* 90:7995-7999; 및 Skerra et al. (1988) *Science* 240:1038-1040]에 기재된 것을 포함한다.

[0156] 몇몇 실시형태에서, 에피토프 맵핑은 예를 들어 항체와 상호작용하는 C5의 영역을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 항체가 결합하는 에피토프를 확인하는 방법은 또한 당해 분야에 공지되어 있고, 상기 기재되어 있다.

[0157] 본 명세서에서 확인된 항체 및 이의 단편은 "키메라"일 수 있거나, 이것으로 제조될 수 있다. 키메라 항체 및 이의 항원 결합 단편은 2개 이상의 상이한 종(예를 들어, 마우스 및 인간)으로부터의 부분을 포함한다. 키메라 항체는 인간 불변 도메인에 융합된 원하는 특이성의 마우스 가변 영역에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호). 이러한 방식으로, 비인간 항체는 인간 임상 적용(예를 들어, 대상체에서 보체 매개 장애를 치료하거나 예방하는 방법)에 더 적합하게 하도록 변형될 수 있다.

[0158]

본 개시내용의 단일클론 항체는 비인간(예를 들어, 마우스) 항체의 "인간화된" 형태를 포함한다. 인간화된 또는 CDR 그래프팅된 mAb는 마우스 항체만큼 신속히 순환으로부터 청소되지 않고 통상적으로 불리한 면역 반응을 촉발하지 않으므로 인간에 대한 치료제로서 특히 유용하다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비인간 소스로부터 이것에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이 비인간 아미노산 잔기는 대개 "유입" 잔기라 불리고, 이것은 통상적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화된 항체를 제조하는 방법은 일반적으로 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열에 대해 설치류 프레임워크 또는 CDR 서열을 치환함으로써 본질적으로 원터(Winter) 및 공동작업자의 방법에 따라 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; 및 Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536] 참조). 또한, 예를 들어 문헌[Staelens et al. (2006) *Mol Immunol* 43:1243-1257]을 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 비인간(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류 항체)의 CDR 영역 아미노산 잔기가 인간 항체의 프레임워크 스캐폴드로 그래프팅된 인간 항체(수혜자 항체)이다.

[0159]

몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 프레임워크 영역 아미노산 잔기는 비인간 항체의 상응하는 아미노산 잔기에 의해 또한 대체된다(소위 "역돌연변이"). 또한, 파지 디스플레이 라이브러리는 항체 서열 내의 선택된 위치에서 아미노산을 변화시키도록 사용될 수 있다. 인간화된 항체의 특성은 인간 프레임워크의 선택에 의해 또한 영향을 받는다. 게다가, 인간화된 및 키메라화된 항체는 항체 특성, 예를 들어 친화도 또는 이팩터 기능 등을 추가로 개선하기 위해 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0160]

완전 인간 항체가 본 개시내용에 또한 제공된다. 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 서열, 바람직하게는 인간 생식선 서열로부터 유래한 (존재하는 경우) 가변 및 불변 영역을 가지는 항체를 포함한다. 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 실험실내 랜덤 또는 부위 특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나, 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열로 그래프팅된 항체(즉, 인간화된 항체)를 포함하지 않는다. 전체 인간 또는 인간 항체는 인간 항체 유전자(가변(V), 다양성(D), 연결(J) 및 불변(C) 엑손)를 보유하는 형질전환 마우스 또는 인간 세포로부터 유래할 수 있다.

[0161]

인간 서열은 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩할 수 있고, 마우스에서 정확히 작용하여, 재배열을 겪어 인간에서의 것과 유사한 넓은 항체 레퍼토리를 제공한다. 형질전환 마우스는 다양한 특이적 항체 및 이의 코딩 RNA를 생성하기 위해 표적 단백질 면역원에 의해 면역화될 수 있다. 이러한 항체의 항체 사슬 성분을 코딩하는 핵산은 동물로부터 디스플레이 벡터로 클로닝될 수 있다. 통상적으로, 중쇄 및 경쇄 서열을 코딩하는 핵산의 별개의 집단이 클로닝되고, 별개의 집단은 이후 벡터로 삽입 시 재조합되어서, 벡터의 임의의 소정의 카페는 중쇄 및 경쇄의 랜덤 조합을 수용한다. 벡터는 항체 사슬을 발현하도록 설계되어서, 이것은 조립되고 벡터를 함유하는 디스플레이 패키지의 외부 표면에 디스플레이될 수 있다. 예를 들어, 항체 사슬은 파지의 외부 표면으로부터 파지 코트 단백질과의 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 이후, 디스플레이 패키지는 표적에 대한 항체 결합의 디스플레이를 위해 선택되고 스크리닝될 수 있다.

[0162]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 이의 상응하는 비변경 불변 영역에 대비된 감소한 이팩터 기능을 가지는(또는 가지지 않는) 변경된 중쇄 불변 영역을 포함한다. 항-C5 항체의 불변 영역을 포함하는 이팩터 기능은 불변 또는 Fc 영역의 특성을 변경함으로써 조절될 수 있다. 변경된 이팩터 기능은 예를 들어 하기 특성 중 하나 이상의 조절을 포함한다: 항체 의존적 세포 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC), 보체 의존적 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity: CDC), 아폽토시스, 하나 이상의 Fc-수용체에 대한 결합 및 전염증 반응. 조절은 불변 영역의 비변경 형태의 활성과 비교할 때 변경된 불변 영역을 함유하는 해당 항체에 의해 나타난 이팩터 기능 활성의 증가, 감소 또는 제거를 의미한다. 특정한 실시형태에서, 조절은 활성이 폐지되거나 완전히 없는 상황을 포함한다.

[0163]

변경된 FcR 결합 친화도 및/또는 ADCC 활성 및/또는 변경된 CDC 활성을 가지는 변경된 불변 영역은 불변 영역의 비변경 형태와 비교하여 증대되거나 감소한 FcR 결합 활성 및/또는 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성을 가지는 폴리펩타이드이다. FcR에 대한 증가한 결합을 나타내는 변경된 불변 영역은 비변경 폴리펩타이드보다 큰 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. FcR에 대해 감소한 결합을 나타내는 변경된 불변 영역은 불변 영역의 비변경 형태보다 낮은 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. FcR에 대해 감소한 결합을 나타내는 이러한 변이체는 FcR에 아주 적거나 미미한 결합, 예를 들어 FcR에 대한 네이티브 서열 면역글로불린 불변 또는 Fc 영역의 결합의 수준과 비교하여 FcR에 대한 결합의 0 내지 50%(예를 들어, 50% 미만, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%,

42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%)를 보유할 수 있다. 유사하게, 변경된 ADCC 및/또는 CDC 활성을 나타내는 변경된 불변 영역은 비변경 불변 영역과 비교하여 증가하거나 감소한 ADCC 및/또는 CDC 활성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 변경된 불변 영역을 포함하는 항-C5 항체는 불변 영역의 비변경 형태의 ADCC 및/또는 CDC 활성의 대략 0 내지 50%(예를 들어, 50% 미만, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%)를 나타낼 수 있다. 감소한 ADCC 및/또는 CDC를 나타내는 변경된 불변 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 감소한 ADCC 및/또는 CDC 활성을 나타내거나 이를 나타내지 않을 수 있다.

[0164]

소정의 실시형태에서, 변경된 불변 영역은 네이티브 서열 불변 영역 또는 비변경 불변 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실, 예를 들어 모 폴리펩타이드의 네이티브 서열 불변 영역 또는 불변 영역에서의 약 1개 내지 약 100개의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에서의 변경된 불변 영역은 비변경 불변 영역과 적어도 약 70%의 상동성(유사성) 또는 동일성, 몇몇 경우에 적어도 약 75%, 다른 경우에 적어도 약 80%의 상동성 또는 동일성, 다른 실시형태에서 적어도 약 85%, 90% 또는 95%의 상동성 또는 동일성을 보유할 것이다. 변경된 불변 영역은 하나 이상의 아미노산 결실 또는 삽입을 또한 함유할 수 있다. 추가적으로, 변경된 불변 영역은 예를 들어 변경된 글라이코실화 패턴(예를 들어, 비변경 불변 영역에 대한 하나 이상의 당 성분의 첨가, 하나 이상의 당 성분의 소실, 또는 하나 이상의 당 성분의 조성물의 변경)을 포함하는 변경된 번역 후 변형을 발생시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다.

[0165]

변경된 이팩터 기능을 가지거나 이를 가지지 않는 항체는 변이체 불변, Fc 또는 중쇄 영역을 가지는 항체를 조작하거나 생성함으로써 생성될 수 있고; 재조합 DNA 기술 및/또는 세포 배양 및 발현 조건은 변경된 기능 및/또는 활성을 가지는 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 기술은 이팩터 기능을 포함하는 항체 기능에 영향을 미치는 영역(예를 들어, Fc 또는 불변 영역 등)에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 조작하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 번역 후 변형의 변화, 예를 들어 글라이코실화 패턴 등은 항체가 생성되는 세포 배양 및 발현을 조작함으로써 달성될 수 있다. 항체의 Fc 영역으로 하나 이상의 치환, 첨가 또는 결실을 도입하기에 적합한 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]; 상기 Harlow 및 Lane(1988)의 문헌; 상기 Borrebaek(1992)의 문헌; 상기 Johnе 등의 문헌(1993); PCT 공보 WO 제06/53301호; 및 미국 특허 제7,704,497호에 기재된 바와 같은 예를 들어 표준 DNA 돌연변이유발 기법을 포함한다.

[0166]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 감소한 이팩터 기능을 나타내거나 이를 나타내지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 항-C5 항체는 하이브리드 불변 영역, 또는 이의 부분, 예컨대 G2/G4 하이브리드 불변 영역을 포함한다(예를 들어, 문헌[Burton et al. (1992) *Adv Immun* 51:1-18; Canfield et al. (1991) *J Exp Med* 173:1483-1491; 및 Mueller et al. (1997) *Mol Immunol* 34(6):441-452] 참조). 상기를 참조한다.

[0167]

상기 기재된 바와 같은 G2/G4 작제물을 사용하는 것 이외에, 감소한 이팩터 기능을 가지는 본 명세서에 기재된 항-C5 항체는 항체의 소정의 영역의 아미노산 서열의 다른 유형의 변화를 도입함으로써 생성될 수 있다. 이러한 아미노산 서열 변화는 예를 들어 PCT 공보 WO 제94/28027호 및 WO 제98/47531호; 및 문헌[Xu et al. (2000) *Cell Immunol* 200:16-26]에 기재된 Ala-Ala 돌연변이를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, Ala-Ala 돌연변이를 포함하는 불변 영역 내의 하나 이상의 돌연변이를 가지는 항-C5 항체는 감소한 이팩터 기능을 가지거나 이를 가지지 않는다. 이 실시형태에 따르면, 항체의 불변 영역은 234번 위치에서의 알라닌에 대한 치환 또는 235번 위치에서의 알라닌에 대한 돌연변이를 포함할 수 있다. 추가적으로, 변경된 불변 영역은 이중 돌연변이: 234번 위치에서의 알라닌에 대한 돌연변이 및 235번 위치에서의 알라닌에 대한 제2 돌연변이를 함유할 수 있다. 일 실시형태에서, 항-C5 항체는 IgG4 프레임워크를 포함하고, 여기서 Ala-Ala 돌연변이는 234번 위치에서의 페닐알라닌으로부터 알라닌으로의 돌연변이 및/또는 235번 위치에서의 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이를 기술할 것이다. 또 다른 실시형태에서, 항-C5 항체는 IgG1 프레임워크를 포함하고, 여기서 Ala-Ala 돌연변이는 234번 위치에서의 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이(들) 및/또는 235번 위치에서의 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이를 기술할 것이다. 항-C5 항체는 CH2 도메인에서의 점돌연변이 K322A를 포함하는 다른 돌연변이를 대안적으로 또는 추가적으로 보유할 수 있다(Hezareh et al. (2001) *J Virol*

75:12161-12168). 불변 영역에서 상기 돌연변이(들)를 가지는 항체는 게다가 차단 또는 비차단 항체일 수 있다.

[0168] 중쇄 불변 영역으로 도입될 때 감소한 이팩터 기능을 생성시키는 추가적인 치환은 예를 들어 문헌[Shields et al. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604]에 기재되어 있다. 특히 쉴즈(Shields) 등의 표 1("인간 FcRn 및 Fc γR에 대한 인간 IgG1 변이체의 결합") (이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)을 참조한다. 일련의 Fc 수용체(FcRn, Fc γRI, Fc γRIIA, Fc γRIIB 및 Fc γRIIIA 포함)에 대한 결합에 대해, 항-IgE 항체의 라이브러리(라이브러리의 각각의 항체는 중쇄 불변 영역에서 하나 이상의 치환이 다름)를 스크리닝함으로써, 저자는 특이적 Fc-Fc 수용체 상호작용을 조절하는 다수의 치환을 확인하였다. 예를 들어, CH2 도메인이 D265A 치환((상기) 카밧 등에 따른 중쇄 아미노산 넘버링)을 함유하는 변이체 IgG2a 중쇄 불변 영역은 변이체 불변 영역과 IgG Fc 수용체 Fc γRIIB, Fc γRIII, Fc γRI 및 Fc γRIV 사이의 상호작용의 완전한 소실을 발생시킨다. 쉴즈 등의 문헌(2001) 페이지 6595, 표 1. 또한, 문헌[Baudino et al. (2008) *J Immunol* 181:6664-6669 (상기)]을 참조한다.

[0169] 헌지 영역 내의 변화는 또한 이팩터 기능에 영향을 미친다. 예를 들어, 헌지 영역의 결실은 Fc 수용체에 대한 친화도를 감소시킬 수 있고 보체 활성화를 감소시킬 수 있다(Klein et al. (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 524-528). 본 개시내용은 따라서 또한 헌지 영역의 변경을 가지는 항체에 관한 것이다.

[0170] 몇몇 실시형태에서, 항-C5 항체는 증대되거나 감소한 보체 의존적 세포독성(CDC)을 나타내는 변경된 불변 영역을 함유할 수 있다. 조절된 CDC 활성은 항체의 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 도입함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어 미국 특히 제6,194,551호를 참조한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 시스테인 잔기(들)는 Fc 영역에서 도입되어서, 이 영역에서의 사슬간 다이설파이드 결합 형성을 허용할 수 있다. 이렇게 형성된 동종이합체 항체는 개선되거나 감소한 내재화 능력 및/또는 증가하거나 감소한 보체 매개 세포 사멸을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176:1191-1195 및 Shopes (1992) *Immuno* 148:2918-2922]; PCT 공보 WO 제99/51642호 및 WO 제94/29351호; 문헌[Duncan and Winter (1988) *Nature* 322:738-40]; 및 미국 특히 제5,648,260 및 5,624,821호를 참조한다.

[0171] 항체의 이팩터 기능을 조절하는 또 다른 가능한 수단은 예를 들어 문헌[Raju (2003) *BioProcess International* 1(4):44-53]에 요약된 글라이코실화의 변화를 포함한다. 라이트(Wright) 및 모리슨(Morrison)에 따르면, 인간 IgG 올리고사카라이드의 미세이질성(microheterogeneity)은 생물학적 기능, 예컨대 CDC 및 ADCC, 다양한 Fc 수용체에 대한 결합 및 Clq 단백질에 대한 결합에 영향을 미친다. (1997) *TIBTECH* 15:26-32. 항체의 글라이코실화 패턴은 생성 세포 및 세포 배양 조건에 따라 다를 수 있다(상기 Raju 문헌). 이러한 차이는 이팩터 기능 및 약동학 둘 다를 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌[Israel et al. (1996) *Immunology* 89(4):573-578; 및 Newkirk et al. (1996) *Clin Exp Immunol* 106(2):259-264]을 참조한다. 이팩터 기능의 차이는 이팩터 세포에 대한 Fc γ 수용체(Fc γR)에 결합하는 IgG의 능력과 관련될 수 있다. 쉴즈 등은 Fc γR에 대한 개선된 결합을 가지는 아미노산 서열의 변경을 가지는 IgG가 인간 이팩터 세포를 사용하여 100%까지 증대된 ADCC를 나타낼 수 있다는 것을 밝혀냈다. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604. 이 변경이 결합 계면에서 발견되지 않는 아미노산의 변화를 포함하지만, 당 성분의 성질, 및 이의 구조 패턴 둘 다가 관찰된 차이에 또한 기여할 수 있다. 또한, IgG의 올리고사카라이드 성분에서의 푸코스의 존재 또는 부재는 결합 및 ADCC를 개선할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Shields et al. (2002) *J Biol Chem* 277(30):26733-26740]을 참조한다. Asn²⁹⁷에 연결된 푸코실화 탄수화물이 부족한 IgG는 Fc γRI 수용체에 대한 일반 수용체 결합을 나타낸다. 반대로, Fc γRIIIA 수용체에 대한 결합은 50배 개선되고 특히 더 낮은 항체 농도에서 증대된 ADCC가 수반된다.

[0172] 항체의 이팩터 기능을 변경하기 위한 또 다른 접근법이 존재한다. 예를 들어, 항체 생성 세포는 과돌연변이유발 일 수 있어서, 전체 항체 분자에 걸쳐 무작위로 변경된 폴리펩타이드 잔기를 가지는 항체를 생성시킨다. 예를 들어, PCT 공보 WO 제05/011735호를 참조한다. 과돌연변이유발 숙주 세포는 DNA 미스매치 복구가 결핍된 세포를 포함한다. 이러한 방식으로 생성된 항체는 덜 항원성이고/이거나, 유리한 약동학적 특성을 가질 수 있다. 추가적으로, 이러한 항체는 증대되거나 감소한 이팩터 기능(들)과 같은 특성에 선택될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기에 유용한 분자 생물학 기법의 추가적인 상세내용은 하기 기재되어 있다.

제조합 항체 발현 및 정제

[0174] 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 분자 생물학 및 단백질 화학의 분야에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 다를 코딩하는 핵산은 전사 및 번역 조절 서열을 함유하는 발현 벡터로 삽입될 수 있고, 이 서열은 예를 들어 프로모터 서열,

리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 중지 서열, 번역 시작 및 중지 서열, 전사 종결자 신호, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함한다. 조절 서열은 프로모터 및 전사 시작 및 중지 서열을 포함한다. 또한, 발현 벡터는 하나 초과의 복제 시스템을 포함할 수 있어서, 이것은 2개의 상이한 유기체, 예를 들어 발현을 위한 포유동물 또는 곤충 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵생물 숙주에서 유지될 수 있다.

[0175] 다양한 변형, 예를 들어 치환은 당해 분야의 당업자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 본 명세서에 기재된 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA 서열로 도입될 수 있다. 예를 들어, 항체의 하나 이상의 CDR 위치에서의 히스티딘 치환의 도입은 표준 방법, 예컨대 PCR 매개 돌연변이유발을 이용하여 수행될 수 있고, 여기서 돌연변이된 뉴클레오타이드는 PCR 프라이머로 혼입되어서, PCR 생성물은 원하는 돌연변이 또는 부위 지정 돌연변이유발을 함유한다. 치환은 하나 이상의 CDR 영역으로 도입되어서 예를 들어 pH 7.4 또는 pH 6.0에서 항원에 대한 항체의 K_D 를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 부위 지정 돌연변이유발에서의 기법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌을 참조한다.

[0176] 여러 가능한 벡터 시스템은 포유동물 세포에서 핵산으로부터의 클로닝된 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드의 발현에 이용 가능하다. 일 종류의 벡터는 숙주 세포 계놈으로의 원하는 유전자 서열의 통합에 따라 달라진다. 안정하게 통합된 DNA를 가지는 세포는 약물 내성 유전자, 예컨대 이. 콜라이 gpt(Mulligan and Berg (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072) 또는 *Tn5* 네오(Southern and Berg (1982) *Mol Appl Genet* 1:327)를 동시에 도입함으로써 선택될 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현시키고자 하는 DNA 유전자 서열에 연결되거나, 동시형질감염에 의해 동일한 세포로 도입될 수 있다(Wigler et al. (1979) *Cell* 16:77). 제2 유형의 벡터는 염색체와 플라스미드에 자체적으로 복제하는 능력을 부여하는 DNA 요소를 이용한다. 이 벡터는 동물 바이러스, 예컨대 소파필로마 바이러스(Sarver et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7147), 사이토메갈로 바이러스, 폴리오마 바이러스(Deans et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1292) 또는 SV40 바이러스(Lusky and Botchan (1981) *Nature* 293:79)로부터 유래할 수 있다.

[0177] 발현 벡터는 후속하는 핵산의 발현에 적합한 방식으로 세포로 도입될 수 있다. 도입의 방법은 하기 기재된 표적화된 세포 유형에 의해 주로 좌우된다. 예시적인 방법은 CaPO_4 침전, 리포솜 융합, 양이온성 리포솜, 전기천공, 바이러스 감염, 엑스트란 매개 형질감염, 폴리브렌 매개 형질감염, 원형질체 융합 및 직접 마이크로주사를 포함한다.

[0178] 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현에 적절한 숙주 세포는 효모, 박테리아, 곤충, 식물 및 포유동물 세포를 포함한다. 박테리아, 예컨대 이. 콜라이, 진균, 예컨대 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 퍼치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 곤충 세포, 예컨대 SF9, 포유동물 세포주(예를 들어, 인간 세포주), 및 1차 세포주가 특히 중요하다.

[0179] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 형질전환 동물(예를 들어, 형질전환 포유동물)에서 발현되거나 이로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 항체는 예를 들어 문헌[Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159; 및 Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2):147-157]에 기재된 바대로 형질전환 비인간 포유동물(예를 들어, 설치류)에서 생성되고 젖으로부터 단리될 수 있다.

[0180] 항체 및 이의 단편은 단백질의 발현을 허용하기에 충분한, 시간 동안 및 조건 하에, 항체 또는 단편을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 세포로부터 제조될 수 있다. 단백질 발현을 위한 이러한 조건은 발현 벡터 및 숙주 세포의 선택에 의해 변할 것이고, 일상적 실험을 통해 당해 분야의 당업자에 의해 용이하게 확인될 것이다. 예를 들어, 이. 콜라이에서 발현된 항체는 봉입체로부터 재풀딩될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30] 참조). 박테리아 발현 시스템 및 이의 사용 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, 및 *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* --3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)] 참조). 코돈, 적합한 발현 벡터 및 적합한 숙주 세포의 선택은 다수의 인자에 따라 달라질 것이고, 필요한 바대로 용이하게 촉적화될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체(또는 이의 단편)는 포유동물 세포 또는 효모, 바콜로바이러스, 및 실험실내 발현 시스템을 포함하는 다른 발현 시스템에서 발현될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kaszubska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220] 참조).

[0181] 발현 이후, 항체 및 이의 단편은 단리될 수 있다. 용어 "정제된" 또는 "단리된"은, 본 명세서에 기재된 임의의 단백질(항체 또는 단편)에 적용되는 것처럼, 천연으로 이것을 수반하는 성분(예를 들어, 단백질 또는 다른 천연

발생 생물학적 또는 유기 분자)으로부터 분리되거나 정제된 폴리펩타이드, 예를 들어 단백질을 발현하는 원핵생물에서의 다른 단백질, 지질 및 핵산을 의미한다. 통상적으로, 폴리펩타이드는 샘플 내의 전체 단백질의 중량 기준으로 적어도 60%(예를 들어, 적어도 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97 또는 99%)를 구성할 때 정제된다.

[0182] 항체 또는 이의 단편은 다른 성분이 샘플에 존재하는 것에 따라 당해 분야의 당업자에게 공지된 다양한 방식으로 단리되거나 정제될 수 있다. 표준 정제 방법은 전기영동, 분자, 면역학적 및 크로마토그래피 기법, 예컨대 이온 교환, 소수성, 친화도, 및 역상 HPLC 크로마토그래피를 포함한다. 예를 들어, 항체는 표준 항-항체 칼럼(예를 들어, 단백질-A 또는 단백질-G 칼럼)을 통해 정제될 수 있다. 단백질 농도와 관련하여 한외여과 및 정용여과 기법이 또한 유용하다. 예를 들어, 문헌[Scopes (1994) "Protein Purification, 3rd edition," Springer-Verlag, New York City, New York]을 참조한다. 필요한 정제의 정도는 원하는 용도에 따라 달라질 것이다. 몇몇 경우에, 발현된 항체 또는 이의 단편의 정제가 필요하지 않을 것이다.

[0183] 정제된 항체 또는 이의 단편의 수율 또는 순도를 결정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 브래드포드(Bradford) 검정, UV 분광법, 뷔렛(Biuret) 단백질 검정, 로리(Lowry) 단백질 검정, 아미도 블랙 단백질 검정, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 질량 분광법(MS) 및 겔 전기영동 방법(예를 들어, 단백질 염색, 예컨대 쿠마시 블루 또는 콜로이드성 은 염색을 이용)을 포함한다.

[0184] 몇몇 실시형태에서, 내독소는 항체 또는 단편으로부터 제거될 수 있다. 단백질 샘플로부터 내독소를 제거하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 내독소는 제한 없이 프로테오스핀(ProteoSpin)(상표명) 내독소 제거 키트(Norgen Biotek Corporation), 데톡시-겔(Detoxi-Gel) 내독소 제거 겔(써모 사이언티픽(Thermo Scientific); 피어스 프로테인 리서치 프로덕츠(Pierce Protein Research Products)), 미라클린(MiraCLEAN)(등록상표) 내독소 제거 키트(Mirus), 또는 아크로디스크(Acrodisc)(상표명) - 무스탕(Mustang)(등록상표) E 막(Pall Corporation)을 포함하는 다양한 상업적으로 구입 가능한 시약을 사용하여 단백질 샘플로부터 제거될 수 있다.

[0185] (정제 전 및 후 둘 다) 샘플에 존재하는 내독소의 양을 검출하고/하거나 측정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 상업용 키트가 구입 가능하다. 예를 들어, 단백질 샘플 중의 내독소의 농도는 QCL-1000 발색 키트(BioWhittaker) 또는 리필루스 아메바성 용해물(limulus amebocyte lysate: LAL) 기반 키트, 예컨대 피로텔(Pyrotell)(등록상표), 피로텔(등록상표)-T, 피로크롬(Pyrochrome)(등록상표), 크로모(Chromo)-LAL 및 어소시에이트 오브 케이프 코드 인코포레이티드(Associates of Cape Cod Incorporated)로부터 구입 가능한 CSE 키트를 사용하여 결정될 수 있다.

항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변형

[0187] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이의 발현 및 정제 후에 변형될 수 있다. 변형은 공유 또는 비공유 변형일 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 폴리펩타이드의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 부사슬 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써, 항체 또는 단편으로 도입될 수 있다. 변형에 적합한 부위는 예를 들어 항체 또는 단편의 구조 분석 또는 아미노산 서열 분석을 포함하는 임의의 다양한 기준을 이용하여 선택될 수 있다.

[0188] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 비상동성 모이어티로 접합될 수 있다. 비상동성 모이어티는 예를 들어 비상동성 폴리펩타이드, 치료제(예를 들어, 독소 또는 약물), 또는 검출 가능한 라벨, 예컨대 방사성 라벨, 효소 라벨, 형광 라벨, 중금속 라벨, 발광 라벨, 또는 친화도 태그, 예컨대 바이오틴 또는 스트렙타비딘(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다. 적합한 비상동성 폴리펩타이드는 항체 또는 단편을 정제하는 데 사용하기 위한 예를 들어 항원 태그(예를 들어, FLAG(DYKDDDDK(서열 번호 20)), 폴리히스티딘(6-His; HHHHHH(서열 번호 21)), 헤마글루티닌(HA; YPYDVPDYA(서열 번호 22)), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 또는 말토스 결합 단백질(MBP))을 포함한다. 비상동성 폴리펩타이드는 진단학적 또는 검출 가능한 마커로서 유용한 폴리펩타이드(예를 들어, 효소), 예를 들어 루시퍼라제, 형광 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질(GFP)) 또는 클로로암페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)를 또한 포함한다. 적합한 방사성 라벨은 예를 들어 ³²P, ³³P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S 및 ³H를 포함한다. 적합한 형광 라벨은 제한 없이 플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오사이아네이트(FITC), 녹색 형광 단백질(GFP), 디아라이트(DyLight)(상표명) 488, 피코에리트린(PE), 프로피odium 요오다이드(PI), PerCP, PE-알렉사 플루오르(Alexa Fluor)(등록상표) 700, Cy5, 알로피코사이아닌 및 Cy7을 포함한다. 발광 라벨은 예를 들어 임의의 다양한 발광 란탄족(예를 들어, 유로퓸 또는 테르븀) 킬레이트를 포함한다. 예를 들어, 적합한 유

로퓸 킬레이트는 다이에틸렌 트라이아민 펜타아세트산(DTPA) 또는 테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)의 유로퓸 킬레이트를 포함한다. 효소 라벨은 예를 들어 알칼리 포스파타제, CAT, 루시퍼라제 및 겨자무과산화효소를 포함한다.

[0189] 2개의 단백질(예를 들어, 항체 및 비상동성 모이어티)은 임의의 다수의 공지된 화학 가교결합제를 사용하여 가교결합될 수 있다. 이러한 가교결합제의 예는 "방해" 다이설파이드 결합을 포함하는 연결을 통해 2개의 아미노산 잔기를 연결하는 것이다. 이 연결에서, 가교결합 단위 내의 다이설파이드 결합은 예를 들어 환원된 글루타티온 또는 효소 다이설파이드 환원효소의 작용에 의한 환원으로부터 (다이설파이드 결합의 측면에서 기를 방해함으로써) 보호된다. 하나의 적합한 시약, 4-숙신이미딜옥시카보닐- α -메틸- α (2-페리딜다이티오) 톨루엔(SMPT)은 단백질 중 하나에서 말단 라이신을 이용하고 다른 하나에서 말단 시스테인을 이용하는 2개의 단백질 사이의 이러한 연결을 형성한다. 각각의 단백질에서의 상이한 커플링 모이어티에 의해 가교결합하는 이종작용성 시약을 또한 사용할 수 있다. 다른 유용한 가교결합제는 제한 없이 아르기닌의 부사슬에 존재하는 2개의 아미노기(예를 들어, N-5-아지도-2-나트로벤조일옥시숙신이미드), 2개의 설프하이드릴기(예를 들어, 1,4-비스-말레이이미도뷰탄), 아미노기 및 설프하이드릴기(예를 들어, m-말레이이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터), 아미노기 및 카복실기(예를 들어, 4-[p-아지도살리실아미도]뷰틸아민), 및 아미노기 및 구아니디늄기(예를 들어, p-아지도페닐 글라이옥살 1수화물)를 연결하는 시약을 포함한다.

[0190] 몇몇 실시형태에서, 방사성 라벨은 항체의 아미노산 골격에 직접적으로 접합될 수 있다. 대안적으로, 방사성 라벨은 더 큰 분자(예를 들어, 유리 아미노기에 결합하여 관련 단백질의 메타-요오도페닐(mIP) 유도체를 형성하는 메타-[¹²⁵I]요오도페닐-N-하이드록시숙신이미드([¹²⁵I]mIPNHS) 내의 ¹²⁵I(예를 들어, 문헌[Rogers et al. (1997) *J Nuc1 Med* 38:1221-1229] 참조) 또는 결국 단백질 골격에 결합하는 킬레이트(예를 들어, DOTA 또는 DTPA에 대한 킬레이트)의 부분으로서 포함될 수 있다. 방사성 라벨 또는 이를 함유하는 더 큰 분자/킬레이트를 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편에 접합하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은 단백질에 대한 방사성 라벨 또는 킬레이트의 결합을 수월하게 하는 조건(예를 들어, pH, 염 농도 및/또는 온도) 하에 단백질을 방사성 라벨과 항온처리하는 단계를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제6,001,329호 참조).

[0191] 형광 라벨(때때로 "형광단"이라 칭함)을 단백질(예를 들어, 항체)에 접합하는 방법은 단백질 화학의 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 형광단은 형광단에 부착된 숙신이미딜(NHS) 에스터 또는 테트라플루오로페닐(TFP) 에스터 모이어티를 사용하여 단백질의 유리 아미노기(예를 들어, 라이신) 또는 설프하이드릴기(예를 들어, 시스테인)에 접합될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 형광단은 이종작용성 가교결합제 모이어티, 예컨대 설포-SMCC에 접합될 수 있다. 적합한 접합 방법은 단백질에 대한 형광단의 결합을 수월하게 하는 조건 하에 항체 단백질, 또는 이의 단편을 형광단과 항온처리하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Welch and Redvanly (2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications," John Wiley and Sons (ISBN 0471495603)]을 참조한다.

[0192] 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 단편은 예를 들어 혈액, 혈청, 또는 다른 조직에서 순환 시 예를 들어 항체의 안정화 및/또는 보유를 개선하는 모이어티에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 단편은 예를 들어 문헌[Lee et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10(6): 973-8; Kinstler et al. (2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485; 및 Roberts et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476]에 기재된 바대로 PEG화 또는 HES화(Fresenius Kabi(독일); 예를 들어 문헌[Pavsic et al. (2010) *Int J Pharm* 387(1-2):110-119] 참조)될 수 있다. 안정화 모이어티는 적어도 1.5배(예를 들어, 적어도 2배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 40배 또는 50배 이상)의 항체(또는 단편)의 안정성, 또는 보유를 개선할 수 있다.

[0193] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 글라이코실화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 효소 또는 화학 처리로 처리되거나, 세포로부터 생성될 수 있어서, 항체 또는 단편은 감소한 글라이코실화를 가지거나 이것이 부재한다. 감소한 글라이코실화를 가지는 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 제6,933,368호; 문헌[Wright et al. (1991) *EMBO J* 10(10):2717-2723; 및 Co et al. (1993) *Mol Immunol* 30:1361]에 기재되어 있다.

약제학적 조성물 및 제제

[0195] 본 명세서에 기재된 조성물은 예를 들어 보체 관련 장애의 치료 또는 예방을 위해 대상체에 대한 투여를 위해 약제학적 용액으로서 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 것이다. 본 명세서에 사용되는 바대로, "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든

용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 의미하고 이들을 포함한다. 조성물은 약제학적으로 허용되는 염, 예를 들어 산 부가염 또는 염기 부가염(예를 들어, 문헌[Berge et al. (1977) *J Pharm Sci* 66:1-19] 참조)을 포함할 수 있다.

[0196] 조성물은 표준 방법에 따라 제제화될 수 있다. 약제학적 제제는 널리 확립된 분야이고, 추가로 예를 들어 문헌 [Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems," 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); 및 Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association," 3rd Edition (ISBN: 091733096X)]에 기재되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은, 예를 들어 적합한 농도의, 2-8°C(예를 들어, 4°C)에서의 저장에 적합한 완충 용액으로서 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 0°C 미만의 온도(예를 들어, -20°C 또는 -80°C)에서의 저장을 위해 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 2-8°C(예를 들어, 4°C)에서의 2년 이하(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 1½년 또는 2년) 동안의 저장을 위해 제제화될 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 2-8°C(예를 들어, 4°C)에서의 적어도 1년 동안의 저장에서 안정하다.

[0197] 약제학적 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이 형태는 예를 들어 액체, 반고체 및 고체 제형, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사용 및 점적주사 가능한 용액), 분산제 또는 혼탁제, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌제를 포함한다. 바람직한 형태는 부분적으로 의도되는 투여 방식 및 치료학적 적용에 따라 달라진다. 예를 들어, 전신 또는 국소 전달에 의도되는 조성물을 함유하는 조성물은 주사용 또는 점적주사 가능한 용액의 형태일 수 있다. 따라서, 조성물은 비경구 방식(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사)에 의한 투여에 대해 제제화될 수 있다. "비경구 투여", "비경구로 투여된" 및 다른 문법상 동등한 구절은, 본 명세서에 사용되는 바대로, 보통 주사에 의한 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 제한 없이 정맥내, 비강내, 안내, 폐, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절낭내(intracapsular), 안와하, 심장내, 피내, 폐내, 복강내, 기관지내, 피하, 각피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외, 대뇌내, 두개내, 경동맥내 및 흉골내 주사 및 점적주사(하기 참조)를 포함한다.

[0198] 상기 조성물은 높은 농도에서 안정한 저장에 적합한 용액, 마이크로에멀션, 분산제, 리포솜, 또는 다른 순서화 구조로서 제제화될 수 있다. 적절한 용매 중에 필요한 양의 본 명세서에 기재된 조성물을 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이의 조합과 혼입한 후, 필터 살균하여 무균 주사용 용액을 제조할 수 있다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 조성물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 무균 비히클로 혼입함으로써 분산액을 제조한다. 무균 주사용 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우에, 제조 방법은 이의 이전에 무균 여과된 용액으로부터 본 명세서에 기재된 조성물과 임의의 추가적인 원하는 성분(하기 참조)의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결 건조를 포함한다. 용액의 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 시약, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 함유함으로써 될 수 있다.

[0199] 본 명세서에 기재된 조성물은 또한 면역리포솜 조성물에서 제제화될 수 있다. 이러한 제제는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 문헌[Epstein et al. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3688; Hwang et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4030]; 및 미국 특허 제4,485,045호 및 4,544,545호에 기재된 방법의 의해 제조될 수 있다. 증대된 순환 시간을 가지는 리포솜은 예를 들어 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

[0200] 소정의 실시형태에서, 조성물은 신속 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체, 예컨대 임플란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제와 제제화될 수 있다. 생분해 가능한, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스터 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제제의 많은 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[J.R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems," Marcel Dekker, Inc., New York]을 참조한다.

[0201] 몇몇 실시형태에서, 조성물은 포유동물, 예컨대 인간에 대한 폐내 투여(예를 들어, 흡입기 또는 분무기를 통한 투여)에 적합한 조성물 중에 제제화될 수 있다. 이러한 조성물을 제제화하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제20080202513호; 미국 특허 제7,112,341호 및 6,019,968호; 및 PCT 공보 WO 제00/061178호 및 WO 제06/122257호(각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에

기재되어 있다. 건조 분말 흡입기 제제 및 제제의 투여에 적합한 시스템은 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제20070235029호, PCT 공보 WO 제00/69887호; 및 미국 특허 제5,997,848호에 기재되어 있다. 폐내 투여에 적합한 추가적인 제제(및 폴리펩타이드를 제제화하는 방법)는 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제20050271660호 및 20090110679호에 기재되어 있다.

[0202] 몇몇 실시형태에서, 조성물은 눈에 대한 전달을 위해 제제화될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "눈"은 눈과 연관된 임의의 및 모든 해부학적 조직 및 구조를 의미한다. 눈은 외부 망막, 중간 맥락막 층 및 외부 망막의 3개의 명확한 층으로 이루어진 벽을 가진다. 수정체 뒤의 방은 유리액이라 칭하는 젤라틴질 유체로 충전된다. 눈의 뒤에 광을 검출하는 망막이 있다. 각막은 눈의 뒤로 상을 옮기는 광학적으로 투명한 조직이다. 각막은 눈으로 약물을 침투시키기 위한 하나의 경로를 포함한다. 눈과 연관된 다른 해부학적 조직 구조는 분비 체계, 분배 체계 및 배출 체계를 포함하는 눈물 방수 체계를 포함한다. 분비 체계는 눈물 증발로 인한 온도 변화 및 깜빡거림에 의해 자극되는 분비선 및 원심성 부교감 신경 공급을 가지고 신체 또는 감정 자극에 반응하여 눈물을 분비하는 반사 분비선을 포함한다. 분배 체계는 눈꺼풀 및 열린 눈의 눈꺼풀 테두리 주위의 누도(tear meniscus)를 포함하고, 이것은 깜빡거려서 눈 표면에 걸쳐 눈물을 분산시켜 건성 부위가 진행되는 것을 감소시킨다.

[0203] 몇몇 실시형태에서, 조성물은 국소로, 예를 들어 국소 적용 또는 유리체내 주사에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 조성물은 눈 점안액에 의한 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0204] 눈을 치료하기 위한 치료학적 제제는 약제학적으로 허용되는 용액, 혼탁제 또는 연고 중의 약 0.01 내지 약 1중량%, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.5중량%의 농도의 하나 이상의 활성제를 함유할 수 있다. 제제는 바람직하게는 예를 들어 추가적인 성분, 예컨대 보존제, 완충제, 등장화제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤화 또는 투명화 물질, 및 점도 증가제(이들로 제한되지는 않음)를 함유하는 무균 수용액의 형태일 것이다.

[0205] 이러한 용액에 사용하기에 적합한 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 클로로뷰탄올, 티메로살 등을 포함한다. 적합한 완충제는 약 pH 6 내지 pH 8, 바람직하게는 약 pH 7 내지 pH 7.5의 pH를 유지시키기에 충분한 양으로 예를 들어 봉산, 중탄산나트륨 및 중탄산칼륨, 봉산나트륨 및 봉산칼륨, 탄산나트륨 및 탄산칼륨, 아세트산나트륨, 및 나트륨 바이포스페이트를 포함한다. 적합한 등장화제는 텍스트란 40, 텍스트란 70, 텍스트로스, 글라이세린, 염화칼륨, 프로필렌 글리콜, 및 염화나트륨이다.

[0206] 적합한 항산화제 및 안정화제는 나트륨 바이설파이트, 나트륨 메타바이설파이트, 나트륨 티오설파이트 및 티오우레아를 포함한다. 적합한 습윤 및 투명화제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20, 폴록사미 282 및 텔록사폴을 포함한다. 적합한 점도 증가제는 텍스트란 40, 텍스트란 70, 젤라틴, 글라이세린, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시메틸프로필셀룰로스, 라놀린, 메틸셀룰로스, 페트롤라툼, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈 및 카복시메틸셀룰로스를 포함한다. 제제는 종래의 방법에 의해, 예를 들어 점안액의 형태로, 또는 하나 이상의 조성물을 함유하는 치료학적 용액 중에 눈을 씻어냄으로써 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, AMD로 고통받는 대상체)의 눈에 국소로 투여될 수 있다.

[0207] 또한, 눈의 유리체강으로 약물을 도입하기 위한 다양한 장치가 개발되었다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제20020026176호는 공막으로 삽입될 수 있는 의약품 함유 플러그를 기술하고, 그래서 이것은 유리체강으로 돌출되어 약제학적 물질을 유리체강으로 전달한다. 또 다른 예에서, 미국 특허 제5,443,505호는 눈의 내부로의 약물의 지속 방출을 위해 맥락막상의 공간 또는 무혈관 영역으로 도입하기 위한 이식 가능한 장치를 기술한다. 미국 특허 제5,773,019호 및 6,001,386호는 각각 눈의 공막 표면에 부착 가능한 이식 가능한 약물 전달 장치를 개시한다. 장치는 저용해도 물질에 투과성인 비생분해성 중합체에 의해 덮인 유효량의 저용해도 물질을 함유하는 내부 코어를 포함한다. 조작 동안, 저용해도 물질은 장치로부터의 지속 방출을 위한 생분해성 중합체 커버를 침투한다. 눈에 대한 치료제의 전달을 위한 추가적인 방법 및 장치(예를 들어, 경공막 패치 및 콘택트 렌즈를 통한 전달)는 예를 들어 문헌[Ambari and Adamis (2002) *Prog Retin Eye Res* 21(2):145-151; Ranta and Urtti (2006) *Adv Drug Delivery Rev* 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) *Expert Opin Drug Delivery* 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-2347; Kim et al. (2007) *Ophthalmic Res* 39:244-254]; 및 PCT 공보 WO 제04/073551호(이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0208] 상기 기재된 바와 같이, 비교적 고농도의 조성물이 제조될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 약 10mg/ml 내지 100mg/ml(예를 들어, 약 9mg/ml 내지 90mg/ml; 약 9mg/ml 내지 50mg/ml; 약 10mg/ml 내지 50mg/ml; 약 15mg/ml 내지 50mg/ml; 약 15mg/ml 내지 110mg/ml; 약 15mg/ml 내지 100mg/ml; 약 20mg/ml 내지 100mg/ml; 약 20mg/ml 내

지 80mg/ml; 약 25mg/ml 내지 100mg/ml; 약 25mg/ml 내지 85mg/ml; 약 20mg/ml 내지 50mg/ml; 약 25mg/ml 내지 50mg/ml; 약 30mg/ml 내지 100mg/ml; 약 30mg/ml 내지 50mg/ml; 약 40mg/ml 내지 100mg/ml; 또는 약 50mg/ml 내지 100mg/ml)의 농도에서 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 5mg/ml 초과 및 50mg/ml 미만의 농도에서 제제화될 수 있다. 수용액 중에 단백질을 제제화하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 제7,390,786호; 문헌[McNally and Hastedt (2007), "Protein Formulation and Delivery," Second Edition, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Volume 175, CRC Press; 및 Banga (2005), "Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems, Second Edition" CRC Press]에 기재되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 수용액은 중성 pH, 예를 들어 6.5 내지 8(예를 들어, 7 내지 8(포함))의 예를 들어 pH를 가진다. 몇몇 실시형태에서, 수용액은 약 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 또는 8.0의 pH를 가진다. 몇몇 실시형태에서, 수용액은 6 초과(또는 이상)(예를 들어, 6.1 이상, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8 또는 7.9)이지만, pH 8 미만인 pH를 가진다.

[0209]

치료학적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산은, 세포 내에 발현하고 물질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 핵산을 전달하기 위해, 유전자 치료 프로토콜의 부분으로서 사용되는 유전자 작제물로 혼입될 수 있다. 이러한 성분의 발현 작제물, 예를 들어 생체내 세포에 성분 유전자를 효과적으로 전달할 수 있는 임의의 제제 또는 조성물은 임의의 치료학적으로 효과적인 담체 중에 투여될 수 있다. 접근법은 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 렌티바이러스, 및 단순 포진 바이러스-1(HSV-1), 또는 재조합 박테리아 또는 진핵생물 플라스미드를 포함하는 바이러스 벡터에서의 해당 유전자의 삽입을 포함한다. 바이러스 벡터는 직접적으로 세포를 형질감염시킬 수 있고; 플라스미드 DNA는 예를 들어 양이온성 리포솜(리포택틴) 또는 유도체화, 폴리라이신 접합체, 그라미시딘 S, 인공 바이러스 피막 또는 다른 이러한 세포내 운반체에 의해 전달될 수 있고, 유전자 작제물의 직접 주사 또는 CaPO₄ 침전(예를 들어, WO 제04/060407호 참조)이 생체내 수행된다. (또한, 하기 "생체 외 접근법"을 참조한다.) 적합한 레트로바이러스의 예는 당해 분야의 당업자에 공지된 pLJ, pZIP, pWE 및 pEM을 포함한다(예를 들어, 문헌[Eglitis et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J Immunol* 150:4104-4115]; 미국 특허 제4,868,116호 및 제4,980,286호; 및 PCT 공보 WO 제89/07136호, WO 제89/02468호, WO 제89/05345호 및 WO 제92/07573호 참조). 또 다른 바이러스 유전자 전달 시스템은 아데노 바이러스 유래 벡터를 이용한다(예를 들어, 문헌[Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; 및 Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155] 참조). 아데노바이러스 균주 Ad 5형 dl324 또는 아데노바이러스의 다른 균주(예를 들어, Ad2, Ad3, Ad7 등)로부터 유래한 적합한 아데노바이러스 벡터는 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 해당 유전자의 전달에 유용한 훨씬 또 다른 바이러스 벡터 시스템은 아데노 관련 바이러스(adeno-associated virus: AAV)이다. 예를 들어, 문헌[Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828; 및 McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62:1963-1973]을 참조한다.

[0210]

몇몇 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료제, 예를 들어 대상체에서 보체 관련 장애(예를 들어, AP 관련 장애 또는 CP 관련 장애)를 치료하거나 예방하기 위한 추가적인 치료제에 의해 제제화될 수 있다. 대상체에서 보체 관련 장애를 치료하기 위한 추가적인 물질은 치료되는 특정한 장애에 따라 달라질 것이지만, 제한 없이 [예를 들어, HELLP 증후군을 치료하기 위해 사용하기 위한] 항고혈압제(예를 들어, 안지오텐신 전환 효소 저해제), 항응고제, 코티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손), 또는 면역억제제(예를 들어, 빙크리스틴 또는 사이클로스포린 A)를 포함할 수 있다. 항응고제의 예는 예를 들어 와파린(Coumadin), 아스피린, 헤피린, 페니디온, 폰다파리눅스, 이드라파리눅스 및 트롬빈 저해제(예를 들어, 아르가트로반, 레피루딘, 비발리루딘 또는 다비가트란)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물은 보체 관련 장애의 치료를 위해 혈소판용해제(예를 들어, 앤크로드, ϵ -아미노카르보산, 안티플라스민-a₁, 프로스타사이클린 및 디피브로타이드)와 또한 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 지질 저하제, 예컨대 하이드록시메틸글루타릴 CoA 환원효소의 저해제와 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 항-CD20 물질, 예컨대 리툭시맙(Rituxan(상표명); Biogen Idec (매사추세츠주 캠브리지))과 사용하기 위해 또는 이것과 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 예를 들어 RA의

치료를 위해, 조성물은 인플릭시맙(Remicade(등록상표); Centocor, Inc.) 및 메토트렉세이트(Rheumatrex(등록상표), Trexall(등록상표)) 중 하나 또는 둘 다와 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 비스테로이드성 소염 약물(NSAID)과 제제화될 수 있다. 많은 상이한 NSAID, 이부프로펜(Advil(등록상표), 모트린(등록상표), Nuprin(등록상표)) 및 나프록센(Alleve(등록상표))을 포함하는 몇몇 일반 의약품이 이용 가능하고, 멜록시캄(Mobic(등록상표)), 에토돌락(Lodine(등록상표)), 나부메툰(Relafen(등록상표)), 술린닥(Clinoril(등록상표)), 톨레멘틴(Tolectin(등록상표)), 콜린 마그네슘 살리실레이트(Trilasate(등록상표)), 디클로페낙(Cataflam(등록상표), Voltaren(등록상표), Arthrotec(등록상표)), 디플루시날(Dolobid(등록상표)), 인도메타신(Indocin(등록상표)), 케토프로펜(Orudis(등록상표), Oruvail(등록상표)), 옥사프로진(Daypro(등록상표)) 및 페록시캄(Feldene(등록상표))을 포함하는 많은 것들이 처방전에 의해 이용 가능하다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 항고혈압제, 항발작제(예를 들어, 황산마그네슘) 또는 항혈전성제와 사용하기 위해 제제화될 수 있다. 항고혈압제는 예를 들어 라베탈를, 하이드랄라진, 니페디핀, 칼슘 채널 길항제, 니트로글라이세린 또는 나트륨 니트로프루시에이트를 포함한다. (예를 들어, 문헌[Mihu et al. (2007) *J Gastrointestin Liver Dis* 16(4):419-424] 참조.) 항혈전성제는 예를 들어 헤파린, 안티트롬빈, 프로스타사이클린 또는 저용량 아스피린을 포함한다.

[0211]

몇몇 실시형태에서, 폐내 투여를 위해 제제화된 조성물은 폐 장애를 치료하기 위한 적어도 하나의 추가적인 활성제를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 활성제는 예를 들어 항-IgE 항체(예를 들어, 오말리주맙), 항-IL-4 항체 또는 항-IL-5 항체, 항-IgE 저해제(예를 들어, 몬테루카스트 나트륨), 교감신경흥분제(예를 들어, 알부테롤), 항생제(예를 들어, 토브라마이신), 데옥시리보뉴클레아제(예를 들어, Pulmozyme(등록상표)), 항콜린 약물(예를 들어, 이프라트로피움 브로마이드), 코티코스테로이드(예를 들어, 텍사메타손), β -아드레노수용체 효현제, 류코트리엔 저해제(예를 들어, 질루톤), 5-리폭시게나아제 저해제, PDE 저해제, CD23 길항제, IL-13 길항제, 사이토킨 방출 저해제, 히스타민 H1 수용체 길항제, 항히스타민제, 소염제(예를 들어, 크로몰린 나트륨) 또는 히스타민 방출 저해제일 수 있다.

[0212]

몇몇 실시형태에서, 조성물은 눈의 보체 관련 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 하나 이상의 추가적인 치료제에 의한 투여를 위해 제제화될 수 있다. 이러한 추가적인 치료제는 예를 들어 베바시주맙, 또는 베바시주맙 또는 라니비주맙의 Fab 단편(둘 다 로슈 파마슈티컬즈, 인코포레이티드(Roche Pharmaceuticals, Inc.)사제) 및 폐갑تا닙 나트륨(뮤코겐(Mucogen)(등록상표); Pfizer, Inc.(화이자, 인코포레이티드))일 수 있다. 이러한 키트는 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 설명서를 임의로 또한 포함할 수 있다.

[0213]

몇몇 실시형태에서, 조성물은 정맥내 감마 글로불린 치료(intravenous gamma globulin therapy: IVIG), 혈장교환(plasmapheresis), 혈장 대체 또는 혈장 교환과 함께 대상체에 대한 투여를 위해 제제화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 신장 이식 전에, 동안에 또는 후에 제제화될 수 있다.

[0214]

조성물을 제2 활성제와 조합하여 사용하고자 할 때, 조성물은 제2 물질과 동시에 제제화될 수 있거나, 조성물은 제2 물질 제제와 별개로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 각각의 약제학적 조성물은 예를 들어 투여 바로 전에 혼합되고 함께 투여될 수 있거나, 예를 들어 동시에 또는 다른 시간에 별개로 투여될 수 있다(하기 참조).

[0215]

적용

[0216]

본 명세서에 기재된 조성물은 다수의 진단학적 및 치료학적 적용에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 검출 가능하게 표지된 항원 결합 분자는 샘플(예를 들어, 생물학적 샘플) 중의 표적 항원의 존재 또는 양을 검출하기 위해 검정에서 사용될 수 있다. 조성물은 표적 항원 기능의 저해를 연구하기 위해 실험실내 검정에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 조성물이 보체 단백질에 결합하고 이를 저해하는 몇몇 실시형태에서, 조성물은 보체 활성을 저해하거나 달리 보체 관련 장애를 치료하기에 유용한 추가적인 신규한 화합물을 확인하도록 설계된 검정에서 양성 대조군으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, C5 저해 조성물은 MAC의 C5 생성 또는 형성을 감소시키거나 무효화하는 추가적인 화합물(예를 들어, 소분자, 암타마 또는 항체)을 확인하기 위한 검정에서 양성 대조군으로서 사용될 수 있다. 조성물은 하기에 설명된 바대로 치료학적 방법에서 또한 사용될 수 있다.

[0217]

치료 방법

[0218]

본 명세서에 기재된 조성물은 부분적으로 투여 경로에 따라 달라지는 다양한 방법을 이용하여 대상체, 예를 들어 인간 대상체에게 투여될 수 있다. 경로는 예를 들어 정맥내 주사 또는 점적주사(IV), 피하 주사(SC), 복강내(IP) 주사, 또는 근육내 주사(IM)일 수 있다.

[0219]

피하 투여는 장치에 의해 달성될 수 있다. 장치 수단은 주사기, 프리필드 주사기, 일회용 또는 재사용을 위한

자동 주사기, 웬 주사기, 패치 주사기, 착용형 주사기, 피하 점적주사 세트를 가지는 보행용 주사기 점적주사 펌프 또는 피하 주사를 위해 항체 약물과 조합하기 위한 다른 장치일 수 있다.

[0220] 투여는 예를 들어 국소 점적 주사 또는 임플란트에 의해 달성될 수 있다. 임플란트는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴질 재료, 예컨대 막, 예컨대 시알라스틱(sialastic) 막 또는 섬유일 수 있다. 임플란트는 대상체에 대한 조성물의 지속 또는 정기 방출에 구성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제20080241223호; 미국 특허 제5,501,856호; 제4,863,457호; 및 제3,710,795호; 제EP488401호; 및 EP 제430539호(각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)를 참조한다. 본 명세서에 기재된 조성물은 예를 들어 확산성, 침식성 또는 대류성 시스템에 기초한 이식 가능한 장치, 예를 들어 삼투 펌프, 생분해성 임플란트, 전기확산 시스템, 전기삼투 시스템, 증기 압력 펌프, 전해 펌프, 발포성 펌프, 압전 펌프, 부식 기반 시스템, 또는 전기기계 시스템에 의해 대상체에게 전달될 수 있다.

[0221] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 국소 투여에 의해 대상체에게 치료학적으로 전달된다. 본 명세서에 사용되는 바대로, "국소 투여" 또는 "국소 전달"은 혈관계를 통한 의도되는 표적 조직 또는 부위로의 조성물 또는 물질의 수송에 의존하지 않는 전달을 의미한다. 예를 들어, 조성물은 조성물 또는 물질의 주사 또는 이식, 또는 조성물 또는 물질을 함유하는 장치의 주사 또는 이식에 의해 전달될 수 있다. 표적 조직 또는 부위 근처의 국소 투여 이후, 조성물 또는 물질, 또는 이의 하나 이상의 성분은 의도되는 표적 조직 또는 부위로 확산할 수 있다.

[0222] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 관절(예를 들어, 굴절 관절)에 국소로 투여될 수 있다. 예를 들어, 장애가 관절염인 실시형태에서, 치료학적으로 적절한 조성물은 관절(예를 들어, 관절 공간)에 또는 관절의 주변에 직접적으로 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물이 국소로 투여될 수 있는 굴절 관절의 예는 예를 들어 엉덩이, 무릎, 팔꿈치, 손목, 흉쇄, 측두하악관절, 손수근골, 발족근골, 발목, 및 관절염 병태를 겪는 임의의 다른 관절을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물은 점액낭, 예를 들어 견봉돌기(acromial), 거위다리(bicipitoradial), 전박효골(cubitoradial), 어깨세모근(deltoid), 슬개하(infrapatellar), 좌골(ischial), 및 의학의 분야에 공지된 임의의 다른 점액낭에 또한 투여될 수 있다.

[0223] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 눈에 국소로 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "눈"은 눈과 연관된 임의의 및 모든 해부학적 조직 및 구조를 의미한다. 눈은 외부 공막, 중간 맥락막 층 및 외부 망막의 3개의 명확한 층으로 이루어진 벽을 가진다. 수정체 뒤의 방은 유리액이라 칭하는 젤라틴질 유체로 충전된다. 눈의 뒤에 광을 검출하는 망막이 있다. 각막은 눈의 뒤로 상을 읊기는 광학적으로 투명한 조직이다. 각막은 눈으로 약물을 침투시키기 위한 하나의 경로를 포함한다. 눈과 연관된 다른 해부학적 조직 구조는 분비 체계, 분배 체계 및 배출 체계를 포함하는 눈물 방수 체계를 포함한다. 분비 체계는 눈물 증발로 인한 온도 변화 및 깜빡거림에 의해 자극되는 분비선 및 원심성 부교감 신경 공급을 가지고 신체 또는 감정 자극에 반응하여 눈물을 분비하는 반사 분비선을 포함한다. 분배 체계는 눈꺼풀 및 열린 눈의 눈꺼풀 테두리 주위의 누도를 포함하고, 이것은 깜빡거려서 눈 표면에 걸쳐 눈물을 분산시켜 건성 부위가 진행되는 것을 감소시킨다.

[0224] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 눈의 후방에 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 유리체내로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 공맥을 통해 투여된다.

[0225] 몇몇 실시형태에서, 예를 들어 장애, 예컨대 COPD 또는 천식의 치료 또는 예방을 위한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 폐에 의해 대상체에 대해 투여될 수 있다. 폐 약물 전달은 흡입에 의해 달성될 수 있고, 본 명세서에서 흡입에 의한 투여는 경구 및/또는 비강일 수 있다. 폐 전달을 위한 약제학적 장치의 예는 계량 흡입기, 건조 분말 흡입기(dry powder inhaler: DPI) 및 분무기를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물은 건조 분말 흡입기에 의해 대상체의 폐에 투여될 수 있다. 이 흡입기는 폐에 분산 가능하고 안정한 건조 분말 제제를 전달하는 추진제 비함유 장치이다. 건조 분말 흡입기는 의학의 분야에 널리 공지되어 있고, 제한 없이 터보할러(TurboHaler)(등록상표)(AstraZeneca(영국 런던)), AIR(등록상표) 흡입기(Alkermes(등록상표)(매사추세츠주 캠브리지)); 로타할러(Rotahaler)(등록상표)(GlaxoSmithKline(영국 런던)); 및 에클립스(Eclipse)(상표명)(Sanofi-Aventis(프랑스 파리))를 포함한다. 또한, 예를 들어 PCT 공보 WO 제04/026380호, WO 제04/024156호 및 WO 제01/78693호를 참조한다. DPI 장치는 폴리펩타이드, 예컨대 인슐린 및 성장 호르몬의 폐 투여에 사용된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 계량 용량 흡입기에 의해 폐내로 투여될 수 있다. 이 흡입기는 폐에 화합물의 별개의 용량을 전달하기 위해 추진제에 의존한다. 계량 용량 흡입기에 의해 투여된 화합물의 예는 예를 들어 아스토벤트(Astovent)(등록상표)(Boehringer-Ingelheim(코네티컷주 럿지필드)) 및 Flovent(등록상표)(GlaxoSmithKline)를 포함한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 제6,170,717호; 제5,447,150

호; 및 제6,095,141호를 참조한다.

[0226] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 분무기에 의해 대상체의 폐에 투여될 수 있다. 분무기는 액화 에어로졸 또는 미스트로서 화합물을 전달하기 위해 압축 공기를 사용한다. 분무기는 예를 들어 제트 분무기(예를 들어, 공기 또는 액체 제트 분무기) 또는 초음파 분무기일 수 있다. 추가적인 장치 및 폐내 투여 방법은 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제20050271660호 및 20090110679호(각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0227] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 자가 투여에 특히 적합할 수 있는 단위 제형으로 제시된다. 본 개시내용의 제제화된 생성물은 용기, 통상적으로, 예를 들어 바이알, 카트리지, 프리필드 주사기 또는 일회용 팬 내에 포함될 수 있다. 투약기, 예컨대 미국 특허 제6,302,855호에 기재된 투약기 장치는 예를 들어 본 개시내용의 주사 시스템과 또한 사용될 수 있다.

[0228] 본 개시내용의 주사 시스템은 미국 특허 제5,308,341호에 기재된 바와 같은 전달 팬을 사용할 수 있다. 당뇨병을 가지는 환자에게 인슐린의 자가 전달에 가장 흔히 사용되는 팬 장치는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 장치는 적어도 하나의 주사침(예를 들어, 길이가 약 5 내지 8mm인 31 게이지 침)을 포함할 수 있고, 치료학적 용액의 하나 이상의 치료학적 단위 용량으로 통상적으로 미리 충전되고, 가능한 적은 통증으로 대상체에게 용액을 신속히 전달하기에 유용하다.

[0229] 하나의 약제 전달 팬은 인슐린 또는 다른 약제의 바이알이 수용될 수 있는 바이알 홀더를 포함한다. 바이알 홀더는 근위 및 원위 말단을 가지는 세장형 일반적인 관 구조이다. 바이알 홀더의 근위 말단은 이중 말단 침 캐뉼라를 맞물리기 위한 탑재 수단을 포함한다. 근위 말단은 드라이버 및 용량 설정 장치를 포함하는 팬 몸체를 맞물리기 위한 마운틴 수단을 또한 포함한다. 선행 기술의 바이알 홀더에 의해 사용하기 위한 바이알을 함유하는 일회용 약제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물의 고농도 용액)는 이중 말단 침 캐뉼라의 일 말단이 관통할 수 있는 관통 가능한 엘라스토머 격막을 가지는 근위 말단을 포함한다. 이 바이알의 근위 말단은 바이알의 원통형 벽과의 유밀 끼워맞춤으로 미끄러짐 가능하게 배치된 스톱퍼(stopper)를 포함한다. 이 약제 전달 팬은 약제의 바이알을 바이알 홀더로 삽입함으로써 사용된다. 이후, 팬 몸체는 바이알 홀더의 근위 말단에 연결된다. 팬 몸체는 팬에 의해 전달하고자 하는 약제의 용량을 지정하기 위한 용량 설정 장치 및 선택된 용량에 상응하는 거리에 대해 근위로 바이알의 스톱퍼를 이동시키기 위한 드라이빙 장치를 포함한다. 팬의 사용자는 이중 말단 침 캐뉼라를 바이알 홀더의 근위 말단에 탑재하여서 침 캐뉼라의 근위 포인트는 바이알에서의 격막을 관통한다. 이후, 환자는 용량을 선택하고 근위로 스톱퍼를 이동시키기도록 팬을 조작하여 선택된 용량을 전달한다. 용량 선택 장치는 선택된 용량의 주사 시 0으로 복귀한다. 이후, 환자는 침 캐뉼라를 제거하고 버리고, 다음 필요한 약제 투여를 위한 편리한 위치로 약제 전달 팬을 유지시킨다. 바이알 내의 약제는 이러한 여러 약제 투여 후 고갈될 것이다. 이후, 환자는 팬 몸체로부터 바이알 홀더를 분리한다. 이후, 빈 바이알을 제거하고 버릴 수 있다. 새로운 바이알을 바이알 홀더로 삽입할 수 있고, 바이알 홀더 및 팬 몸체를 재조립하고 상기 설명된 바대로 사용할 수 있다. 따라서, 약제 전달 팬은 일반적으로 정확한 투약 및 사용의 용이성을 위한 드라이브 기전을 가진다.

[0230] 투약 기전, 예컨대 회전 가능한 손잡이는 사용자가 미리 포장된 약제의 바이알로부터 팬에 의해 주사되는 약제의 양을 정확하게 조절하게 한다. 약제의 용량을 주사하기 위해, 사용자는 피부 아래에 침을 삽입하고 이것이 눌러지는 거리까지 한번 손잡이를 누른다. 팬은 완전 기계적 장치일 수 있거나, 이것은 사용자에 의해 주사되는 약제의 투약량을 정확히 설정하고/하거나 표시하기 위해 전자 회로와 조합될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,192,891호를 참조한다.

[0231] 몇몇 실시형태에서, 팬 장치의 침은 일회용이고, 키트는 하나 이상의 일회용 대체 침을 포함한다. 현재 특징으로 하는 조성물의 임의의 하나의 전달에 적합한 팬 장치는 예를 들어 미국 특허 제6,277,099호; 제6,200,296호; 및 제6,146,361호(각각의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에 또한 기재되어 있다. 미세 침 기반 팬 장치는 예를 들어 미국 특허 제7,556,615호(이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용됨)에 기재되어 있다. 또한, 프리시즌 팬 인젝터(Precision Pen Injector: PPI) 장치, 몰리(Molly)(상표명)(스칸디나비안 헬스 리미티드(Scandinavian Health Ltd)사제)를 참조한다.

[0232] 본 개시내용은 약제, 예컨대 본 명세서에 기재된 조성물의 만성 및/또는 자가 투여에 적합한 제어 방출 또는 연장 방출 제제를 또한 제시한다. 다양한 제제는 일정한 기간에 걸쳐 볼루스로서 또는 연속 점적주사에 의해 약제에 의한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

- [0233] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 고농도 조성물은 지속 방출, 연장 방출, 시간적 방출 제어 방출 또는 연속 방출 투여를 위해 제제화된다. 몇몇 실시형태에서, 데포 제제는 이를 필요로 하는 대상체에게 조성물을 투여하기 위해 사용된다. 이 방법에서, 조성물은 수시간 또는 수일의 기간에 걸쳐 활성체의 점진적 방출을 제공하는 하나 이상의 담체와 제제화된다. 이러한 제제는 활성제를 방출하기 위해 신체에서 점진적으로 분산된 분해 기질에 대개 기초한다.
- [0234] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 대한 폐내 투여의 방식으로 투여된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물은 장애, 예컨대 천식 또는 COPD를 겪는 대상체(예를 들어, 인간)에 대한 분무기 또는 흡입기의 방식으로 전달될 수 있다.
- [0235] 용량이 대상체에서 장애를 치료하거나 예방할 수 있는 본 명세서에 기재된 조성물의 적합한 용량은 예를 들어 치료되는 대상체의 연령, 성별 및 체중 및 사용된 특정한 저해제 화합물을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 동일한 대상체를 치료하기 위해 필요한 상이한 조성물(예를 들어, 항-TNF α 조성물)의 용량과 비교하여 RA를 가지는 대상체를 치료하기 위해 하나의 조성물(예를 들어, 항-C5 조성물)의 상이한 용량이 필요할 수 있다. 대상체에게 투여되는 용량에 영향을 미치는 다른 인자는 예를 들어 장애의 유형 또는 중증도를 포함한다. 예를 들어, RA를 가지는 대상체는 PNH를 가지는 대상체보다 본 명세서에 기재된 항-C5 조성물의 상이한 투약량의 투여를 필요로 할 수 있다. 다른 인자는 예를 들어 대상체에 동시에 또는 이전에 영향을 미친 다른 의학 장애, 대상체의 일반 건강, 대상체의 유전적 소인, 식이, 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합, 및 대상체에게 투여되는 임의의 다른 추가적인 치료제를 포함할 수 있다. 임의의 특정한 대상체에 대한 특정한 투약량 및 치료 섭생이 치료 의학 실행자(예를 들어, 의사 또는 간호사)의 판단에 따라 또한 달라질 것이라는 것이 또한 이해되어야 한다.
- [0236] 본 명세서에 기재된 조성물은 고정 용량으로서, 또는 킬로그램당 밀리그램(mg/kg)의 용량으로 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 용량은 항체의 생성 또는 조성물 중의 하나 이상의 항원 결합 분자에 대한 다른 숙주 면역 반응을 감소시키거나 피하기 위해 또한 선택될 수 있다. 어떤 방식으로든 제한인 것으로 의도되지 않으면서, 항체, 예컨대 본 명세서에 기재된 조성물의 예시적인 투약량은 예를 들어 1-1000mg/kg, 1-100mg/kg, 0.5-50mg/kg, 0.1-100mg/kg, 0.5-25mg/kg, 1-20mg/kg, 및 1-10mg/kg을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물의 예시적인 투약량은 제한 없이 0.1mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 2.0mg/kg, 4mg/kg, 8mg/kg, 또는 20mg/kg을 포함한다.
- [0237] 약제학적 용액은 본 명세서에 기재된 조성물의 치료학적 유효량을 포함할 수 있다. 이러한 유효량은 투여된 조성물의 효과, 또는 하나 초과의 물질이 사용되는 경우 조성물 및 하나 이상의 추가적인 활성제의 조합 효과에 기초하여 당해 분야의 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물의 치료학적 유효량은 질환 상태, 개인의 연령, 성별 및 체중, 및 개인에서 원하는 반응, 예를 들어 적어도 하나의 병태 매개변수의 경감, 예를 들어 보체 매개 장애의 적어도 하나의 증상의 경감을 발생시키는 조성물(및 하나 이상의 추가적인 활성제)의 능력과 같은 인자에 따라 또한 변할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물의 치료학적 유효량은 당해 분야에 공지되거나 본 명세서에 기재된 특정한 장애 및/또는 특정한 장애의 임의의 하나의 증상을 저해(이의 중증도를 감소시키거나 이의 발생을 제거)하고/하거나 예방할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 치료학적으로 유리한 효과가 조성물의 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 것이다.
- [0238] 본 명세서에 기재된 임의의 조성물의 적합한 인간 용량은 예를 들어 I상 용량 상승 연구에서 추가로 평가될 수 있다. 예를 들어, 문헌[van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531; 및 Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500]을 참조한다.
- [0239] 용어 "치료학적 유효량" 또는 "치료학적 유효 용량", 또는 본 명세서에 사용된 유사한 용어는 원하는 생물학적 또는 의학적 반응(예를 들어, 보체 관련 장애의 하나 이상의 증상의 개선)을 발생시키는 물질(예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물)의 양을 의미하도록 의도된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 용액은 상기 조성물 중 적어도 하나의 치료학적 유효량을 함유한다. 몇몇 실시형태에서, 용액은 하나 이상의 조성물 및 1종 이상(예를 들어, 2종, 3종, 4종, 5종, 6종, 7종, 8종, 9종, 10종 또는 11종 이상)의 추가적인 치료제를 함유하여서, 전체로서의 조성물이 치료학적으로 효과적이다. 예를 들어, 용액은 본 명세서에 기재된 항-C5 조성물 및 면역억제제를 함유할 수 있고, 조성물 및 물질은 각각 조합될 때 대상체에서 보체 관련 장애(예를 들어, 보체 관련 염증성 장애, 예컨대 COPD, 천식, 폐혈증, 또는 RA)를 치료하거나 예방하기에 치료학적 유효 농도에 있다.
- [0240] 이러한 조성물의 독성 및 치료학적 효율은 세포 배양 또는 실험 동물(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 보

체 매개 장애의 동물 모델)에서 공지된 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, LD₅₀(집단의 50%에 치사인 용량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해 이 절차를 이용할 수 있다. 독성과 치료학적 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수이고, 이것은 LD₅₀/ED₅₀ 비율로 표시될 수 있다. 높은 치료지수를 나타내는 본 명세서에 기재된 조성물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 조성물이 사용될 수 있는 반면, 이환된 조직의 부위에 이러한 화합물을 표적화하는 전달 시스템을 설계하고, 정상 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하여서 부작용을 줄이도록 주의를 기울여야 한다.

[0241] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투약량의 범위를 제제화하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물의 투약량은 일반적으로 아주 적은 독성 또는 무독성으로 ED₅₀을 포함하는 조성물의 순환 농도의 범위 내에 있다. 투약량은 사용된 제형 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에 변할 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물의 경우, 치료학적 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 초기에 예상될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정되는 바대로 IC₅₀(즉, 증상의 최대 저해의 절반을 성취하는 항체의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 성취하기 위해 동물 모델에서 제제화될 수 있다. 인간에서의 유용한 용량을 더 정확하게 결정하기 위해 이러한 정보를 이용할 수 있다. 혈장에서의 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, 눈 또는 관절에 대한) 국소 투여가 바람직한 몇몇 실시형태에서, 국소 부위 내에 치료학적 유효 농도를 성취하기 위해 필요한 용량을 결정하기 위해 세포 배양 또는 동물 모델링을 이용할 수 있다.

[0242] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 보체 관련 장애에 대해 다른 치료제와 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 혈장교환, IVIG 치료, 또는 혈장 교환과 동시에, 이것 전에 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Appel et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:1392-1404]을 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 조성물은 신장 이식과 동시에, 이것 전에 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0243] "대상체"는, 본 명세서에 사용되는 바대로, 임의의 포유동물일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 오랑우탄, 고릴라, 마카크, 개코원숭이, 또는 침팬치), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니아 퍼그, 게르빌루스쥐, 햄스터, 랫트 또는 마우스일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 유아(예를 들어, 인간 유아)이다.

[0244] 본 명세서에 사용되는 바대로, "예방을 필요로 하는", "치료를 필요로 하는" 또는 "이를 필요로 하는" 대상체는 적절한 의학 실행자(예를 들어, 인간의 경우 의사, 간호사 또는 간호 실행자; 비인간 포유동물의 경우 수의사)의 판단에 의해 소정의 치료로부터 합당하게 이익을 받는 것이다.

[0245] 용어 "예방하는"은 기술 인정되고, 병태와 관련하여 사용될 때 당해 분야에서 널리 이해되고, 본 명세서에 기재된 조성물을 받지 않는 대상체에 대비해 대상체에서의 의학 병태의 증상의 빈도를 감소시키거나, 이의 발생을 지연시키는 조성물의 투여를 포함한다. 따라서, 보체 관련 장애, 예컨대 천식의 예방은 예를 들어 비치료 대조군 집단에 대비해 예방학적 치료를 받는 환자의 집단에서 기침, 천명 또는 흉통의 정도 또는 빈도를 감소시키는 것 및/또는 예를 들어 통계적으로 및/또는 임상적으로 유의적인 양만큼 비치료 대조군 집단에 대비해 치료 집단에서 기침 또는 천명의 발생을 지연시키는 것을 포함한다.

[0246] 상기 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 조성물(예를 들어, 항-C5 조성물)은 다양한 보체 관련 장애, 예컨대 류마티스 관절염(RA); 루프스 신염; 허혈-재판류 손상; 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS); 전형적 또는 감염성 용혈성 요독성 증후군(tHUS); 조밀침착병(DDD); 발작성 약간혈색소 뇨증(PNH); 다발성 경화증(MS); 황반변성(예를 들어, 연령 관련 황반변성(AMD)); 용혈, 간 효소 상승, 및 저혈소판(HELLP) 증후군; 패혈증; 피부근염; 당뇨병 망막병증; 혈전성 혈소판감소성 자반병(TTP); 자연 유산; 소수면역 혈관염; 수포성 표피박리증; 재발성 유산; 다발성 경화증(MS); 및 외상성 뇌 손상(이들로 제한되지는 않음)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316 및 Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152]을 참조한다. 몇몇 실시형태에서, 보체 매개 장애는 보체 매개 혈관 장애, 예컨대 심혈관 장애, 심근염, 뇌혈관 장애, 말초(예를 들어, 근골격) 혈관 장애, 신혈관 장애, 장간막/장 혈관 장애, 이식 기관에 대한 재혈관화 및/또는 재이식, 혈관염, 헤노호-쇤라인 자색반 신장염, 전신 홍반성 낭창 관련 혈관염, 류마티스 관절염을 수반한 혈관염, 면역 복합 혈관염, 장기 또는 조직 이식, 타카야슈병, 모세관 누출 증후군, 확장성 심근병증, 당뇨병 혈관증, 흉강-복강 대동맥류, 가와사키병(혈관염), 정맥 가스 색전증(VGE), 및 스텐트 배치 후 재협착, 회전죽상반절제술 및 경피적 관상동맥 확장술(PTCA)(이들로 제한되지는 않음)이다. (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제20070172483호를 참조한다.) 몇몇 실시형태에서, 보체 관련 장애는 중증

근무력증, 한랭응집소 질환(cold-agglutinin disease: CAD), 발작성 한냉 혈색소뇨증(paroxysmal cold hemoglobinuria: PCH), 피부근염, 피부경화증, 온난 자가면역 용혈성 빈혈, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 1형 당뇨병, 건선, 천포창, 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia: AIHA), 특발성 혈소판감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP), 굿파스쳐 증후군, 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome: APS), 데고스병 및 재해성 APS(catastrophic APS: CAPS)이다.

[0247] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은, 단독으로 또는 제2 소염제와 조합되어, 염증성 장애, 예컨대 RA(상기), 염증성 장 질환, 패혈증(상기, 패혈성 쇼크, 급성 폐 손상, 과종성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation: DIC) 또는 크론병(이들로 제한되지는 않음)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제2 소염제는 NSAID, 코티코스테로이드, 메토트렉세이트, 하이드록시클로로퀸, 항-TNF 물질, 예컨대 에타네르셉트 및 인플릭시맙, B 세포 고갈제, 예컨대 리툭시맙, 인터류킨-1 길항제, 또는 T 세포 동시자극 차단제, 예컨대 아바타셉트로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0248] 몇몇 실시형태에서, 보체 관련 장애는 보체 관련 신경학적 장애, 예컨대 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 뇌 손상, 알츠하이머병 및 만성 염증성 탈수초성 신경병증(이들로 제한되지는 않음)이다.

[0249] 보체 관련 장애는 또한 보체 관련 폐 장애, 예컨대 천식, 기관지염, 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease: COPD), 간질성 폐 질환, α -1 항-트립신 결핍증, 폐기종, 기관지확장증, 폐색성 모세기관지염, 폐포염, 유육종증, 폐 섬유증, 및 콜라겐 혈관 장애(이들로 제한되지는 않음)를 포함한다.

[0250] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 대상체에서 보체 관련 염증성 반응(예를 들어, 보체 관련 장애의 보체 관련 염증성 반응 양상)의 적어도 하나의 증상을 치료하거나 예방하거나 경감시키기 위해 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 조성물은 보체 관련 염증성 반응과 연관된 하나 이상의 증상, 예컨대 이식편 거부/이식편 대 숙주 질환(graft rejection/graft-versus-host disease: GVHD), 재관류 손상(예를 들어, 심폐 우회술 또는 조직 이식 후), 및 다른 형태의 외상성 손상, 예컨대 화상(예를 들어, 중증 화상), 둔상, 척수 손상 또는 동상 후 조직 손상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 경감시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문현[Park et al. (1999) *Anesth Analg* 99(1):42-48; Tofukuji et al. (1998) *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6):1060-1068; Schmid et al. (1997) *Shock* 8(2):119-124; 및 Bless et al. (1999) *Am J Physiol* 276(1):L57-L63]을 참조한다.

[0251] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 단일치료로서 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 상기 기재된 바와 같이, 조성물은 또 다른 치료제, 예를 들어 보체 관련 장애 또는 보체 관련 염증성 반응에 대한 또 다른 치료제와 조합 치료로서 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료는 패혈증을 가지거나 이것이 발생할 위험에 처해있는 대상체에게 치료학적 이익을 제공하는 하나 이상의 추가적인 물질(예를 들어, 항응고제, 항고혈압제 또는 소염 약물(예를 들어, 스테로이드))을 대상체(예를 들어, 인간 환자)에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 조합 치료는 보체 관련 폐 장애, 예컨대 COPD 또는 천식을 가지거나 이것이 별별할 위험에 처해있는 대상체에게 치료학적 이익을 제공하는 하나 이상의 추가적인 물질(예를 들어, 항-IgE 항체, 항-IL-4 항체, 항-IL-5 항체, 또는 항히스타민제)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물 및 하나 이상의 추가적인 활성제는 동시에 투여된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 시간상 처음에 투여되고, 하나 이상의 추가적인 활성제는 시간상 두 번째로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 추가적인 활성제는 시간상 처음에 투여되고, 조성물은 시간상 두 번째로 투여된다.

[0252] 본 명세서에 기재된 조성물은 이전에 투여되었거나 현재 투여되는 치료를 대체하거나 증강시킬 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조성물과의 반응 시, 하나 이상의 추가적인 활성제의 투여는 중지되거나 감소할 수 있고, 예를 들어 더 낮은 수준으로, 예를 들어 본 명세서에 기재된 항-C5 조성물의 투여 후 더 낮은 수준의 예 쿨리주맙이 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이전의 치료의 투여가 유지될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 조성물의 수준이 치료학적 효과를 제공하기에 충분한 수준에 도달할 때까지 이전의 치료제가 유지될 것이다. 2개의 치료제가 조합으로 투여될 수 있다.

[0253] 본 명세서에 정의된 바와 같은 장애(예를 들어, 패혈증, 중증 화상, RA, 루프스 신염, 굿파스쳐 증후군, 또는 천식)의 개선을 위해 대상체(예를 들어, 인간 환자)를 모니터링하는 것은 질환 매개변수의 변화, 예를 들어 소정의 장애의 하나 이상의 증상의 개선을 위해 대상체를 평가하는 것을 의미한다. 많은 상기 장애(예를 들어, 보체 관련 장애)의 증상은 의학의 분야에 널리 공지되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물의 투여 후 적어도 한(1) 시간, 예를 들어 적어도 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간 또는 48시간, 또는

적어도 1일, 2일, 4일, 10일, 13일, 20일 이상, 또는 적어도 1주, 2주, 4주, 10주, 13주, 20주 이상 평가를 수행한다. 대상체는 하기 기간 중 하나 이상에서 평가될 수 있다: 치료의 시작 전에; 치료 기간 동안; 또는 치료의 하나 이상의 요소가 투여된 후. 평가는 추가의 치료의 필요성을 평가하는 것, 예를 들어 투약량, 투여 빈도, 또는 치료 기간이 변경되어야하는지를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 이것은 선택된 치료학적 양상을 추가하거나 누락할 필요성, 예를 들어 본 명세서에 기재된 보체 관련 장애의 임의의 치료를 추가하는 것 또는 누락하는 것을 평가하는 것을 또한 포함할 수 있다.

[0254] 본 개시내용을 읽을 시 당해 분야의 당업자에게 많은 변형 및 등가물이 명확하므로, 하기 실시예는 단지 예시적이고 본 개시내용의 범위를 임의의 방식으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에 인용된 모든 특허, 특히 출원 및 공보는 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 인용된다.

[0255]

실시예

[0256] 실시예 1. 에콜리주맙의 반감기는 여러 청소율의 조합이다

[0257] 처방된 투약 섭생을 받는 PNH 및 ahUS 환자에서의 에콜리주맙의 평균 반감기는 대략 11-12일인 반면, IgG2/4 Fc를 가지는 인간화된 단일클론 항체에 대한 예상된 반감기는 IgG2 또는 IgG4 Fc를 함유하는 항체의 것과 유사한, 대략 21-28일인 것으로 예측되었다. Morell et al. (1970) *J Clin Invest* 49(4):673-680. 에콜리주맙의 전체 청소율에 대한 항원 매개 청소율의 잠재적 영향을 이해하기 위해, 인간 신생아 Fc 수용체(hFcRn) 마우스 모델을 이용하여 하기 실험을 수행하였다(마우스는 내인성 FcRn이 결여되지만 hFcRn에 대해 형질전환이다(B6.Cg-Fcgr^{t_{mlDcr}} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ; 재고 번호 014565, Jackson Laboratories(메인주 바 하버))). 형질전환 FcRn 모델은 예를 들어 문현[Petkova et al. (2006) *Int Immunology* 18(12):1759-1769; Oiao et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27):9337-9342; 및 Roopenian et al. (2010) *Methods Mol Biol* 602:93-104]에 기재되어 있다.

[0258] 200 μ l의 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 100 μ g의 에콜리주맙의 단일 용량을 각각 5마리의 hFcRn 형질전환 마우스에 정맥내(i.v.) 주사에 의해 투여하였다. 대략 100 μ l의 혈액 샘플을 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일에 각각의 마우스로부터 수집하였다. 혈청 중의 에콜리주맙의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 간단히 말하면, 검정 플레이트를 양 항-인간 Ig λ 경쇄 포획 항체에 의해 코팅하고 차단하였다. 이후, 플레이트의 웰을 에콜리주맙이, 혈청 중에 존재하는 경우, 포획 항체에 결합하게 하는 조건 하에 혈청 샘플과 접촉시켰다. 각각의 웰에 결합된 에콜리주맙의 상대 양을 탈착 가능하게 표지된 항-인간 IgG4 항체를 사용하여 검출하고, 에콜리주맙의 공지된 분량을 함유하는 나이브 마우스 혈청으로부터 생성된 표준 곡선에 대해 정량화하였다.

[0259] 하기 화학식을 이용하여 항체 혈청 반감기를 계산하였다:

$$\text{반감기} = T \times \frac{\ln 2}{\ln \frac{A_0}{A_t}}$$

[0260]

[0261] 식 중, T는 경과 시간이고, A₀는 항체의 원래 혈청 농도(본 연구에서 1일에서의 농도)이고, A_t는 경과 시간(T) 후 남은 항체의 양(본 연구에서 최소 검출 가능한 농도 또는 마지막 출혈 시점(35일))이다.

[0262] 실험의 결과가 도 1에 도시되어 있다. hFcRn 마우스 모델에서의 에콜리주맙의 반감기는 13.49±0.93일이다.

[0263] hFcRn 모델을 이용하여 에콜리주맙의 반감기에 대한 인간 C5의 효과를 결정하기 위해, 항체를 투약 전에 인간 C5(Complement Technology Inc., 카탈로그 A120호)의 4:1 몰 비로 예비 혼합하였다. 100 μ g의 용량의 에콜리주맙을 0일에 정맥내(i.v.) 투여하였다. 대략 100 μ l의 혈액을 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일에 후안와 출혈을 통해 혈청에 대한 1.5m ℓ 의 에펜도르프 관으로 수집하였다.

[0264] 도 1에 도시된 바대로, C5의 존재 하의 hFcRn 마우스 모델에서의 에콜리주맙의 반감기는 4.55±1.02일이다. 이 결과는, 긴 반감기가 FcRn 매개 재순환에 의해 주로 지배되는 내포작용 매개 항체 청소 기전 이외에, 에콜리주맙의 반감기가 인간 C5를 통해 항원 매개 청소에 의해 상당히 영향을 받을 수 있다는 것을 나타낸다.

[0265] 실시예 2. 에콜리주맙의 Fc 도메인에서의 아미노산 치환은 에콜리주맙의 반감기를 증가시키지만, 에콜리주맙 청소에 대한 C5의 효과를 극복하기에 충분하지 않다

[0266] IgG 항체의 Fc 영역에서의 소정의 아미노산 치환은 순환으로부터 항체의 제거율을 줄이는 것으로 나타났다. pH 6.0에서 FcRn에 대한 IgG 항체의 결합 친화도를 증가시키는 치환은 이러한 생물학적 효과의 예이다. 예를 들어, 문헌[Dall'Acqua et al. (2006) *J Immunol* 177:1129-1138 및 Ghetie et al. (1997) *Nat Biotech* 15: 637-640]을 참조한다. 잘레브스키(Zalevsky) 등[(2010) *Nat Biotech* 28:157-159]은 다수의 아미노산 치환, 예를 들어 혈청에서 IgG 항체의 반감기를 증가시킬 수 있는 M428L/N434S를 기술한다. 다른 반감기 연장 아미노산 치환은 예를 들어 T250Q/M428L 및 M252Y/S254T/T256E를 포함한다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 WO 제 2008/048545호 및 문헌[Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281:23514-23524]을 참조한다. 에콜리주맙의 Fc 불변 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환이 혈청에서의 에콜리주맙의 반감기를 연장할 수 있는지를 결정하기 위해, 하기 치환: EU 넘버링 지수에 기초하여 M252Y/S254T/T256E(이하 에콜리주맙의 이 변이체는 YTE 변이체라 칭함)를 에콜리주맙으로 도입하였다. 중쇄 불변 영역은 하기 아미노산 서열로 이루어진다:

[0267] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDLYITREPEVTCVVVDVSHDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 15). 에콜리주맙의 YTE 변이체의 전장 중쇄 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 16에 기재되어 있다.

[0268] YTE 변이체를 실시예 1에 기재된 hFcRn 마우스 모델에서 에콜리주맙과 함께 평가하였다. 즉, 100 μ g의 에콜리주맙(IgG2/4 Fc 영역), 200 μ l의 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 에콜리주맙의 Fc 또는 YTE 변이체를 함유하는 에콜리주맙의 변이체를 각각 8마리의 hFcRn 형질전환 마우스에 정맥내(i.v.) 주사에 의해 투여하였다. 혈청을 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일에 각각의 마우스로부터 수집하였다. 혈청에서의 각각의 항체의 농도를 ELISA 및 실시예 1에 기재된 바대로 계산된 반감기에 의해 측정하였다. 결과가 도 2 및 표 2에 기재되어 있다.

표 2

시험된 항체	반감기	표준 오차(SE)
에콜리주맙	13.49	0.93
에콜리주맙-IgG2	14.28	1
에콜리주맙-IgG2-YTE	29.07	4.7

[0269]

[0270] 도 2 및 표 2에 도시된 바대로, YTE 치환은 에콜리주맙의 평균 반감기를 14.28 ± 1 일로부터 29.07 ± 4.7 일로 2배 초과로 증가시켰다.

[0271]

에콜리주맙의 YTE 변이체의 반감기에 대한 인간 C5의 효과를 결정하기 위해, 마우스에 실시예 1에서 상기 기재된 바와 같은 인간 C5를 투여하였다. 100 μ g의 용량의 에콜리주맙, 에콜리주맙-IgG2 변이체 또는 에콜리주맙-IgG2 YTE 변이체를 0일에 정맥내 투여하였다. 도 3 및 표 3에 기재된 바대로, 에콜리주맙, 에콜리주맙-IgG2 변이체 및 에콜리주맙-IgG2 YTE 변이체의 반감기는 몰 초과의 인간 C5의 존재 하에 상당히 감소하였다. 따라서, 에콜리주맙의 FcRn 결합 도메인에서의 아미노산 치환은 에콜리주맙의 반감기에 대한 C5 매개 청소의 기여를 극복하기에 충분하지 않았다.

표 3

시험된 항체	T1/2	표준 오차(SE)
에콜리주맙	13.49	0.93
에콜리주맙-IgG2	14.28	1
에콜리주맙-IgG2(YTE)	29.07	4.7
에콜리주맙 + hC5	4.55	1.02
에콜리주맙-IgG2 + C5	2.11	0.31
에콜리주맙-IgG2(YTE) + hC5	4.28	1.09

[0272]

실시예 3. 반감기에 대한 에콜리주맙의 CDR에서의 아미노산 치환의 효과

[0274]

상기 기재된 바와 같이, 마우스에서의 에콜리주맙의 반감기는 이의 항원, 인간 C5(hC5)의 존재 하에 상당히 더 짧다. 어떤 특정한 또는 작용 기전에 구속되지 않으면서, 항원의 존재 하의 가속 청소는 부분적으로 음세포작용 후 초기 엔도솜 구획에서 항체:C5 복합체의 효과적인 해리를 허용하지 않는 C5에 대한 에콜리주맙의 매우 높은 친화도(pH 7.4에서 약 30pM 및 pH 6.0에서 약 600pM의 K_D)의 결과인 것으로 가정된다. 해리 없이, 항체:항원 복합체는 신생아 Fc 수용체(FcRn)를 통해 세포외 구획으로 재순환되거나 리소좀 분해에 표적화된다. 어느 경우에도, 항체는 이의 수명에서 2개의 C5 분자보다 더 결합할 수 없다.

[0275]

C5에 대한 에콜리주맙의 강한 친화도(K_D 약 30pM)는 혈액에서의 모든 C5의 거의 완전한 결합을 허용하여서, 매우 적은 C5가 활성화되어 C5a 및 TCC를 형성하도록 보장한다. C5에 대한 에콜리주맙의 친화도는 따라서 항체에 의해 치료된 환자에서의 항체의 생체내 효율과 직접적으로 연결된다. 본 발명자들은 생체내 에콜리주맙의 효율을 손상시키지 않으면서 C5에 대한 에콜리주맙의 친화도를 약하게 하도록 착수하였다. 본 개시내용이 이러한 접근법에 제한되지 않지만, 이것은 히스티딘을 에콜리주맙의 CDR에서 하나 이상의 위치로 도입함으로써 달성되었다. 히스티딘은 6.04의 pKa를 가진다. 이것은 pH 값이 7.4(혈액)로부터 6.0 미만(초기 엔도솜)으로 하강하면서, 히스티딘이 양성자를 획득한다는 것을 의미한다. 따라서, 엔도솜에서, 히스티딘은 더 양으로 하전된다. 본 발명자들은 에콜리주맙에서 C5에 대한 결합 부위에서 또는 그 근처에서 히스티딘을 도입하는 것을 가정하였고, 엔도솜에서의 전하 이동은 혈액 중에 중성 pH에서 C5에 대한 높은 친화도를 보전하면서 엔도솜에서의 결합을 파괴할 수 있다. 이러한 치환은, 엔도솜의 산성 환경에서 항체:C5 복합체로부터 항체의 해리를 수월하게 하여, C5가 리소좀에서 분해되는 반면 유리 항체가 재순환되게 함으로써, 반감기를 증가시키도록 가정된다.

[0276]

모 항체로서 에콜리주맙을 사용하여, 매 CDR 위치가 히스티딘에 의해 치환된 일련의 변이체 항체를 생성하였다. 에콜리주맙의 중쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열을 가진다: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFS NYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEY TENFKDRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFG SSPN WYFDVWGQGT LTVSS(서열 번호 7). (중쇄 가변 영역의 CDR 영역은 밑줄 표시된다.) 에콜리주맙의 경쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열을 가진다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIY GALN WYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFLTISISSLQPEDFATYYCQNV LNTPLTFGQGT KVEIK(서열 번호 8).

[0277]

이 히스티딘 스캐닝 노력의 결과는 에콜리주맙의 66개의 단일 히스티딘 치환 변이체이다. 이 항체 변이체에 대한 경쇄 및 중쇄 코딩 서열을 확인된 포유동물 세포 및 서열에서 발현에 적합한 별개의 "단일 유전자 작제물" 플라스미드로 클로닝하였다. 단일 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 단일 유전자 작제물의 동시형질감염에 의해 단일 아미노산 치환을 함유하는 항체를 HEK293F 세포에서 일시적으로 발현시켰다. 비변형 에콜리주맙 CDR 서열을 대

표하는 "야생형" 중쇄 및 경쇄의 동시형질감염을 또한 수행하였다(EHL000). 조직 배양 상청액을 항체 발현 수준에 정규화하고 사용하여 옥텟 레드 장치(Octet Red instrument)(ForteBio Inc.)에서 바이오층 간섭법(biolayer interferometry)을 이용하여, EHL000에 대비된, 인간 C5에 대한 항체 결합을 평가하였다. 간단히 말하면, 항체를 항-인간 IgG Fc 바이오센서(ForteBio, 카탈로그 18-5001호)에서 포획하였다. 이후, 로딩된 선단(tip)을 800초 동안 12.5nM의 네이티브 정제된 인간 C5를 함유하는 pH 7.4 완충 용액에 노출시켜 모 항체에 대한 결합의 동역학을 평가하였다. 선단을 800초 동안 pH 7.4 완충 용액 또는 pH 6.0 완충 용액으로 옮겨서 해리 동역학을 평가하였다. 모든 측정을 반복하여 판독의 일관성을 보장하였다.

[0278] 에콜리주맙에 대비된 일련의 3개 특성에 기초하여 에콜리주맙의 단일 히스티딘 치환 변이체를 선택하였다. 바람직한 히스티딘 변이체는 pH 7.4에서 에콜리주맙의 k_a 및 k_d 로부터 적은 정도로만 다르지만, pH 6.0 초과에서 에콜리주맙의 k_d 로부터 상당히 다르다. 상대 한계치 선택 기준은 하기와 같다:

[0279] (1) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에서의 33% 더 작은 피크 상 이동의 pH 7.4에서의 결합 동역학에 대한 최대 변경;

[0280] (2) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에서의 3배 이하의 피크 상 이동 감소의 pH 7.4에서의 해리 동역학에 대한 최대 변경; 및

[0281] (3) 에콜리주맙에 대해 관찰된 800초에서의 평균 피크 상 이동과 비교하여 800초에 걸쳐 적어도 3배의 피크 상 이동 감소의 pH 6.0에서의 해리 동역학에 대한 최대 변경.

[0282] 예를 들어, 상기 기준 (1)과 관련하여, 에콜리주맙과의 결합의 800초 후의 평균 피크 상 이동이 대략 0.75nm인 경우, 0.5nm 미만(예를 들어, 2회 이상 재현)의 상 이동을 가지는 시험 항체는 상기 기준을 충족시키지 않을 것이다. 반대로, 800초에서 0.5nm 초과의 피크 상 이동을 가지는 시험 항체는 제1 기준을 충족시킨다.

[0283] 이 한계치를 충족시키는 경쇄 가변 영역에서의 단일 치환은 (모두 서열 번호 8에 대해) G31H, L33H, V91H 및 T94H이다. 이 한계치를 충족시키는 중쇄 가변 영역에서의 단일 치환은 (모두 서열 번호 7에 대해) Y27H, I34H, L52H 및 S57H이다. 도 5a, 도 5b, 도 5c 및 도 5d를 참조한다.

[0284] 단일 치환이 한계치 기준을 충족시킨 위치에서 2개의 히스티딘 치환의 모든 가능한 조합을 함유하는 제2 일련의 항체를 생성하였다. 표 1을 참조한다. 이 결합 및 해리 동역학을 동일한 방법을 통해 분석하고, 원래 모 항체 및 단일 히스티딘 치환 둘 다와 비교하였다. 마찬가지로, 각각 3개 또는 4개의 히스티딘 치환을 함유하는 제3 및 제4 일련의 항체를 생성하고, 결합 및 해리 동역학을 분석하여 관련 2개 또는 3개의 히스티딘 치환 선행자와 비교하였다. 표 1을 참조한다. 각각의 단계에서, pH 7.4에서의 결합 동역학에 대한 최소 한계치, pH 7.4에서의 해리 동역학에 대한 최대 한계치 및 pH 6에서의 해리 동역학에 대한 최소 한계치에 동일한 기준을 이용하였다. 친화도는 표 4에 기재되어 있다.

표 4

클론 지칭	VL 서열	VH 서열	KD pH 7.4(nM)	KD pH 6.0(nM)	pH 6.0/pH 7.4에서의 KD의 비율
에콜리주맙	SIN:8	SIN:7	0.033	0.685	21
EHL000	SIN:8	SIN:7	0.018	0.419	24
EHL001	SIN:8에 대해 G31H.	SIN:7	0.330	1900	5758
EHL004	SIN:8에 대해 G31H.	S57H	0.135	374	2770
EHL046	SIN:8에 대해 G31H.	Y27H, L52H를 가지는 SIN:7	1.150	결정되지 않음	해당 없음
EHL049	SIN:8에 대해 G31H.	Y27H, S57H를 가지는 SIN:7	0.573	결정되지 않음	해당 없음
EHL055	SIN:8에 대해 G31H.	I34H, S57H를 가지는 SIN:7	0.623	2550	4093
EHG302	SIN:8	Y27H, L52H를 가지는 SIN:7	0.289	10.0	35
EHG303	SIN:8	Y27H, S57H를 가지는 SIN:7	0.146	1190	8151
EHG305	SIN:8	I34H, S57H를 가지는 SIN:7	0.160	10.8	68

* SIN은 서열 번호를 의미한다.

[0285]

[0286] 치환의 이 조합의 경우, C5에 대한 에콜리주맙의 친화도는 pH 6.0에서 1000배 초과로 감소하는 반면, 친화도는 pH 7.0에서 친화도의 20배 이하의 감소를 겪었다. 이것으로부터, pH 7.4에서의 이의 높은 친화도(0.146nM) 및 8,000 초과의 (pH 6.0에서의 K_D)/(pH 7.4에서의 K_D)의 비율로 인해 EHG303(표 4)이 추가로 분석에 선택되었다.

EHG303 항체의 중쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:

MGWSCIILFLVATATGVHSLEQVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGHIFS NYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTFENFKDRVTMTRDTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWQGQTLTVVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSLGK (서열 번호 24).

[0287]

- [0288] EHG303 항체의 경쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- MGWSCIILFLVATATGVHSADIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCGASENIYGALNWIQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGKVEIKRTRVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 25).
- [0289] 상기 서열에서, 밑줄 표시된 부분은 각각의 폴리펩타이드의 리더 서열에 상응하고, 이탤릭 표기된 부분은 클로닝에 의해 도입된 비상동성 아미노산이다.
- [0290] EHL049 항체를 또한 선택하였다. 이의 중쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- MGWSCIILFLVATATGVHSLHQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTFENFKDRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVVGQGTLTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKVERTKCCVECPAPAPVAGPSVFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVIHEALHNHYTQKSLSLSGK (서열 번호 26).
- [0291] EHL049 항체의 경쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- MGWSCIILFLVATATGVHSADIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCGASENIYHALNWIQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGKVEIKRTRVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 27).
- [0292] 상기 서열에서, 밑줄 표시된 부분은 각각의 폴리펩타이드의 리더 서열에 상응하고, 이탤릭 표기된 부분은 클로닝에 의해 도입된 비상동성 아미노산이다.
- [0293] 마지막으로, EHL000 중쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- MGWSCIILFLVATATGVHSLHQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTFENFKDRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVVGQGTLTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKVERTKCCVECPAPAPVAGPSVFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVIHEALHNHYTQKSLSLSGK (서열 번호 28).
- [0294] EHL000 항체의 경쇄 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- MGWSCIILFLVATATGVHSADIQMTQSPSSLASAVGDRVTITCGASENIYGALNWIQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGKVEIKRTRVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 29).
- [0295] 상기 서열에서, 밑줄 표시된 부분은 각각의 폴리펩타이드의 리더 서열에 상응하고, 이탤릭 표기된 부분은 클로닝에 의해 도입된 비상동성 아미노산이다.
- [0296] 상기 각각의 EHL 및 EHG 항체의 경쇄 폴리펩타이드 및 중쇄 폴리펩타이드를 단일 유전자 자체물로부터 발현시켰다. EHG303으로부터의 중쇄 및 경쇄 코딩 서열을, EHL049 항체에 대한 경쇄 및 중쇄 서열처럼 이중 유전자 발현 벡터로 조합하였다. 생성된 EHG303 클론을 BNJ421이라 지칭하고, 생성된 EHL049 클론을 BNJ423이라 지칭하였다. BNJ421의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기와 같다: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTFENFKDRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVVGQGTLTVSS(서열 번호 12). BNJ421에 대한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0303] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCGASENIY GALN WYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQNV LNTPLTFGQGT KVEIK(서열 번호 8).

[0304] BNJ423 항체의 중쇄 가변 영역은 하기 아미노산 서열을 포함한다: QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGHIFS NYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEY TENFKDRVTMTRDTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARYFFG SSPN WYFDVW GQGT LTVSS(서열 번호 12). BNJ423에 대한 경쇄 아미노산 서열은 하기와 같다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCGASENIYHALN WYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQNV LNTPLTFGQGT KVEIK(서열 번호 18).

[0305] 이 2개의 분자를 면역결핍(NOD/scid) 및 C5 결핍 마우스에서의 EHL000과 함께 평가하였다. 200 μ l의 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 100 μ g의 EHL000, BNJ421 또는 BNJ423의 단일 용량을 각각 8마리의 마우스에 정맥내(i.v.) 주사에 의해 투여하였다. 혈청을 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일에 각각의 마우스로부터 수집하였다. 혈청 중의 각각의 항체의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 비구획 분석(non-compartmental analysis: NCA) 및 직접적인 반응 Emax를 사용함으로써 파르사이트 휘닉스(Pharsight Phoenix)(등록상표) 원논린(WinNonlin)(등록상표) 버전 6.3 소프트웨어를 사용하여 항체 혈청 반감기를 계산하였다. 혈청 중에 남은 항체의 백분율을 하기와 같이 계산하였다:

$$\text{남은 항체}(\%) = \frac{C_t}{C_1} \times 100$$

[0306]

[0307] 식 중, C_t는 소정의 일자에서의 항체 농도이고; C₁은 1일에서의 항체 농도이다.

[0308]

결과가 도 6 및 표 5에 기재되어 있다.

표 5

시험된 Ab	혈청 T $\frac{1}{2}$ (일)	표준 오차(SE)
EHL000	22.18	1.01
BNJ421	25.29	0.81
BNJ423	24.69	2.16

[0309]

[0310] 동일한 마우스 모델을 이용하여 이 항체의 반감기에 대한 인간 C5의 효과를 결정하기 위해, 마우스에 -1일(항체가 마우스에 투여되기 전날)에 250 μ g의 로딩 용량, 이어서 50 μ g의 C5의 1일 2회 용량으로 인간 C5를 피하로 투여하여 혈청 C5 농도를 (실시예 1에 기재된 바대로) 대략 20 μ g/ml로 유지시켰다.

[0311]

도 7(및 하기 표 6)에 기재된 바대로, 인간 (hC5)의 존재 하에 (C5 대 에콜리주맙의 1:1 초과의 몰 비인 농도에서) 마우스 모델에서의 EHL000(에콜리주맙-IgG1)의 반감기가 2.49 \pm 0.34일인 반면, (히스티딘 치환을 함유하는) BNJ421 및 BNJ423 항체의 반감기는 각각 15.25 \pm 0.90일 및 22.71 \pm 0.71일에서 실질적으로 더 컸다. 이 결과는 에콜리주맙의 CDR에서의 히스티딘 치환 및 C5에 대한 생성된 pH 의존적 친화도가 에콜리주맙에 대비해 혈청으로부터의 에콜리주맙 변이체의 청소율을 상당히 감소시킨다는 것을 나타낸다.

표 6

시험된 Ab	혈청 T ½(일)	SE
EHL000	22.18	1.01
BNJ421	25.29	0.81
BNJ423	24.69	2.16
EHL000+hC5	2.49	0.34
BNJ421+hC5	15.25*	0.90
BNJ423+hC5	22.71	1.19

* EHL000+hC5에 대해 상당함.

[0312]

실시예 5. 히스티딘 치환된 쿨리주맙 변이체는 보체 저해 활성을 소실하지 않는다

[0314]

또한, 실시예 4에 기재된 실험으로부터의 인간 C5를 함유하는 각각의 샘플에서의 혈청 용혈성 활성을 또한 평가하였다. 닦 적혈구를 용해시키는 능력을 평가함으로써 마우스 혈청에서의 말단 보체 활성을 결정하였다. 사용된 마우스가 C5 결핍이므로, 용혈성 활성을 샘플에서 인간 C5의 활성을 직접적으로 반영한다. 간단히 말하면, 0.1% 젤라틴, 141mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 0.15mM CaCl₂ 및 1.8mM 나트륨 바르비탈을 함유하는 젤라틴 베로날 완충 식염수(Gelatin Veronal-Buffered Saline: GVBS)(콤프텍(Comptech) 카탈로그 B100호) 중의 50, 3 및 0μg/ml에서의 항체를 각각 저, 중 및 100% 용해 대조군으로서 사용하였다. GVBS 중에 젖과 시험 혈청을 1:10 희석함으로써 실험 샘플을 준비하였다. 대조군 웰에서 GVBS 중의 동일 용적의 20% 마우스 C5 결핍 혈청 및 20% 인간 혈청(바이오레클라메이션(Bioreclamation), 카탈로그 HMSRM-COMP+호) 및 시험 샘플 웰에서 GVBS 중의 동일 용적의 20% 마우스 C5 결핍 혈청 및 20% 인간 C5 고갈 혈청(컴플리먼트 테크놀로지스(Complement Technologies), 카탈로그 A320호)을 함유하는 96웰 플레이트(Corning(매사추세츠주 턱스베리), MA 카탈로그 3799호)의 상응하는 3중 웰에 샘플 분취량(50μl)을 분배하였다. EDTA(500mM에서의 2μl, 시그마(Sigma), 카탈로그 E-9884호)를 대조군 및 샘플들 다의 제3 웰에 3중 첨가하여 "용혈 무" 혈청 색상 대조군을 생성하였다. 닦 적혈구를 GVBS 중에 세척하고, 감작화시켜 4°C에서 15분 동안 항-닭 RBC 다중클론 항체(인터셀 테크놀로지스(Intercell Technologies); 0.1% v/v)와의 항온처리에 의해 보체 전통적인 경로를 활성화시키고, 다시 세척하고, 약 7.5x10⁷개의 세포/ml의 최종 농도에서 GVBS 중에 재현탁시켰다. 감작화 닦 적혈구(약 2.5x10⁶개의 세포)를 대조군 및 샘플을 함유하는 플레이트에 첨가하고, 플레이트 진탕기에서 간단히 혼합하고, 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 시약을 다시 혼합하고, 845x g에서 3분 동안 원심분리하고, 85μl의 상청액을 96웰 넓적 바닥 미량적정 플레이트(Nunc(뉴욕주 페니필드), 카탈로그 439454호)의 웰로 옮겼다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 흡광도를 415nm에서 측정하고, 하기 화학식을 이용하여 용혈의 백분율을 결정하였다:

$$\text{용혈(%)} = \frac{\text{샘플 OD} - \text{샘플 색상 조절 OD}}{100\% \text{ 용해 조절 OD} - 100\% \text{ 용해 색상 조절 OD}} \times 100$$

[0315]

식 중, OD는 광학 밀도이다.

[0316]

도 8에 도시된 바대로, 에쿨리주맙에 대비된 pH 7.4에서의 약간의 친화도 감소에도 불구하고, BNJ421 및 BNJ423 둘 다는 여전히 순환 시 존재하는 거의 모든 인간 C5에 결합하고 용혈을 저해할 수 있다. 이 결과는 생체내 항체의 효율을 손상시키고 항체에 증가 혈청 반감기를 부여하지 않으면서 C5에 대한 에쿨리주맙의 친화도가 약해

질 수 있다는 것을 나타낸다.

[0318] 실시예 6. C5에 대한 pH 의존적 결합 및 증대된 FcRn 매개 재순환은 에콜리주맙 변이체의 혈청 반감기에 가산적이다

[0319] 상기 기재된 바대로, 인간 C5의 존재 하에, 히스티딘 치환된 에콜리주맙 변이체의 반감기는 형질전환 마우스에서 상당히 연장되었다. 구성적 C5 합성 및 인간 FcRn의 존재 하의 항-C5 항체의 약동학(PK) 및 약물학(PD)에 대한 C5 및 FcRn에 대한 pH 의존적 결합의 가능한 가산 효과를 평가하기 위해, 인간 FcRn을 발현하는 형질전환 마우스에서 인간 불변 영역을 가지는 항-마우스 C5 항체를 사용하여 일련의 PK/PD 실험을 수행하였다. 이 젖과 항-C5 항체를 에콜리주맙에 대한 약리학적 대용물로서 작용하는 젖과 항체인 BB5.1의 가변 영역으로부터 조작하였다(이것이 마우스 C5에 결합하고 활성 대사 단편 C5a 및 C5b로의 이의 절단을 방해하므로)[De Vries et al. (2003) *Transplantation* 3:375-382]. BB5.1 젖과 가변 영역 및 인간 Ig κ 및 인간 IgG2/G4 불변 영역의 친화도 최적화된 변이체에 의해 고친화도 항-마우스 C5 항체(BHL011이라 칭함)를 조작하였다. 3개의 히스티딘 치환을 젖과 가변 영역(이 변이체를 BHL006이라 칭함)으로 혼입함으로써 BHL011의 pH 의존적 변이체를 조작하였다. hFcRn에 대한 친화도를 증가시키기 위해 2개의 아미노산 치환을 인간 불변 영역 중쇄(M428L, N434S)로 혼입함으로써 제3 항체를 조작하였다(이 변이체를 BHL009라 칭함).

[0320] BHL006의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ
AEDLAVYYCAQHLSHRTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 30).

[0322] BHL006 항체의 중쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLQQPGAEVLRPGETSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPQGLEWIGVIDPHDSYTNYNQFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISSAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열 번호 31).

[0324] BHL009의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ
AEDLAVYYCAQHLSHRTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 32).

[0326] BHL009의 중쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLQQPGAEVLRPGETSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPQGLEWIGVIDPHDSYTNYNQFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISSAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVLHEALHSHYTQKSLSLSLGK (서열 번호 33).

[0328]

BHL011의 경쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

NIMMITQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDFTGSGSGTDFTLTISSVQ
AEDLAVYYCAQYLSSRTFGGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 34).

[0329]

BHL011의 중쇄 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLQQPGAEVVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQFKKGKATLTVDTSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSQLPDEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열 번호 35).

[0331]

[0332]

항-Fc 인간 포획 방법을 이용하여 비아코어 3000 장치에서 SPR을 통해 정제된 마우스에 대한 BHL011, BHL006 및 BHL009 결합의 동역학을 결정하였다. 간단히 말하면, 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 0.1mg/ml로 희석된 항-인간 Fc(KPL, 카탈로그 01-10-20호)를 아민 커플링에 의해 8분 동안 CM5 칩의 2개의 유세포에 부동화하였다. 항체를 실행 완충제(HBS-EP; 0.01M HEPES(pH 7.4), 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v 계면활성제 P20; 지이 라이프 사이언시스(GE Life Sciences), 카탈로그 BR1001-88호) 중에 0.25μg/ml로 희석하였다. 이후, 희석된 항체를 하나의 유세포에 주입한 후, 세포 둘 다에 6nM 마우스 C5를 주입하였다. 제2 유세포를 기준 표면으로서 사용하였다. pH 7.4 및 pH 6.0에서 결합을 평가하였다. 20mM HC1, 0.01% P20에 의해 매회 표면을 재생하였다. '이 중 리퍼런싱(referencing)'에 의해 비아이밸류에이션(BIAevaluation) 4.1 소프트웨어를 이용하여 1:1 랭귀어(Langmuir) 모델에 의해 데이터를 처리하였다. pH 6.0에서 마우스 C5에 복합체화된 BHL011, BHL006 및 BHL009의 해리를 6nM 마우스 C5(pH 7.4)의 주사, 이어서 HBS-EP 완충제(pH 6.0)의 주사에 의해 유사하게 평가하였다. 이 실험의 결과가 표 7에 기재되어 있다.

표 7

	결합 속도: K _a (1/M*s)		해리 속도: K _d (1/s)		해리 상수: K _d (nM)		Chi ²		300초에서의 해리(%)	
	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0
Ab	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0
BHL011	6.44 × 10 ⁻⁵	2.39 × 10 ⁻³	6.13 × 10 ⁻⁵	1.28 × 10 ⁻⁴	0.0952	53.6	0.0194	0.048	1	7
BHL006	2.93 × 10 ⁻⁵	NB	1.02 × 10 ⁻³	NB	3.49	NB	0.021	NB	28	100
BHL009	2.61 × 10 ⁻⁵	NB	1.09 × 10 ⁻³	NB	4.19	NB	0.0234	NB	28	100

* "NB" 특이적 결합이 관찰되지 않음; "Ab"는 항체 지칭을 의미한다.

[0333]

[0334]

구성적 C5 합성의 존재 하의 항-C5 항체의 약동학(PK)에 대한 C5에 대한 pH 의존적 결합의 효과 및 반감기의 가산 증가를 부여하는 증대된 FcRn 재순환에 대한 가능성을 결정하기 위해, 실시에 1에 기재된 형질전환 FcRn 마우스 모델을 이용하여 BHL011, BHL006 및 BHL009의 전체 혈청 농도를 분석하였다. 1일 농도의 백분율로서의 전체 항체 혈청 농도 및 혈청 농도가 도 9-11에 도시되어 있다. 수컷 마우스는 실선으로 표시되어 있고, 암컷은 점선으로 표시되어 있다. 1일에서의 전체 항체 혈청 농도는 몸무게 및 분포 용적의 차이에 비례하여 수컷보다는 암컷에 더 높았다. 이 성별 변화는, 가능하게는 C5 매개 청소로부터 생긴 용량 의존적 비선택성으로 인해, BHL011 약동학에 대해 동물간 변산도에 기여하였다(도 9a 및 도 9b). 일반적으로, 동물간 변산도는 가속 청소를 나타낸 BHL006 용량 코호트(2939)에서의 1마리의 암컷을 제외하고 BHL006(도 10a 및 10b) 및 BHL009(도 11a 및 도 11b)에 대해 낮았다. 동물 2939에서의 가속 청소율에 대한 이유는 공지되어 있지 않다.

[0335]

C5 및 hFcRn의 구성적 합성의 존재 하에, 고친화도 IgG2/4 항-C5 항체(BHL011)는 6일의 평균 말단 반감기를 가

지고, 21일에 약 98%로 순환으로부터 청소되었다(도 12 및 도 13; 표 8). IgG2/4 Fc 영역을 가지는 pH 의존적 항-C5 항체(BHL006)에 대한 평균 청소율은 16 내지 19일의 평균 베타-상 반감기로 약화되었다. 추가적인 약 2배의 반감기 증가가 hFcRn에 대한 개선된 친화도(BHL009 반감기 약 36일)로 IgG2/4 Fc 영역을 가지는 pH 의존적 항-C5 항체에 대해 관찰되었다. 이 매개변수는 hFcRn 마우스에서 항원의 부재 하에 M428L, N434S 치환을 가지고 있지 않는 IgG2/4 항체에 대해 관찰된 것과 일치하였다. 이 결과는 pH 의존적 C5 결합 및 FcRn에 대한 증가한 친화도가 항-C5 항체의 PK 노출을 연장시키는 가산 효과를 부여한다는 것을 나타낸다.

표 8

항체	동물 지칭	성별	체중(g)	C _{MAX} (μ g/ml)	반감기(일)
BHL011	2929	M	37.8	519.8	7.2
	2930	M	33.5	512.2	7.1
	2963	F	23.2	805.0	6.2
	2964	F	20.2	814.6	5.0
	2965	F	23.4	823.5	4.4
					평균 = 6.0
BHL006	2905	M	37.5	361.6	15.4
	2906	M	36.1	378.8	19.1
	2939	F	21.8	836.0	4.6
	2940	F	23.9	635.3	21.6
	2941	F	20.0	906.9	20.1
					평균 = 16.2
BHL009	2913	M	31.2	402.6	45.8
	2914	M	31.0	606.7	45.0
	2947	F	21.3	724.9	33.2
	2948	F	22.3	590.1	22.8
	2949	F	20.9	652.8	33.1
					평균 = 36.0

[0336]

[0337] 인간 FcRn 형질전환 마우스에서의 항-마우스 C5 항체의 약물학

보체 전통적인 경로 매개 닦 적혈구(닭 적혈구; cRBC) 용혈 검정에서 혈청 샘플에서의 항-마우스 C5 항체의 약리학적 활성을 생체외 평가하였다. 용혈성 활성은 투약 전 샘플에서의 활성의 백분율로서 계산되고 도 14-16에 도시되어 있다. 수컷은 실선으로 표시되고, 암컷은 점선으로 표시된다. 생체외 용혈성 활성의 길항작용은 샘플에서의 전체 항체의 농도에 비례한다. BHL011 PK(도 9)에 대한 봄무게 의존적 동물간 생존능력에 상응하는 BHL011(도 14)에 대해 용혈성 활성의 길항작용의 기간에서의 성별 차이가 뚜렷하였다. 일반적으로, 가속 항체 청소(도 10)를 나타낸 BHL006 용량 코호트(2939)에서의 암컷을 제외하고 BHL006(도 15) 및 BHL 009(도 16)에 대해 동물간 생존능력이 낮았다.

[0339]

전체 항체 혈청 농도와 생체외 용혈성 활성의 길항작용 사이의 상호작용의 차이는 C5에 대한 항체의 친화도에 비례한다. 고친화도 항체(BHL011)는 약 200 μ g/ml로 용혈성 활성을 거의 완전히 억제하는 반면(도 17), 더 약한 친화도의 pH 의존적 항-C5 항체는 생체외 완전 길항작용을 달성하기 위해 2배 내지 3배 더 높은 농도를 필요로

한다(도 18 및 도 19).

[0340] pH 의존적 항-C5 항체에서의 이의 효력 소실에도 불구하고, 각각의 코호트로부터의 동물에 걸친 cRBC 용혈에 대한 평균 활성 수준은 이들이 연장된 투약 간격을 지지할 수 있다는 것을 제안한다. 14일에, 고친화도 항-C5(BHL011) 치료 동물은 40% 초과의 평균 용혈성 활성 수준을 가지는 반면, pH 의존적 항-C5(BHL006 및 BHL009) 치료 동물은 각각 21일 및 28일에 걸쳐 40% 미만의 평균 용혈성 활성 수준을 유지시켰다(도 20).

[0341] 고친화도 항-마우스 C5 항체(BHL011)에 대비해 마우스 C5(BHL006 및 BHL009)에 대한 유의적인 반감기 연장 및 pH 의존적 결합에 의한 항체의 길항작용의 상응하는 기간은 실시예 4 및 실시예 7에 기재된 연구와 일치하고, 여기서 pH 의존적 항-인간 C5 항체(BNJ421, BNJ423 또는 BNJ441)는 인간 C5가 동시투여된 마우스에서 고친화도 대응물(EHL000 또는 에콜리주맙)에 대비해 유사한 증가 반감기를 나타냈다. 이 발견은 CDR에서의 선택 히스티딘 치환을 통한 엔지니어링 pH 의존적 항원 결합이 C5를 통한 항원 매개 청소를 상당히 약화시킬 수 있어서, 유리 항체가 순환으로 다시 재순환되게 한다는 생각을 추가로 입증한다. 게다가, BHL009에서의 pH 의존적 항원 결합 및 FcRn에 대한 증대된 친화도의 조합은 PK 특성에 대한 효과에서 가산적이고, pH 의존적 결합 단독(BHL006)에 비해 반감기를 배가시킨다. 이 관찰은 C5에 대한 pH 의존적 결합이 FcRn에 대한 개선된 친화도와 조합되어 에콜리주맙에 대해 관찰된 PK 매개변수 및 치료학적 PD의 기간의 상당한 연장을 제공할 수 있어서, 매달 이상의 투약이 가능하게 한다는 가설과 일치한다.

[0342] 실시예 7. C5에 대한 pH 의존적 결합 및 증대된 FcRn 매개 재순환을 가지는 변이체 에콜리주맙의 생성

[0343] 모 분자로서 에콜리주맙을 사용하여 항체를 생성하였다. 에콜리주맙에 대비해, 변이체 항체(BNJ441이라 칭함)는 중쇄에서 Tyr-27-His, Ser-57-His, Met-429-Leu 및 Asn-435-Ser의 4개 아미노산 치환을 함유한다(BNJ441의 429 번 및 435번 위치가 EU 넘버링 시스템 하에 428번 및 434번 위치에 상응한다는 것에 주목한다). 중쇄 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 14에 기재되어 있다. 경쇄 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열은 서열 번호 11에 기재되어 있다. (1) 표적 매개 항체 청소를 통한 항체 청소의 감소 및 (2) FcRn 매개 항체 재순환의 효율의 증가의 2개의 명확한 기전을 통해 순환 반감기를 증가시킴으로써 BNJ441(비고, 에콜리주맙)에 의해 연장된 투약 간격이 가능하게 하도록 이 돌연변이를 조작하였다.

[0344] 중쇄 가변 영역의 제1 및 제2 상보성 결정 영역(CDR)에서의 2개의 아미노산 치환인, Tyr-27-His 및 Ser-57-His는 에콜리주맙과 비교하여 pH 7.4에서 약 17배만큼 및 pH 6.0에서 약 36배만큼 C5에 대한 BNJ441의 친화도 해리 상수(K_D)를 약화시켰다. 제3 중쇄 불변 영역 도메인(CH3)에서의 2개의 돌연변이인, Met-429-Leu 및 Asn-435-Ser은 에콜리주맙과 비교하여 pH 6.0에서 약 10배만큼 FcRn에 대한 BNJ441의 친화도를 증가시켰다.

결합 동역학(C5에 대한 항체)

[0345] pH 8.0, 7.4, 7.0, 6.5 및 6.0에서 항-Fc 포획 방법을 이용하여 비아코어 3000 장치에서 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통해 C5에 대한 BNJ441 또는 에콜리주맙 결합의 동역학을 결정하였다. 염소 항-인간 IgG(Fc) 다중클론 항체(KPL 01-10-20호)를 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 0.1mg/ml로 희석하고, 아민 커플링에 의해 8분 동안 CM5 침의 2개의 유세포에 부동화하였다. 시험 항체(BNJ441 또는 에콜리주맙)를 실행 완충제(HBS-EP; 0.01M HEPES(pH 7.4), 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v 계면활성제 P20; 지이 라이프 사이언시스, 카탈로그 BR1001-88호) 중에 0.20 μ g/ml로 희석하였다. 이후, 희석된 항체를 하나의 유세포(pH 7.4 실험에 대해 20 μ l 및 pH 6.0 실험에 대해 40 μ l)에 주입한 후, 세포 둘 다에 다양한 농도의 C5를 주입하였다. 실행 완충제를 pH 7.0, 6.5 및 6.0 동역학에 대해 3M HC1에 의해 및 pH 8.0 동역학에 대해 0.5M NaOH에 의해 적정하였다. 표면을 20mM HC1, 0.01% P20에 의해 각각의 사이클마다 재생하였다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1 소프트웨어(비아코어 AB(스웨덴 옵살라))를 이용하여 1:1 랭귀어 모델에 의해 데이터를 처리하였다.

[0347] 하기 변형을 가지는 상기 기재된 항-Fc 포획 방법을 이용하여 비아코어 3000 장치에서 SPR을 통해 pH 8.0, 7.4, 7.0, 6.5 및 6.0에서의 BNJ441 또는 에콜리주맙으로부터의 C5의 해리 속도를 결정하였다. 희석된 시험 항체를 하나의 유세포에 주입한 후, 세포 둘 다에 6nM C5를 주입하였다. C5 주입 직후, 다양한 pH에서의 250 μ l의 실행 완충제를 주입하였다. 실행 완충제를 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1 소프트웨어(비아코어 AB(스웨덴 옵살라))를 이용하여 데이터를 처리하였다. t = 0 및 t = 300초에서의 해리의 차이를 취하여 BNJ441 및 에콜리주맙으로부터의 C5의 해리(%)를 계산하였다.

결합 동역학(FcRn에 대한 항체)

[0349] pH 7.4, 및 6.0에서 F(ab')₂ 포획 방법을 이용하여 비아코어 3000 장치의 SPR을 통해 인간 FcRn에 대한 BNJ441

또는 에콜리주맙 결합의 동역학을 결정하였다. 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 0.04mg/ml로 희석된 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG F(ab')₂(락랜드 이뮤노케미컬즈(Rockland Immunochemicals), 카탈로그 709-1118호)를 아민 커플링에 의해 7분 동안 CM5 칩의 2개의 유세포에 부동화하였다. 시험 항체(BNJ441 또는 에콜리주맙)를 실행 완충제((HBS-EP; 0.01M HEPES(pH 7.4), 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v 계면활성제 P20; 지이 라이프 사이언시스, 카탈로그 BR1001-88호) 중에 2 μ g/ml로 희석하였다. 이후, 희석된 항체를 하나의 유세포에 주입한 후, 세포 둘 다에 FcRn을 주입하였다. 실행 완충제를 pH 6.0 동역학을 위해 3M HC1에 의해 적정하였다. 표면을 10mM 글리신 HC1(pH 1.5)에 의해 각각의 사이클마다 재생하였다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1 소프트웨어(비아코어 AB(스웨덴 옵살라))를 이용하여 1:1 랭귀어 모델에 의해 데이터를 처리하였다.

[0350] 결합 연구의 결과

항체:C5 결합의 동역학은 pH 의존적인 것으로 밝혀졌고, 결합 속도 및 해리 속도 둘 다에 대한 효과는 표 9에 기재되어 있다.

표 9

BNJ441				
pH	결합 속도: K_a (1/M*s)	해리 속도: K_d (1/s)	해리 상수: K_d (M)	Chi ²
8.0	6.25 * 10 ⁵	1.33 * 10 ⁻⁴	2.13 * 10 ⁻¹⁰	0.055
7.4	4.62 * 10 ⁵	2.27 * 10 ⁻⁴	4.91 * 10 ⁻¹⁰	0.045
7.0	4.28 * 10 ⁵	3.90 * 10 ⁻⁴	9.11 * 10 ⁻¹⁰	0.028
6.5	4.08 * 10 ⁵	8.94 * 10 ⁻⁴	2.19 * 10 ⁻⁹	0.172
6.0	1.63 * 10 ⁵	3.54 * 10 ⁻³	2.18 * 10 ⁻⁸	0.373
에콜리주맙				
pH	결합 속도: K_a (1/M*s)	해리 속도: K_d (1/s)	해리 상수: K_d (M)	Chi ²
8.0	1.39 * 10 ⁶	2.04 * 10 ⁻⁵	1.47 * 10 ⁻¹¹	0.104
7.4	1.10 * 10 ⁶	3.23 * 10 ⁻⁵	2.93 * 10 ⁻¹¹	0.094
7.0	8.86 * 10 ⁵	6.34 * 10 ⁻⁵	7.15 * 10 ⁻¹¹	0.032
6.5	8.41 * 10 ⁵	1.73 * 10 ⁻⁴	2.06 * 10 ⁻¹⁰	0.037
6.0	7.05 * 10 ⁵	4.28 * 10 ⁻⁴	6.06 * 10 ⁻¹⁰	0.092

[0352]

초기 엔도솜의 음세포작용 및 산성화 후 항체:C5 복합체의 상대 해리 속도를 모델링하기 위해, 항체:C5 복합체가 pH 7.4 완충제 중에 형성되게 하고, 이후 완충제 pH 조건을 해리 동안 전환하였다. 300초 후 항체 복합체 해리(공명 단위 [RU]의 감소로 예측됨)의 백분율을 각각 pH의 조건에 대해 계산하였다(표 10). pH 6.0에서의 BNJ441만이 5분 후 50% 초과로 항체:C5 복합체를 해리시켰다.

표 10

BNJ441			
pH	RU 0 초	RU 300 초	해리(%)
8.0	55.4	53.5	3.4
7.4	55.7	52.0	6.6
7.0	55.2	49.1	11.0
6.5	55.2	39.4	28.6
6.0	55.8	22.3	60.0
에콜리주맙			
pH	RU 0 초	RU 300 초	해리(%)
8.0	70.2	69.7	0.8
7.4	70.0	69.5	0.7
7.0	71.3	69.9	2.0
6.5	71.2	67.8	4.7
6.0	71.6	62.9	12.2

[0354]

[0355] 도 21a 및 도 21b는 pH의 함수로서의 BNJ441:C5 복합체 또는 에콜리주맙:C5 복합체의 해리의 반로그 및 선형 도면을 도시한다.

[0356]

중쇄 가변 영역의 제1 및 제2 상보성 결정 영역(CDR)에서의 2개의 아미노산 치환인, Tyr-27-His 및 Ser-57-His는 에콜리주맙과 비교하여 pH 7.4에서 약 17배만큼 및 pH 6.0에서 약 36배만큼 C5에 대한 BNJ441의 친화도 해리 상수(K_d)를 약화시켰다. C5에 대한 BNJ441의 친화도에서의 pH 의존성이 27번 및/또는 57번 위치에서 도입된 히스티딘의 양성자화 상태의 변화의 결과인지, 또는 단순히 C5에 대한 친화도의 전체 감소인지 불명확하다. 그러나, 다른 항-C5 항체에서, 추가적인 히스티딘 치환과 조합된 이 돌연변이가 6.5 미만의 pH 수준에서 훨씬 더 현저하게 친화도를 소실시킨다는 것이 관찰되었다. 제3 중쇄 불변 영역 도메인(CH3)에서의 2개의 돌연변이인, Met-429-Leu 및 Asn-435-Ser이 에콜리주맙과 비교하여 pH 6.0에서 약 10배만큼 FcRn에 대한 BNJ441의 친화도를 강화시켰다.

[0357]

BNJ441 항체의 PK 특성

[0358]

BNJ441 항체 및 에콜리주맙을 면역결핍(NOD/scid) 및 C5 결핍인 마우스에서 평가하였다. $200\mu\text{l}$ 의 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 $100\mu\text{g}$ 의 BNJ441 또는 에콜리주맙의 단일 용량을 각각 8마리의 마우스에 정맥내(i.v.) 주사에 의해 투여하였다. 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일에 각각의 마우스로부터 혈청을 수집하였다. 혈청 중의 각각의 항체의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다.

[0359]

도 22에 도시된 바대로, 인간 C5의 부재 하에, 혈청 항체 농도는 35일 기간에 걸쳐 BNJ441 및 에콜리주맙이 투약된 마우스에서 유사하게 감소하였다. 그러나, 인간 C5의 존재 하에, 에콜리주맙 혈청 농도는 14일 후 검출 불가 수준으로 신속히 감소하는 반면, BNJ441의 혈청 농도는 연구의 기간에 걸쳐 더 느리게 일치하는 속도로 봉괴하였다(도 23).

[0360]

인간 C5의 존재 및 부재 하의 2개의 항체의 PK 프로필을 비교하면, 에콜리주맙의 청소는 인간 C5의 부재 하의 것과 비교하여 인간 C5의 존재 하에 가속되는 반면, 인간 C5의 존재 하의 BNJ441의 PK 프로필은 28일에 걸쳐 인간 C5의 부재 하의 BNJ441의 것과 유사하고, 청소는 28일과 35일 사이에 오직 가속되었다(도 24). BNJ441의 반감기 및 에콜리주맙의 반감기는 인간 C5의 부재 하에 필적하였다(BNJ441에 대해 25.37 ± 1.02 일 및 에콜리주맙에

대해 27.65 ± 2.28 일). 그러나, 인간 C5의 존재 하에, BNJ441은 에콜리주맙(BNJ441에 대한 13.40 ± 2.18 일 대 에콜리주맙에 대한 3.93 ± 0.54 일)과 비교하여 3배 초과의 반감기 증가를 나타냈다. BNJ441의 청소율이 28일에 걸쳐 인간 C5의 존재 또는 부재 하에 상당히 다르지 않다는 것에 주목해야 한다. 표 11을 참조한다.

표 11

치료군	동물 번호	반감기(일)
BNJ441	2009	26.99
	2011	25.55
	2212	24.5
	2213	20.34
	2214	27.18
	2215	24.35
	2216	28.65
		평균 = 25.37
에콜리주맙		SE = 1.02
	2201	30.65
	2202	16.85
	2203	27.02
	2204	28.54
	2205	19.7
	2206	35.47
	2207	33.77
	2208	29.18
		평균 = 27.65
BNJ441+ 인간 C5		SE = 2.28
	2225	24.31
	2226	13.45
	2227	N/A
	2228	13.48
	2229	16.09
	2230	8.55
	2231	11.25
	2232	6.66
		평균 = 13.40
		SE = 2.18

[0361]

치료군	동물 번호	반감기(일)
에콜리주맙 + 인간 C5	2217	3.35
	2218	2.72
	2219	7.45
	2220	3.26
	2221	2.74
	2222	3.93
	2223	4.5
	2224	3.51
		평균 = 3.93
		SE = 0.54

[0362]

[0363] 혈청 용혈성 활성

항체의 용혈성 활성에 대한 히스티딘 치환의 효과를 결정하기 위해, 실시예 6에 기재된 바대로 생체외 용혈성 검정을 수행하였다. BNJ441 또는 에콜리주맙의 존재 하에, 말단 보체 활성은 각각의 항체의 각각의 PK 프로필과 일치하고(도 25), 즉 혈청 용혈성 활성의 저해의 수준은 혈청에 남은 각각의 항체의 농도에 비례한다. 항체 둘 다는 3일에 걸쳐 용혈의 거의 전체 저해를 부여하였다. 그러나, 에콜리주맙이 14일에 길항작용이 없다는 것을 나타내는 반면, BNJ441은 14일에 약 83% 저해 및 28일에 걸쳐 부분 보체 저해를 보유하였다.

[0365] 결론

이 연구로부터의 발견은, 인간 C5의 존재 하에, BNJ441이 에콜리주맙과 비교하여 3배 초과의 반감기 연장을 나타낸다는 것을 제안한다. 또한, 에콜리주맙에 대비된 BNJ441의 혈청 반감기는 연장된 용혈성 저해에 의해 입증된 바대로 연장된 약물학적 프로필로 번역되었다.

[0367] 실시예 8. 건강한 인간 대상체에서의 BNJ441의 안전성, 관용성 PK 및 PD

1상, 무작위, 맹검, 위약 조절, 단일 상승 용량(SAD) 인간 임상 연구에서 BNJ441의 안전성, 관용성, PK 및 PD를 평가하였고, 여기서 BNJ441은 건강한 대상체에게 정맥내 투여되었다.

BNJ441은 제제 부형제에 의해 무균, 무보존제, 수용액 중에 제제화되었다. BNJ441 제제는 동물 또는 인간 기원의 임의의 특별한 부형제, 또는 부형제를 함유하지 않았다. 제제는 7.0의 pH로 인산염 완충되었다. 성분은 10mg/ml의 BNJ441, 1염기성 인산나트륨 3.34mM, 2염기성 인산나트륨 6.63mM, 염화나트륨 150mM, 폴리소르베이트 80 0.02% 및 적량의 물을 함유하였다.

BNJ441 제제는 20ml의 단일 사용 바이알 중에 10mg/ml 항체 용액으로서 공급되고, IV 투여를 위해 이것을 상업적으로 구입 가능한 식염수(0.9% 염화나트륨 주사, Ph Eur)로 희석함으로써 점적주사에 대해 설계되었다.

[표 12] 건강한 지원자에서의 1상 임상 실험

프로토콜 번호	표제	연구 설계	집단	투약 섭생
BNJ441-HV-101	건강한 대상체에게 IV 투여된 단일 용량으로서 BNJ441 안전성, 관용성, PK, 및 PD를 평가하기 위한 1상, 무작위, 맹검, 위약 조절, 단일 상승 용량 연구	최초 인간, 무작위, 위약 조절, 이중 맹검, 단일 상승 용량	건강한 지원자	코호트 1: 200 mg BNJ441 (4 활성, 2 위약) 코호트 2: 400 mg BNJ441 (6 활성, 2 위약)

[0371]

10명의 건강한 대상체는 BNJ441의 단일 용량을 받았다. 4명의 대상체는 200mg의 용량을 받고, 6명의 대상체는 400mg의 용량을 받았다. 이 연구에 대한 PK 및 안전성 데이터가 결정되고 하기 기재되어 있다.

[0373] 약동학

200mg 및 400mg의 용량의 IV 투여 후 혈청 BNJ441 농도-시간 프로필은 도 26에 도시되어 있다. 농도-시간 데이터는 90일(2136시간) 및 57일(1344시간)까지 동안, 이어서 각각 200mg 및 400mg의 용량에 대해 이용 가능하다. 평균 혈청 농도는 200mg 투약 후 2일 내지 4일(48 내지 96시간) 동안 및 400mg 투약 후 14일 내지 21일(336 내지 504시간) 동안 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 초과로 있었다.

BNJ441 PK 매개변수의 요약이 하기 표 12에 보고되어 있다. BNJ441의 기하 평균(CV) C_{\max} 는 200mg 투약 후 $78.5(10.2\%)\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, 400mg 투약 후 $139(16.2\%)\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 점적주사의 시작 후 관찰된 중앙 (범위) t_{\max} 는 200mg의 용량에 대해 2.4(0.79 내지 8.0)시간이고, 400mg의 용량에 대해 0.58(0.58 내지 1.1)시간이었다. 기하 평균(CV) $AUC_{(0-56\text{일})}$ 는 200mg의 용량에 대해 $32,800(8.6\%)\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 이고, 400mg의 용량에 대해 $58,100(18.9\%)\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 이었다. 기하 평균 C_{\max} 및 $AUC_{(0-56\text{일})}$ 는 노출이 겉보기 용량 비례 방식으로 증가한다는 것을 나타낸다. 기하 평균 $t_{1/2}(CV)$ 는 각각 200mg 및 400mg의 용량에 대해 38.5(18.4%)일 및 32.9(13.3%)일이었다.

[0376] 요약하면, PK 데이터는 평균 BNJ441 C_{max} 및 $AUC_{(0-56일)}$ 이 용량 비례 방식으로 증가한다는 것을 제시고, IV 투여 후 35.5 ± 6.1 일의 평균(표준 편차 [SD]) $t_{1/2}$ 를 지지한다. 닦 적혈구(cRBC) 용혈 데이터의 분석은, BNJ441 농도가 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 초과일 때, 말단 보체가 단일 400mg IV 용량 후 2일까지 완전히 저해된다는 것을 나타낸다.

표 12

건강한 지원자에 대한 200mg 또는 400mg의 IV 투여 후 BNJ441에 대한 약동학적 매개변수의 요약

용량 (mg)	설명적 통계량	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$C_{max}/\text{용량}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{mg}$)	t_{max} (h)	$AUC \tau^a$ ($\text{h}\mu\text{g}/\text{mL}$)	$AUC \tau/\text{용량}$ (($\text{h}^2 \mu\text{g}/\text{mL}$)/mg)	$t_{1/2}$ (일)
200	N	4	4	4	4	4	4
	기하 평균	78.5	0.392	2.40 ^b	32,800	164	38.5
	CV% 기하 평균	10.2	10.2	0.79 - 8.0 ^c	8.6	8.6	18.4
400	N	6	6	6	6	6	6
	기하 평균	139	0.348	0.58 ^b	58,100	145	32.9
	CV% 기하 평균	16.2	16.2	0.58 - 1.1 ^c	18.9	18.9	13.3

^a $AUC \tau = AUC_{(0-56일)}$

^b 중앙

^c 범위

[0377]

약물학

[0379] 도 27에 예시된 바대로 시간에 걸쳐 cRBC 용혈을 저해하는 BNJ441의 능력을 또한 평가하였다. 평균 cRBC 용혈 활성은 위약을 받는 대상체에서 비교적 안정하였다. cRBC 용혈 저해의 개시는 신속하고, 완전한 말단 보체 저해는 점적주사의 종료 시 관찰되었다(200mg의 용량의 경우 0.29시간, 및 400mg의 용량의 경우 0.58시간). BNJ441은 4일 내지 14일 동안 지속하는 용량 의존적 작용 기간을 가졌다.

[0380] BNJ441 농도와 cRBC 용혈 사의 관계식이 작도되고, 도 28에 도시되어 있다. 도 28에 도시된 바대로, 완전한 말단 보체 저해는 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 초과의 BNJ441 농도에서 발생한 반면, $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만의 BNJ441 농도에서 저해가 관찰되지 않았다.

실시예 9. 사이노몰거스 원숭이에서의 단일 용량 연구

[0382] BNJ441의 단일 IV 용량을 2시간 점적주사로서 60 또는 $150\text{mg}/\text{kg}$ (각각 용량의 그룹에 대해 $n = 4$; 용량 그룹마다 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷)의 용량으로 사이노몰거스 원숭이에 투여하였다. 1일로부터 112일에 BNJ441 분석에 대한 혈액 샘플을 수집하였다.

[0383] 투약 전(0시간), 및 8일, 14일, 28일, 56일, 84일 및 112일에 사이노몰거스 항-인간 항체(CAHA)의 존재 하에 모든 BNJ441 치료 원숭이를 스크리닝하였다.

[0384] 60 및 $150\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서의 모든 원숭이는 $150\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서의 동물 2002를 제외하고 적어도 단일 경우에 양성으로 확인되었다. 동물 2002에서의, 또는 다른 동물에 대한 비양성 시점에서의 CAHA의 존재는, 바이오티닐화 BNJ441 및 루테닐화 BNJ441 브릿징 검정에 의한 투여된 BNJ441의 가능한 방해로 인해, 배제될 수 없었다. 투약 후 56일 내지 112일에 $60\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서, 및 투약 후 28일 내지 112일에 $150\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서 양성 CAHA 결과가 관찰되었다. $60\text{mg}/\text{kg}$ 의 처음에 확인된 CAHA 양성 샘플은 56일(동물 1002 및 1503)에 있고, 2마리는 84일(동물 1002 및 1503)에 있고, 3마리는 112일(동물 1001, 1002, 및 1502)에 있었다. 56일 및 84일에 CAHA 양성인 동물 1503은 112일에 더 이상 CAHA 양성이 아니었다. $150\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서의 처음에 확인된 CAHA 양성 샘플은 28일에 동물 2502이고, 이어서 2마리의 원숭이는 56일(동물 2001 및 2502)에 있고, 3마리의 원숭이는 84일(동물 2001, 2501 및 2502)에 있고, 3마리의 원숭이는 112일(동물 2001, 2501 및 2502)에 있었다.

[0385] 개별적 BNJ441 농도-시간 프로필을 계산하였다. $60\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서, 모든 원숭이는 112일 PK 샘플에 걸쳐 정량 가능한 혈장 BNJ441 농도를 가지는 반면, $150\text{mg}/\text{kg}$ 의 용량 그룹에서, 오직 1마리의 원숭이(동물 2002)는 112일에 걸쳐 정량 가능한 혈장 BNJ441 농도를 가졌다. 농도-시간 데이터는 원숭이의 전신 순환에서 BNJ441의

연장된 체류를 나타낸다.

[0386]

BNJ441에 대한 비구획 PK 매개변수 및 요약 통계학은 용량 수준에 의해 모든 원숭이에 대해 계산되고, 각각 60 mg/kg 및 150mg/kg의 용량 수준에 대해 표 13 및 표 14에 기재되어 있다. 점적주사의 기간과 일치하게, 중앙 t_{max} 는 60mg/kg 및 150mg/kg의 용량 수준에 대해 2시간이었다. 150mg/kg의 용량 그룹에서의 1마리 원숭이인, 동물 2501은 투약 후 12시간의 t_{max} 를 가지고, 투약 후 2 내지 12시간으로부터 비교적 편평한 프로필을 가지고, 12시간 투약 후 샘플 농도는 투약 후 2시간에 관찰된 것의 대략 5% 초과이다. 기하 평균 C_{max} , AUC_8 , 및 AUC_{last} 는 모두 용량 증가에 따라 증가하였다. 기하 평균 용량 정규화 C_{max} 값은 2 용량에 걸쳐 유사하여서, 용량 증가에 의해 피크 BNJ441 농도의 용량 비례 증가를 나타내지만, 기하 평균 용량 정규화 AUC_8 값은 용량 그룹 사이에 달랐다. 이 차이는 아마도 150mg/kg의 용량 그룹에서 BNJ441 CL에서의 CAHA 매개 증가로 인하고; BNJ441의 청소는 60mg/kg이 투약된 원숭이와 비교하여 150mg/kg이 투약된 원숭이에서 대략 37% 더 높았다. 기하 평균 V_{ss} 는 2개의 용량 그룹 사이에 유사(12% 내)하였다.

표 13

BNJ441(60 mg/kg 용량)의 비구획 약동학적 매개변수의 요약

동물	용량 (mg/kg)	C_{max} (mg/ml)	$C_{max}/$ 용량 ¹⁾	t_{max} (hr)	AUC_{last} (hr \times mg/ml)	AUC_{∞} (hr \times mg/ml)	$AUC_{\infty}/$ 용량 ²⁾	V_{ss} (ml/kg)	CL (ml/h/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	$t_{1/2}$ (일)
1001	60	1.92	0.0320	2.0	546	555	9.25	63.4	0.108	479	20.0
1002	60	1.90	0.0317	2.0	470	475	7.92	55.3	0.126	474	19.8
1502	60	1.45	0.0242	2.0	598	614	10.2	64.9	0.0977	547	22.8
1503	60	1.44	0.0240	2.0	701	745	12.4	73.7	0.0806	649	27.1
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	평균	1.68	0.0280	2.00	579	597	9.95	64.3	0.103	537	22.4
	SD	0.269	0.00448	NA	97.0	113	1.89	7.53	0.0191	81.7	3.40
	최소	1.44	0.0240	2.00	470	475	7.92	55.3	0.0806	474	19.8
	중앙	1.68	0.0279	2.00	572	585	9.74	64.2	0.103	513	21.4
	최대	1.92	0.0320	2.00	701	745	12.4	73.7	0.126	649	27.1
	CV%	16.0	16.0	NA	16.8	19.0	19.0	11.7	18.5	15.2	15.2
	기하 평균	1.66	0.0277	NA	573	589	9.82	64.0	0.102	533	22.2
	CV% 기하 평균	16.2	16.2	NA	16.9	19.0	19.0	11.8	19.0	14.8	14.8

¹⁾ 단위는 mg/ml/mg/kg이다

²⁾ 단위는 h \times mg/ml/mg/kg이다

hr = 시간; NA = 해당 없음;

[0387]

표 14

BNJ441(150 mg/kg 용량)의 비구획 약동학적 매개변수의 요약

동물	용량 (mg/kg)	C_{max} (mg/ml)	$C_{max}/$ 용량 ¹⁾	t_{max} (hr)	AUC_{last} (hr × mg/ml)	AUC_{∞} (hr × mg/ml)	$AUC_{\infty}/$ 용량 ²⁾	V_{ss} (ml/kg)	CL (ml/h/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	$t_{1/2}$ (일)
2001	150	3.79	0.0253	2.0	787	787	5.25	52.6	0.191	61.0	2.54
2002	150	4.51	0.0301	2.0	1160	1220	8.15	89.8	0.123	759	31.6
2501	150	4.48	0.0299	12.0	1460	1460	9.71	58.8	0.103	87.6	3.65
2502	150	4.40	0.0293	2.0	1030	1030	6.86	37.5	0.146	54.1	2.25
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	평균	4.30	0.0286	4.50	1110	1120	7.49	59.7	0.141	240	10.0
	SD	0.340	0.00227	NA	279	285	1.90	22.0	0.0377	346	14.4
	최소	3.79	0.0253	2.00	787	787	5.25	37.5	0.103	54.1	2.25
	중앙	4.44	0.0296	2.00	1100	1130	7.50	55.7	0.134	74.3	3.09
	최대	4.51	0.0301	12.0	1460	1460	9.71	89.8	0.191	759	31.6
	CV%	7.91	7.91	NA	25.2	25.3	25.3	36.9	26.8	144	144
	기하 평균	4.28	0.0286	NA	1080	1100	7.30	56.8	0.137	122	5.07
	CV% 기하 평균	8.25	8.25	NA	26.1	26.7	26.7	37.2	26.7	190	190

¹⁾ 단위는 mg/ml/mg/kg이다²⁾ 단위는 h × mg/ml/mg/kg이다

hr = 시간; NA = 해당 없음;

[0388]

실시예 10. 실험실내 Fc-감마 수용체 C1q에 대한 BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1 결합의 비교 평가

[0389]

항체 이팩터 기능의 매개자인 것으로 공지된 분자에 대한 3개의 인간화된 항체인, BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1-IgG1의 결합을 조사하였다. BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1-IgG1은 각각 독특한 기능적 및 치료학적 프로필을 가진다. 그러나, 모든 3개는 인간 보체 성분 C5에서 매우 유사한 에피토프에 결합하고 보체 활성화 동안 활성 대사물질, C5a 및 C5b로의 절단을 방지하는 말단 보체의 인간화된 항체 길항제이다.

[0390]

BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1-IgG1은 이의 경쇄 서열이 동일하고, 각각은 인간화된 가변 영역 및 인간 Ig카파 불변 영역을 가진다. BNJ441 및 에콜리주맙은 둘 다 인간 하이브리드 IgG2-G4 Fc를 함유하고, 이것은 인간 IgG2로부터의 CH1 영역, 헌지 및 CH2 영역의 제1 29개 아미노산(인간 IgG4의 CH2 및 CH3 영역의 나머지에 융합됨)을 포함한다. 이 키메라 Fc는 IgG2의 안정한 다이설파이드 결합 쌍 지음을 IgG4의 이팩터 부족 특성과 조합한다. BNJ441 및 에콜리주맙이 가용성 항원에 대해 지향되므로, 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 개시하는 이의 능력을 직접적으로 평가할 수 없다. 대신에, Fc 감마 수용체(FcγR) 및 보체 성분 C1q에 대한 BNJ441 또는 에콜리주맙 결합의 직접적인 측정을 수행하고, 결합의 부재 하에 이들이 각각 ADCC 또는 CDC를 매개할 수 없는 것으로 추론되었다. h5G1.1-IgG1(에콜리주맙과 동일한 인간화된 가변 영역을 가지는 IgG1 아이소타입 항체)은 대조군으로서 포함되었다. h5G1.1-IgG1 자체가 세포 연관 항원의 부재 하에 ADCC 또는 CDC를 발생시킬 수 없지만, IgG1 아이소타입 Fc 영역이 이팩터 기능 분자에 완전히 결합하는 것으로 예상된다.

[0391]

실시예 7에서 상기 기재된 바대로, 중쇄에서 4개의 아미노산 치환을 도입함으로써 생체내 반감기를 증가시키기 위해 에콜리주맙으로부터 BNJ441을 조작하였다. 인간화된 중쇄 가변 영역에서의 2개의 아미노산 변화인, Tyr-27-His 및 Ser-57-His(카밧 등에 따른 중쇄 아미노산 넘버링)는 각각 pH 7.4에서 C5에 대한 결합에 대한 최소 영향으로 pH 6.0에서 C5에 대한 결합을 탈안정화시키도록 도입되었다. 제3 중쇄 불변 영역 도메인(CH3)에서의 돌연변이인, Met-428-Leu 및 Asn-434-Ser은 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 증대시키도록 도입되었다. 이들 돌연변이를 함께 취하는 것은, 음세포작용 후 초기 엔도솜의 산성화 환경에서 유리 항체에 대한 항체:C5 복합체의 해리를 증가시킴으로써 항원 매개 약물 청소를 상당히 약화시키고, 초기 엔도솜으로부터 FcRn에 의해 혈관 구획으로 다시 재순환되는 항체의 비율을 증가시키도록 설계되었다.

[0392]

이 연구에서, FcγR 하위종류(FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIb/c, FcγRIIIa 및 FcγRIIIb)와 모든 3개의 항체의 다합체 상호작용을 효소 연결 면역흡착 검정(ELISA)에서 평가하고, FcγR과의 단량체 상호작용을 표면 플라스민 공명(SPR)을 이용하여 평가하였다. 3개의 항체에 대한 C1q의 결합을 조사하기 위해 바이오층 간섭법 및 SPR을 이용하였다. 이들 분석을 수행하기 위해 사용된 시약은 표 15에 기재되어 있다.

표 15

항체 및 단백질 시약

시약	공급사	농도
BNJ441	알렉시온	10 mg/ml
에콜리주맙	알렉시온	10 mg/ml
Goat 항인간 F(ab') ₂ -바이오틴	잭슨 이뮨노랩스	1.1 mg/ml
HRP-스트렙타비딘	인비트로겐	1.25 mg/ml
h5G1.1-IgG1	알렉시온	1.43 mg/ml 8.11 mg/ml
C1q	컴플리먼트 테크놀러지스	1 mg/ml
인간 Fc γ RI(CD64)	알엔디 시스템즈	100 μg/ml
인간 Fc γ RIIa(CD32a)	알엔디 시스템즈	100 μg/ml
인간 Fc γ RIIb/c(CD32b/c)	알엔디 시스템즈	100 μg/ml
인간 Fc γ RIIIa(CD16a)	알엔디 시스템즈	100 μg/ml
인간 Fc γ RIIIb(CD16b)	알엔디 시스템즈	100 μg/ml

[0394]

Fc γ R에 대한 다가 항체 복합체의 결합

[0396]

1.5ml의 원심분리 관 내에서 인산염 완충 식염수(PBS) 중에 2:1 항체:F(ab')₂ 몰 비로 BNJ441, 에콜리주맙 또는 h5G1.1-hG1을 염소-항-인간 F(ab')₂-바이오틴(잭슨 이뮨노랩스(Jackson Immunolabs))과 밤새 항온처리함으로써 항체 복합체를 제조하였다.

[0397]

Ni-NTA(퀴아젠(Qiagen))에 의해 예비 코팅된 미량적정 플레이트를 PBS 중의 5μg/ml의 수용체 농도로 50μl/웰의 6X 히스티딘 태그화 인간 Fc γ R(Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb/c, Fc γ RIIIa 또는 Fc γ RIIIb)과 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 이후, 플레이트를 PBS/0.05% 트윈-20에 의해 3회 세척하였다. 세척 후, PBS/0.05% 트윈-20 중의 50μl의 항체 복합체를 실온(RT)에서 60분 동안 플레이트에서 항온처리하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈-20에 의해 세척한 후, PBS/0.05% 트윈-20 중의 50μl의 스트렙타비딘-HRP(Invitrogen)을 플레이트에 첨가하고 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 이 항온처리 및 세척 후, 75μl의 TMB-ELISA 기질(3, 3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘, 써모 사이언티픽)을 첨가하였다. 반응을 75μl의 2M H₂SO₄에 의해 중지시키고, 흡광도를 450nm에서 판독하였다.

[0398]

샘플을 2중 실행하고, 데이터는 평균 값으로서 제시되었다. 결과를 스프레드시트 프로그램에 입력하였다. 항체 면역 복합체의 각각의 농도의 또는 항체 면역 복합체의 부재 하의 450nm에서의 흡광도는 그래프 표시로서 작도된다. 중요한 해리 상수가 계산되고 표 16에 요약되어 있고 하기 기재되어 있다.

[0399]

Fc γ R에 대한 다가 항체의 결합

[0400]

직접적인 부동화를 이용하여 비아코어 3000 장치에서 SPR을 통해 Fc γ R에 대한 BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1-IgG 결합의 동역학을 결정하였다. BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1을 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 희석하고, 아민 커플링에 의해 CM5 칩의 하나의 유세포에 부동화하였다. 제2 유세포를 기준 표면으로서 사용하였다. 실행 완충제(HBS-EP(pH 7.4)) 중에 희석된 Fc γ R의 농도를 세포 둘 다에 주입하였다. 표면을 20mM HC1, 0.01% P20에 의해 각각의 사이클마다 재생하였다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1 소프트웨어(비아코어 AB(스웨덴 옵실라))에서 정상 상태 친화도 모델을 이용하여 데이터를 분석하였다.

[0401]

Fc γ RI에 대한 h5G1.1-IgG1 결합의 동역학을 이의 더 강한 친화도로 인해 단일 사이클 동역학을 통해 평가하였

다. 항체를 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 희석하고, 아민 커플링에 의해 CM5 칩의 하나의 유세포에서 직접적으로 부동화하였다. 제2 유세포를 기준 표면으로서 사용하였다. 실행 완충제(HBS-EP(pH 7.4)) 중에 희석된 Fc γ R1의 농도를 세포 둘 다에서 주입하였다. 이 검정은 재생을 필요로 하지 않았다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1 소프트웨어(비아코어 AB(스웨덴 옵살라))에서 적정 동역학 1:1 모델을 이용하여 데이터를 분석하였다.

표 16

단량체 Fc γ R에 대한 BNJ441, 에콜리주맙 및 h5G1.1-IgG1 결합에 대한 해리 상수

Fc γ R	BNJ441, K_D [μ M]	에콜리주맙, K_D [μ M]	h5G1.1-IgG1, K_D [μ M]
RI	3.75	3.78	0.123
RIIa	2.31	2.58	0.8
RIIb/c	8.09	9.84	3.06
RIIIa	7.23	6.78	0.85
RIIIb	3.33	3.49	1.89

[0402]

항체 면역 복합체 및 Fc γ R의 아비디티 추진 다합체 상호작용을 검출하기 위한 ELISA 검정을 수행하였다. 결과가 표 16에 요약되어 있다. BNJ441 및 에콜리주맙은 Fc γ RI, Fc γ RIIb/c, Fc γ RIIIa 또는 Fc γ RIIIb에 대한 검출 가능한 결합을 나타내지 않고, 각각 Fc γ RIIa와 4배 내지 8배 더 약한 결합을 나타냈다. SPR에 의해 추론된 BNJ441 및 에콜리주맙에 대한 단량체 Fc γ R 결합에 대한 해리 상수(K_D)는 Fc γ R 상호작용이 매우 약하고 2개의 항체 사이에 거의 구별 불가능하다는 것을 확인시켜준다: Fc γ RI(약 4 μ M), Fc γ RIIa(약 2 μ M), Fc γ RIIb(약 9 μ M), Fc γ RIIIa(약 7 μ M) 및 Fc γ RIIIb(약 3 μ M). IgG1 아이소타입 대조군(h5G1.1-IgG1)에 대한 해리 상수는 IgG2-G4 아이소타입 항체에 대비된 Fc γ R1과의 고친화도 상호작용(123pM) 및 저친화도 Fc γ R에 대한 적절한 결합의 증가와 일치한다: Fc γ RIIa(약 1 μ M), Fc γ RIIb(약 3 μ M), Fc γ RIIIa(약 1 μ M) 및 Fc γ RIIIb(약 2 μ M). 표 16을 참조하다. 바이오층 간섭법을 통해 C1q와 BNJ441 또는 에콜리주맙 사이의 상호작용이 검출 가능하지 않았다. 이 결과는 에콜리주맙의 키메라 인간 IgG2-G4 Fc가 각각 ADCC 또는 CDC를 매개하는 Fc γ R 또는 C1q를 통한 이팩터 기능을 발생시키는 능력이 거의 없거나 없다는 것과 일치한다. 게다가, 이 결과는 BNJ441로 혼입된 중쇄 아미노산 치환에 에콜리주맙에 대비해 이에 대한 결합을 실질적으로 변경하지 않는다는 것을 보여준다.

[0404]

실시예 11. 조직 교차 반응성 연구

[0405] 1. GLP 인간 교차 반응성 연구

[0406]

상이한 항원 특이성을 가지는 플루오레세인화 BNJ441(BNJ441-FITC라 칭함) 및 대조군 항체(OX-90G2G4-FITC)을 사용하여 인간 조직과의 잠재적 교차 반응성을 결정하였다.

[0407]

BNJ441-FITC는 양성 대조군 물질(hC5라 칭하는, 정제된 인간 보체 단백질 C5 자외선 [UV] 수지 스팟 슬라이드)의 보통 내지는 강한 염색을 생성하였지만, 음성 대조군 물질(악성 웨타이드의 인간 고칼슘혈증, 1-34번 아미노산 잔기, UV 수지 스팟 슬라이드, PTHrP 1-34라 칭함)와 특이적으로 반응하지 않았다. 대조군 물품인, OX-90G2G4-FITC는 양성 또는 음성 대조군 물질과 특이적으로 반응하지 않았다. BNJ441-FITC와 양성 대조군 물질의 훌륭한 특이적 반응 및 음성 대조군 물질과의 특이적 반응성의 결여, 및 대조군 물품의 반응성의 결여는 검정이 민감하고 특이적이며 재현 가능하다는 것을 나타낸다.

[0408]

BNJ441-FITC에 의한 염색은 하기 요약된 바대로 인간 조직 패널에서 관찰되었다:

[0409] • 대부분의 인간 조직에서의 단백질성 재료:

[0410] • 하기 조직 요소에서의 세포질 및/또는 세포질 과립:

[0411] - 대장, 식도, 림프절, 부갑상선, 비장 및 편도에서의 단핵 세포,

[0412] - 혈액 도말 및 골수에서의 혈소판,

[0413] - 골수에서의 거핵세포,

[0414] - 나팔관, 간(간세포), 췌관 및 자궁경부에서의 상피,

[0415] - 폐에서의 중피.

[0416] C5가 순환 혈청 단백질이므로, 단백질성 재료의 염색이 기대된다. 단핵 세포, 예컨대 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포, 및 혈소판은 C5를 분비하는 것으로 보고되었고; 따라서, BNJ441-FITC에 의한 이 세포 유형의 염색이 또한 기재되었다. 추가적으로, 중피 세포주는 C5를 생성하는 것으로 나타났다. 그러나, C5를 생성하는 것으로 밝혀진 혈소판이 거핵세포로부터 유래하지만, 현재의 연구에서 BNJ441-FITC에 의해 염색된 상피 세포 유형, 또는 거핵세포에 의한 C5의 발현을 기술하는 문헌이 이용 가능하지 않다. 따라서, 상피 세포 유형의 염색은 C5 발현의 이전에 인식되지 않은 부위, 또는 유사하지만 비관련된 단백질 또는 조직 절편의 다른 구성요소(들)로부터의 단백질 서열 또는 구조와의 조직 교차 반응성을 나타낸다. 그러나, 단백질성 재료의 염색을 제외하고, 이 연구에서 관찰된 모든 염색은 성질상 세포질이고, 세포질 및 세포질 구조가 생체내 시험 물품에 접근 가능하지 않을 것이다. 요약하면, BNJ441-FITC 염색이 특이적 교차 반응성이 관찰되지 않았고, 이것은 치료 관련 독성의 예상을 발생시켰다.

[0417] 2. GLP 사이노몰거스 원숭이 조직 교차 반응성 연구

[0418] 표준 GLP 조직 교차 반응성 연구를 또한 일련의 사이노몰거스 원숭이 조직을 사용하여 수행하여 오프표적(off-target) 및 온표적(on-target) 결합 둘 다를 검사하고, 동일한 시약을 인간 조직 결합 연구에서 사용하였다.

[0419] BNJ441-FITC에 의한 일부 염색은 하기 요약된 바대로 사이노몰거스 원숭이 조직 패널에서 관찰되었다.

[0420] • 대부분의 사이노몰거스 원숭이 조직에서의 단백질성 재료:

[0421] • 하기 조직 요소에서의 세포질 및/또는 세포질 과립:

[0422] - 럼프절, 비장 및 편도에서의 단핵 세포,

[0423] - 나팔관에서의 상피.

[0424] 사이노몰거스 원숭이 조직 패널에서 관찰된 BNJ441-FITC 염색 패턴이 동반 인간 조직 교차 반응성 연구에서 인간 조직 패널에서 관찰된 것보다 전체적으로 덜 강하고 덜 빈번하였다. 추가로, 인간 조직 패널에서, 혈소판, 거핵세포, 췌관 상피, 자궁경부 상피, 간세포 및 중피의 염색이 관찰되었지만, 이들 조직 요소는 사이노몰거스 원숭이 조직 패널에서 염색되지 않았다. 더구나, 단백질성 재료의 염색을 제외하고, 이 연구에서 관찰된 모든 염색은 성질상 세포질이고, 세포질 및 세포질 구조가 생체내 시험 물품에 접근 가능하지 않을 것이다. BNJ441이 인간 C5에 정교하게 특이적인 것(그리고 비인간 영장류로부터의 C5와 교차 반응성이 아님)으로 나타났으므로, 이 연구에서 관찰된 제한된 결합은 확인 불가능한 교차 반응성 재료와의 비특이적 결합으로 인한 것일 것이다.

[0425] 실시예 12: 말단 보체 활성 검정에서의 에콜리주맙과 비교된 BNJ441의 효력

[0426] C5에 대한 pH 의존적 결합을 생성시키는 BNJ441에서 조작된 돌연변이는 에콜리주맙(대략 29.3pM)에 대비해 대략 17배만큼 pH 7.4(대략 491pM)에서 이의 친화도를 감소시켰고, 에콜리주맙과 비교하여 C5 매개 말단 보체 활성의 BNJ441 저해 효력을 감소시키는 것으로 예상되었다. 생리학적 관련 조건 하에 BNJ441 및 에콜리주맙의 효력을 예측하기 위해, 3개의 공통으로 사용된 동물 모델(닭, 양 및 토끼)로부터의 적혈구(RBC)의 보체 매개 용혈의 길항작용이 90% 정상 인간 혈청에서 평가되었다.

[0427] RBC 및 양 적혈구(sRBC)를 항체에 의해 예비 감작화하여 보체 전통적인 경로(CCP)의 활성화를 개시하였다. 토끼 적혈구(rRBC)를 예비 감작화하지 않고, 보체 대안적인 경로(CAP) 활성화의 모델로서 사용하였다. 항체를 100, 200 및 400nM에서 혈청 중에 예비 항온처리하여 각각 대략 0.5:1, 1:1 및 2:1의 항원 결합 부위 대 C5의 몰비를 생성하였다. 항체 BNJ430은 BNJ441과 동일한 Fc 영역을 함유하지만, 인간 C5에 결합하지 않고, 음성 대조군으로서 포함되었다. 용혈의 백분율을 0분, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분 및 8분에서 측정하여, 초기 속도 조건 하에 반응이 관찰되는 것을 보장하였다.

[0428] 도 29에 도시된 바대로, BNJ441도 에콜리주맙도 cRBC 용혈에서 100nM에서 길항작용을 나타내지 않았다. 항체 둘 다는 200nM에서 부분 길항작용을 나타내지만(항원 결합 부위 대 C5의 대략 1:1 몰비), BNJ441은 에콜리주맙에

대비해 감소한 효력을 가졌다. 용혈의 저해는 항원 결합 부위 대 C5(400nM)의 2:1 몰 비에서 항온처리될 때 항체에 거의 완전하였다. sRBC 용혈 검정의 결과는 유사하여서, 200nM에서의 BNJ441의 존재 하의 20% 미만의 용혈, 및 400nM에서의 각각의 항체에 의한 거의 완전한 저해(데이터 비도시)를 나타낸다. CAP 매개 rRBC 용혈 검정은 200nM에서의 검출 불가능한 저해, 및 400nM에서의 오직 부분 저해(데이터 비도시)와 함께 항-C5 항체의 존재 하의 더 높은 수준의 용혈을 나타낸다.

[0429] 결론적으로, 이 실험실내 보체 활성 검정에서 에콜리주맙에 대비된 BNJ441의 효력의 보통의 소실은 C5에 대한 이의 더 약한 친화도와 일치한다. C5에 대한 BNJ441의 친화도는 생체내 C5의 농도 및 BNJ441의 표적화된 치료학적 수준보다 대략 1000배 훨씬 낮고, 따라서 이의 치료학적 효율을 손상시키지 않을 것이다.

[0430] 실시예 13: 말단 보체 활성 검정에서의 에콜리주맙과 비교된 BNJ441의 선택도

[0431] 비인간 동물 모델에서 BNJ441의 약리학적 활성을 평가하기 위해, 침팬치, 개코원숭이, 래서스 마카크, 사이노몰거스 마카크, 비글, 토끼, 기니아 퍼그, 랙트 및 마우스로부터의 혈청 중의 항체 감작화된 cRBC의 보체 매개 용혈을 길항하는 BNJ441의 능력을 측정하였다. 에콜리주맙 및 인간 IgG2/G4 Fc(BNJ430)를 가지는 항-마우스-C5 항체를 아이소타입 대조군으로서 사용하였다.

[0432] 감작화된 cRBC를 각각의 검정에 대해 알서버액(Alsever's)(람파이어 바이오로지컬스(Lampire Biologicals)) 중에 $400\mu\text{l}$ 의 닦 전혈로부터 준비하고, 4°C 에서 $1\text{m}\ell$ 의 GVBS에 의해 4회 세척하고 5×10^7 개의 세포/ $\text{m}\ell$ 로 GVBS 중에 재현탁시켰다. 닦 적혈구를 감작화하기 위해, 다중클론 항-닭 RBC 항체(락랜드)를 $150\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 로 세포에 첨가하고 15분 동안 얼음에서 항온처리하였다. GVBS를 한번 세척한 후, 세포를 $3.6\text{m}\ell$ 의 최종 용적으로 GVBS 중에 재현탁시켰다.

[0433] 하기 포유동물로부터의 혈청을 포함하는 보체 보존된 혈청을 바이오레클라메이션으로부터 얻었다: 인간; 침팬치; 개코원숭이; 래서스 마카크; 사이노몰거스 마카크; 비글; 토끼; 기니아 퍼그; 및 랙트. $10\text{mg}/\text{m}\ell$ 의 항체 BNJ441; 에콜리주맙($10\text{mg}/\text{m}\ell$); $0.873\text{mg}/\text{m}\ell$ 의 BNJ430을 GVBS 중에 30% 혈청 중에 0, 60, 300 및 600nM 의 최종 농도로 희석하고 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 감작화된 cRBC를 웨일 $30\mu\text{l}$ (2.5×10^6 개의 세포)로 항체/혈청 혼합물에 첨가하고, 37°C 에서 30분 동안 항온처리하고, $30\mu\text{l}$ 의 0.5M EDTA를 각각의 웨일에 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 플레이트를 $1800 \times \text{g}$ 에서 3분 동안 원심분리하고, $80\mu\text{l}$ 의 상청액을 새로운 넓적 바닥 96웰 플레이트로 옮겼다. 415nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0434] 마우스 혈청이 전통적인 경로 보체 활성의 빈약한 소스이므로, 마우스 혈청을 C5 결핍 인간 혈청과 1:1 혼합하여 마우스에서의 잠재적 BNJ441 약리학적 활성을 평가하였다. 항체를 GVBS 중에 50% 전체 혈청(25% 마우스 혈청, 25% C5 결핍 인간 혈청) 중의 0, 60, 300 및 600nM 의 최종 농도로 희석하고, 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 감작화된 cRBC를 웨일 $30\mu\text{l}$ (2.5×10^6 개의 세포)로 항체/혈청 혼합물에 첨가하고, 37°C 에서 30분 동안 항온처리하고, $30\mu\text{l}$ 의 0.5M EDTA를 각각의 웨일에 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 플레이트를 $1800 \times \text{g}$ 에서 3분 동안 원심분리하고, $80\mu\text{l}$ 의 상청액을 새로운 넓적 바닥 96웰 플레이트로 옮겼다. 415nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0435] 10mM EDTA와 함께 또는 이것 없이 항-C5 항체 없이 혈청을 함유하는 샘플을 각각 무용해 또는 완전 용해 대조군으로서 사용하였다. 2중 또는 3중 샘플 조건을 실행하였다.

[0436] 결과를 스프레드시트에 입력하여 용해무 대조군의 배경 공제 및 완전한 용해 대조군에 대비된 용혈(%)의 정규화, 평균 값($\pm \text{s.d.}$)의 계산 및 데이터의 그래프 표시를 허용한다. 용해무 대조군으로부터의 평균 배경에 대한 흡광도 값은 각각의 복제물로부터 공제되고, 샘플 흡광도는 하기 식에 따라 완전한 용해 대조군에서의 용해의 백분율로서 표시된다: cRBC 용혈(%)은 (각각의 샘플 복제물 샘플에서의 A415 값 - 용해무 대조군에서의 평균 A415 값)/(완전한 용해 대조군에서의 평균 A415 값 - 용해무 대조군에서의 평균 A415 값) $\times 100$ 이다.

[0437] 샘플 복제물에 대한 cRBC 용혈(%)의 평균 및 표준 편차는 그래프 표시(데이터 비도시)로 작도되어 있다.

[0438] BNJ441은 사이노몰거스 마카크로부터의 네이티브 C5에 대한 검출 가능한 결합을 가지지 않고, 항원 결합 부위 대 C5의 8배 몰 초과에서 시험된 임의의 비인간 혈청에서 실험실내 약리학적 활성을 가지지 않는 것으로 나타났다. 종합하면, 이들 데이터는 BNJ441이 인간에서 약동학 또는 약물학을 모델링하기에 적합한 임의의 용이하게 접근 가능한 비인간 종에서 임의의 관련 약리학적 활성을 가지지 않는다는 결론과 일치한다.

[0439] 실시예 14: BNJ441의 물리화학적 규명

[0440] BNJ441 항체는 재조합, 인간화된 항체이고, 2개의 동일한 448개의 아미노산 중쇄 및 2개의 동일한 214개의 아미노산 경쇄로 이루어진다. 도 30을 참조한다. BNJ441의 불변 영역은 인간 카파 경쇄 불변 영역 및 하이브리드 인간 IgG2-IgG4 중쇄 불변 영역(또한 "G2/G4"라 칭함)을 포함한다. IgG2/G4 불변 영역은 항체의 이팩터 기능 활성화, 보체 활성화 및 면역원성을 감소시키도록 합당하게 설계되었다. 중쇄 CH1 도메인, 헌지 영역 및 CH2 도메인의 제1 5개 아미노산은 인간 IgG2 아미노산 서열, CH2 영역에서의 6번 내지 36번 잔기와 일치하고, 인간 IgG2 및 IgG4 아미노산 서열 둘 다에 공통인 반면, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 나머지는 인간 IgG4 아미노산 서열과 일치한다. 인간 프레임워크 영역으로 이루어진 인간 C5 결합 부위를 형성하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 젖과 상보성 결정 영역으로 그래프팅된다. BNJ441 항체에서의 사슬간 다이설파이드 결합은 도 31에 도시되어 있다. 잔기 번호는 모든 다이설파이드 결합 쌍 짓기 및 N 연결 글리칸 부위에 대해 도 31에 도시되어 있다.

[0441] 표 17은 BNJ441 항체의 일반적인 특성을 기재한다. 하기 제시된 주요 성분에 대한 이론적 화학식 및 이론적 평균 분자량은 항체가 18개의 다이설파이드 결합, 2개의 중쇄 N 말단 피로글루타메이트, 2개의 중쇄 C 말단 라이신의 클리핑, 및 2개의 GOF 글리칸 잔기의 첨가를 함유한다는 것을 추정한다. BNJ441에서의 아미노산 잔기의 수는 아미노산 분석에 의해 예측되었다.

표 17

BNJ441 항체의 일반 특성

특성	값
이론적 화학식	C ₆₅₄₂ H ₁₀₀₇₂ N ₁₇₀₄ O ₂₁₀₆ S ₄₈
이론적 평균 분자량	147,827,62 Da
아미노산의 수	1324

[0442]

[0443] BNJ441의 제조를 위해 안정한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주 발현 BNJ441을 개발하였다. 이 세포주를 생성하기 위해 사용된 소스 CHOK1SV 세포를 론자 바이올로직스(Lonza Biologics) CHOK1SV 마스터 세포 뱅크 269-M으로부터 얻었다. 이 세포 소스는 박테리아 및 진균 오염물질 및, 감염성이 아닌 세포 내인성 레트로바이러스 입자 이외의, 모든 검출 가능한 바이러스가 없는 것으로 입증되었다. 속주 CHOK1SV 세포를 플라스미드 pBNJ441.1에 의해 형질감염시키고, 안정한 클론을 MSX에 의해 선택하였다. BNJ441의 제조를 위한 생성 세포주로서 1차 클론 3A5를 선택하였다.

[0444] BNJ441 별크 약물 기질 뱃취의 엔지니어링 및 GMP 뱃취를 준비하고 표 18에 기재된 시험에 의해 물리화학적으로 규명하였다. 엔지니어링 뱃취를 200 l 생물반응기에서 성장한 CHO 세포를 사용하여 파일럿 식물에서 제조하고, 정제된 재료를 PK 연구에서 사용하였다. GMP 뱃취를 200 l 생물반응기를 사용하여 파일럿 식물에서 성장한 CHO 세포를 사용하여 제조하였다. BNJ441 엔지니어링 및 GMP 별크 약물 기질 뱃취를 대략 10mg/ml에서 제제화하고 시험하였다. 뱃취에 대한 물리화학 특성이 표 19에 요약되어 있다.

표 18

BNJ441 물리화학적 규명

시험 카테고리	시험
순도	분석적 초원심분리
크기	온전한 분자량 분석(MALDI-ToF-MS)
크기	온전한 분자량 분석(ESI-ToF-MS)
동일성	N 말단 서열분석
1차 구조	아미노산 분석
더 고차의 구조	원형 이색성 분광법
글라이코실화 패턴	N 연결 올리고사카라이드 질량 프로파일링 (MALDI-ToF-MS)
글라이코실화 패턴	올리고사카라이드
글라이코실화 패턴	모노사카라이드
글라이코실화 패턴	시알산
열안정성	시차 주사 열량계
동역학 및 자가 결합	비아코이 동역학 및 자가 결합

[0445]

표 19

BNJ441 물리화학적 요약

시험	엔지니어링 뱃취 BNJ441	GMP BNJ441
분석적 조원심분리 단량체(%)	99.3%	99.0%
분자량 분석 MALDI-ToF-MS(Da)	148,484	148,522
분자량 분석 ESI-ToF-MS(Da)	주요 아이소폼 147830.80 범위 147,000 - 149,500	주요 아이소폼 147830.72 범위 147,000 - 149,500
N 말단 서열분석 중쇄	파로 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S	파로 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S

[0446]

시험	엔지니어링 뱃취 BNJ441	GMP BNJ441
	D	D
	I	I
	Q	Q
	M	M
	T	T
	Q	Q
	S	S
	P	P
	S	S
	S	S
N 말단 서열분석 경제	L	L
	S	S
	A	A
	S	S
	V	V
	G	G
	D	D
	R	R
	V	V
	T	T

[0447]

시험	엔지니어링 뱃취 BNJ441	GMP BNJ441
<u>아미노산 분석(번호)</u>	<u>분자마다의 잔기</u>	<u>분자마다의 잔기</u>
ASX (106)	105	102
GLX (138)	137	135
SER (166)	170	167
GLY (84)	89	88
HIS (22)	26	26
ARG (36)	42	42
THR (110)	106	105
ALA (64)	68	67
PRO (88)	93	92
TYR (54)	51	53
VAL (128)	127	129
MET (12)	11	11
ILE (28)	26	27
LEU (94)	92	94
PHE (50)	51	51
LYS (82)	68	73

[0448]

시험	엔지니어링 배취 BNJ441	GMP BNJ441
원형 이색성		
<u>근 UV 특징</u>	<u>근 UV(nm)</u>	<u>근 UV(nm)</u>
최대	295	295
최소	269	269
최대	266	266
최소	262	262
음성 과형	250	250
<u>원 UV 특징</u>	<u>원 UV(nm)</u>	<u>원 UV(nm)</u>
솔더	239-231	239-231
최대	218	218
최소	201	202
<u>디콘볼루션</u>	<u>디콘볼루션</u>	<u>디콘볼루션</u>
α -나선	0.030	0.030
3/10 나선	0.026	0.026
β -시트	0.328	0.334
회전	0.156	0.158
풀리 (Pro) II	0.059	0.061
비순서화	0.397	0.388
전체 ¹	0.996	0.997
올리고사카라이드 (MALDI-ToF-MS)	<u>m/z (M+Na)+</u>	<u>m/z (M+Na)+</u>
G1F	1647.61	1647.55
G1	1501.52	1501.49
GOF	1485.56	1485.51
G0	1339.47	1339.49
GOF-GN	1282.46	1282.39
Man-5	1257.43	1257.48

[0449]

시험	엔지니어링 뱃취 BNJ441	GMP BNJ441
<u>올리고사카라이드</u>	%	%
M3N2F	0.00	0.00
GOF-GN	0.66	0.93
GOF	90.45	91.26
G1F	8.79	7.7
G2F	0.00	0.00
Man-5	0.09	0.12
aGal1	0.00	0.00
Man-6	0.00	0.00
aGal2	0.00	0.00
Man-7	0.00	0.00
aGal3	0.00	0.00
SA1-1	0.00	0.00
SA1-2	0.00	0.00
SA1/aGal4	0.00	0.00
SA1-3	0.00	0.00
SA1-4	0.00	0.00
SA2-1	0.00	0.00
SA2-2	0.00	0.00
전체 GOF, G1F, G2F	99.24	98.96
산성	0.00	0.00
고만노스	0.09	0.12
aGal	0.00	0.00
중성	99.99	100.01
보노시알릴화	0.00	0.00
다이시알릴화	0.00	0.00

[0450]

시험	엔지니어링 뱃취 BNJ441	GMP BNJ441
<u>도노사카라이드</u>	<u>(nmol 모노/ mg 단백질)</u>	<u>(nmol 모노/ mg 단백질)</u>
GlcNAc	22.14	29.26
GalNAc	0.00	0.00
갈락토스	0.66	0.82
만노스	20.25	23.24
푸코스	5.38	6.53
전체	48	60
글라이코실화(%)	0.93%	1.16%
<u>시알산</u>	<u>(nmol/mol)</u>	<u>(nmol/mol)</u>
NGNA	결정되지 않음	결정되지 않음
NANA	< LoQ	< LoQ
<u>열량법</u>	67.0°C	67.0°C
<u>T_m</u>		
<u>비아코아 동력학</u>		
k_a (1/Ms)	$4.44e^5$	$4.86e^5$
K_d (1/s)	$2.05e^{-4}$	$2.04e^{-4}$
K_p (M)	$4.61e^{-10}$	$4.21e^{-10}$
Chi^2	0.0257	0.0347
<u>비아 코아 자가 겹합</u>		
K_p (M)	$7.12e^{-3}$	$2.71e^{-4}$
Chi^2	0.147	0.359

[0451]

[0452]

표 19는 엔지니어링 뱃취에 대해 결정된 문자량이 147830.80Da이고 GMP 뱃취가 147830.72Da라는 것을 보여준다. 값은 표 17에서의 147,827.62Da의 BNJ441에 대한 계산된 주성분 문자량 값과 일치하고, 외부적으로 보정된 ESI-ToF-MS의 100ppm 질량 정확도 내에 있다. 147,000-149,500Da 범위 뒤로 주피크가 관찰되지 않았다. 이 방법은 온전한 문자량에 기초하여 문자를 확인하였다. 시험 샘플을 C4 RP-HPLC 칼럼에 주입하고, 수성:유기 용매 구배에 의해 용리하였다. 이후, 용리물을 ToF 질량 분광기로 전기분무하고, 크로마토그래피 피크의 상부 절반으로부터의 스펙트럼을 디콘볼루션하여 온전한 문자량을 제공하였다.

[0453]

표 19는 BNJ441 뱃취에 대해 결정된 N 말단 서열을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 결정된 N 말단 서열은 BNJ441 뱃취에 대해 아미노산 서열과 일치하였다. 중쇄는 예상된 바대로 PyroQ에 의해 차단되고, 피로글루타메이트 아미노펩타이데(PGAP)에 의해 탈차단되는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 순차적 Edman 분해 및 HPLC 분석에 의해 폴리펩타이드 사슬의 N 말단에서 단백질의 1차 서열을 결정하였다.

[0454]

표 19는 BNJ441 뱃취에 대해 결정된 문자마다의 아미노산 분석 잔기를 나타낸다. 이 값은 모두 표 19의 제1 칼럼에 기재된 1차 서열에 기초하여 BNJ441에 대한 문자마다의 계산된 잔기의 수와 일치한다. 아미노산 분석 데이터를 3중 획득하였다. 이 방법은 개별적 아미노산 구성성분으로의 단백질의 산성 가수분해에 의해 문자의 1차 구조를 평가한다. 이 방법은 시스테인 또는 트립토판을 검출하지 않는다. 아스파라긴 및 아스파르테이트는 단일 피크 및 표지된 Asx에서 검출되었다. 글루타민 및 글루타메이트는 단일 피크 및 표지된 Glx에서 또한 검출되었다. 20개의 표준 아미노산 중에서, 전체 16개의 아미노산에 대해 Asx 및 Glx 기와 함께, 14개가 이 방법에 의해 독특하게 검출되었다. 표시된 이들 중에서, BNJ441은 이 방법에 의해 검출될 수 있는 전체 1262개의 잔기를 가진다.

[0455]

표 19는 BNJ441 뱃취에 대한 원이색성(CD) 근 UV 국소 특징, 원 UV 국소 특징 및 디콘볼루션 결과를 나타낸다. 디콘볼루션은 소정의 기준 세트에 대해 CDPro 소프트웨어에 의해 결정된 α -나선, 3/10 나선, β -시트, 회전, 폴리(Pro) II 및 비순서화 구조의 양을 기술한다. 각각의 뱃취에 대한 근 UV(3차 구조) 및 원 UV(2차 구조)에 대한 CD 스펙트럼을 결정하였다. 이 방법은 광학 활성(키랄) 문자, 예컨대 단백질의 흡수 밴드에서 나타난 원쪽

및 오른쪽 원형으로 편광된 광의 차등 흡수에 의해 분자에서 더 높은 차수의 분자 구조(2° 및 3°)를 평가하였다. CD 스펙트럼의 디콘볼루션이 수행되고, 결과가 표 19에 기재되어 있다.

[0456] 표 19는 결정된 각각의 글리칸에 대한 평균 분자량을 나타낸다. BNJ441 뱃취에 대한 관찰된 N 연결 올리고사카라이드 또는 글리칸 분자량은 표 20에 기재된 이론적 글리칸 분자량과 일치한다. MALDI-TOF 질량 분광법에 의해 유리 글리칸 분자량 스펙트럼을 결정하였다. 이 방법은 분자량에 의해 약물 분자와 연관된 글리칸을 확인하였다. 글리칸은 PNGase F에 의해 이전에 항체로부터 효소로 절단되었다. 이후, 글리칸을 고상 추출하고, 3,4-디하이드록시벤조산 기질 용액과 혼합하고, MALDI 표적에서 공침하였다. 이 건조된 샘플을 TOF 질량 분광기로 질소 레이저에 의해 이온화하였다. $m/z(M+Na)^+$ 스펙트럼을 수집하였다.

표 20

이론적 글라이칸 분자량

글라이칸 구조	이론적 $m/z(M+Na)^+$
G1F	1647.58
G1	1501.53
GOF	1485.53
G0	1339.47
GOF-GN	1282.45
Man-5	1257.41

[0457]

[0458] BNJ441 뱃취에 대해 결정된 올리고사카라이드 백분율은 표 19에 기재되어 있다. 다양한 유형의 N 연결 올리고사카라이드에 대해 전체를 계산하였다: (전체 GOF, G1F), 산성, 고만노스, 중성, 모노시알릴화 및 다이시알릴화. N 연결 올리고사카라이드는 중성 올리고사카라이드를 오직 함유하였다. 중성 올리고사카라이드의 수준은 각각 엔지니어링 및 GMP 뱃취에 대해 99.99 및 100.0%이다. HPLC를 이용하여 올리고사카라이드를 검출하고, 정량적으로 크로마토그램을 평가하였다. 이 방법은 효소로 방출되고 형광으로 태그화된 올리고사카라이드의 보유 시간에 기초하여 약물 분자와 연관된 N 연결 올리고사카라이드를 확인함으로써 글라이코실화 패턴을 평가한다. 이 방법은 각각의 올리고사카라이드 종의 상대 풍부도를 제공한다. 간단히 말하면, 올리고사카라이드는 PNGase F에 의해 항체로부터 효소로 절단되고 안트라닐산에 의해 태그화되었다. HILIC 여과 단계를 이용하여 과량의 안트라닐산을 제거하였다. 샘플을 쇼와 덴코 아사이팩(Showa Denko Asahipak) 아미노 칼럼을 가지는 wAX-HPLC 시스템에 주입하고, 태그화된 올리고사카라이드를 형광 검출기(360nm 여기 및 420nm 방출)에 의해 검출하였다.

[0459] 모노사카라이드 백분율은 BNJ441 뱃취에 대해 결정되고, 표 19에 기재되어 있다. 형광 라벨링, 이어서 역상 고압 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 5개의 모노사카라이드(GlcNAc, GalNAc, 갈락토스, 만노스, 푸코스)에 대해 모노사카라이드 백분율을 결정하였다. 이 검정은 형광으로 표지된 모노사카라이드의 보유 시간에 기초하여 약물 분자와 연관된 모노사카라이드를 결정함으로써 글라이코실화 패턴을 규명한다. 간단히 말하면, 산 가수분해는 단백질로부터 이의 구성성분 모노사카라이드로 올리고사카라이드를 제거하였다. 이후, 유리 모노사카라이드를 환원 아미노화에 의해 안트라닐산(AA)으로 표지하였다. 이후, 샘플을 워터스 시메트리(Waters Symmetry) (등록상표) C-18을 가지는 칼럼 RP-HPLC 시스템에 주입하고, AA 태그화된 모노사카라이드를 형광 검출기(360nm 여기; 420nm 방출)에 의해 검출하였다. 샘플을 2중 시험하고, 보고된 값은 2개의 결과의 평균이었다.

[0460] 다음에, 본 발명자들은 시알산 N-아세틸뉴라민산(NANA) 및 N-글리콜릴뉴라민산(NGNA)을 결정하였다. 각각의 경우에, BNJ441 뱃취의 결정된 NANA 및 NGNA 시알산 함량은 표 19에 기재된 정량 한계보다 낮았다(6mmol/mol 미만). NGNA는 어느 한 뱃취에도 관찰되지 않았다. 형광 표지화 후 및 다점 보정을 이용하여 RP-HPLC에서 시알산을 측정하였다. 이 방법은 약물 분자와 연관된 시알산의 유형 및 상대 양을 결정함으로써 글라이코실화 패턴을 평가한다. 시알산을 황산수소나트륨과 항온처리함으로써 항체로부터 화학적으로 절단한 후, O-페닐렌다이아민에 의해 태그화하였다. 샘플을 벡만 C18 울트라스피어(Beckman C18 Ultrasphere) 칼럼을 가지는 RP-HPLC 시스템에 주입하고, 태그화된 시알산을 형광 검출기(230nm 여기; 425nm 방출)에 의해 검출하였다. 샘플을 2중 시

험하고, 2개의 결과의 평균이 보고되었다.

[0461] 각각의 BNJ441 뱃취의 결정된 T_m 값은 표 19에 기재된 바대로 67.0°C이다. 시차 주사 열량법(DSC) 스캔을 수행하고, 20°C로부터 95°C로 75°C/hr의 속도로 업스캐닝함으로써 마이크로-Ca1 VP-DSC를 이용하여 열량법 데이터를 획득하였다. 샘플 시험 전에 Y축 및 온도 보정을 수행하였다. Y축 편향 % 오차는 1% 미만이고, 전이 중간점은 28.2°C 및 75.9°C 둘 다의 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 의 인정 범위 내에 있다. 동일한 완충제 조성물 및 용적의 블랭크에 대해 샘플을 스캐닝하였다. DSC는 열 변성으로 인한 비풀딩의 엔탈피(ΔH)를 측정한다. 용액 중의 바이오분자는 네이티브(풀딩된) 입체구성과 이의 변성(비풀딩) 상태 사이의 평형에 있다. 전이 중간점(T_m)은 단백질의 50%가 이의 네이티브 입체구성에 있고 50%가 변성되는 온도이다. 각각의 샘플에 대한 T_m 은 블랭크 세포의 것과 비교하여 샘플 세포에서의 온도 구배에 걸쳐 ΔH 를 측정함으로써 결정된다.

[0462] BNJ441 엔지니어링 및 GMP 뱃취 재료에 대한 친화도(KD)는 우수한 피트(fit)로 각각 461pM 및 421pM이다. 각각의 BNJ441 뱃취의 결합 동역학은 표 19에 기재되어 있다. 인간 C5에 대한 항-C5 항체(BNJ441)의 결합 동역학을 평가하기 위해 표면 플라스몬 공명(비아코어 3000)을 이용하였다. 센서그램이 도시되어 있지 않다. 항-Fc 인간 포획 방법을 이용하여 C5에 대한 BNJ441의 동역학을 결정하였다. 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 0.1mg/ml로 희석된 항-Fc-인간(KPL 01-10-20호)을 아민 커플링에 의해 8분 동안 CM5 칩의 2개의 유세포에 부동화하였다. 항-C5 항체(BNJ441)를 실행 완충제(HBS-EP, 0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% P20(pH 7.4)) 중에 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하였다. 이후, 희석된 항체를 다른 유세포에 주입한 후, 유세포 둘 다에 C5(0.19-6nM)를 주입하였다. 2차 유세포를 기준으로서 사용하였다. 표면을 20mM HCl, 0.01% P20(100 $\mu\text{l}/\text{분}, 200\mu\text{l}$ 주사)에 의해 매회 재생하였다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1을 이용하여 1:1 랭귀어 모델에서 데이터를 처리하였다.

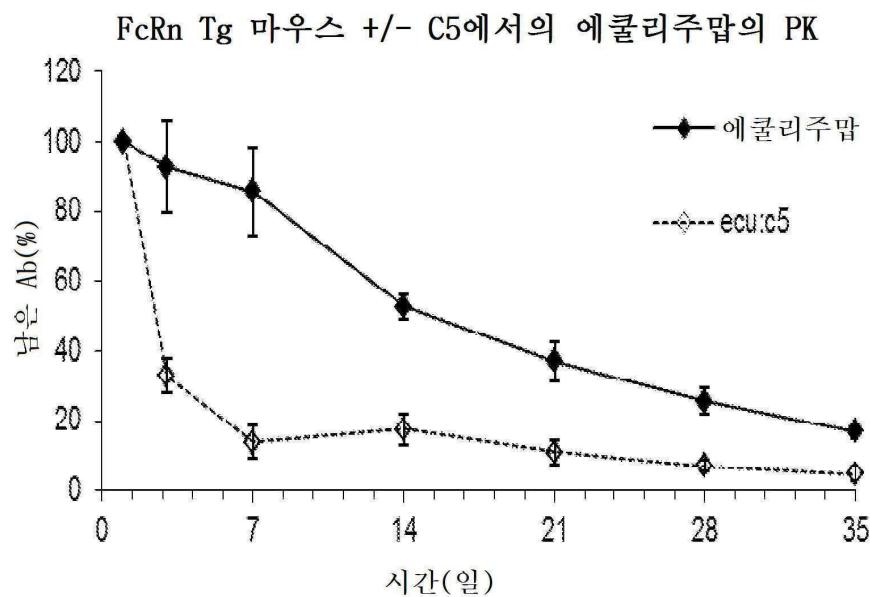
[0463] BNJ441 엔지니어링 및 GMP 뱃취 재료의 자가 결합에 대한 친화도(KD)는 각각 7.1mM 및 0.27mM이었다. 표 19를 참조한다. 빈약한 피트는 BNJ441 엔지니어링 및 GMP 뱃취 재료 둘 다에 관찰된 낮은 수준의 결합으로 인하고, 자가 결합 및 측정된 친화도는 기기의 검출 한계의 수준보다 낮았다. 낮은 수준의 자가 결합은 제조능력 및 궁극적으로 환자에 대한 투여를 위해 유리하다. 센서그램이 도시되어 있지 않다. 항-C5 항체(BNJ441)의 자가 결합 동역학을 평가하기 위해 표면 플라스몬 공명(비아코어 3000)을 이용하였다. BNJ441의 자가 결합 동역학을 항체(BNJ441)의 직접적인 부동화에 의해 결정하였다. BNJ441을 10mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 대략 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고, 아민 커플링에 의해 2000RU를 얻기 위해 CM5 칩의 하나의 유세포에 부동화하였다. 2차 유세포를 기준으로서 사용하였다. 이후, 항-C5 항체, BNJ441(실행 완충제 중 1.6 내지 50 μM , HBS-EP, 0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% P20(pH 7.4))의 희석액을 유세포 둘 다에 주입하였다. 빈약한 결합으로 인해 재생이 필요하지 않았다. '이중 리퍼런싱'에 의해 비아이밸류에이션 4.1을 이용하여 정상 상태 친화도 모델에 의해 데이터를 처리하였다.

[0464] BNJ441의 물리화학적 규명은 엔지니어링 및 GMP 뱃취를 사용하여 수행되고, 항체에 대한 아미노산 서열과 일치하는 것으로 나타났다. 이 실시예에 요약된 물리화학 데이터는 순도, 문자 크기, 동일성, 구조, 글라이코실화, 열안정성, 동역학 및 자기 결합을 포함하는 일련의 특성을 포함하고, BNJ441 벌크 약물 기질의 규명을 위한 기준으로서 작용하는 것으로 기대된다.

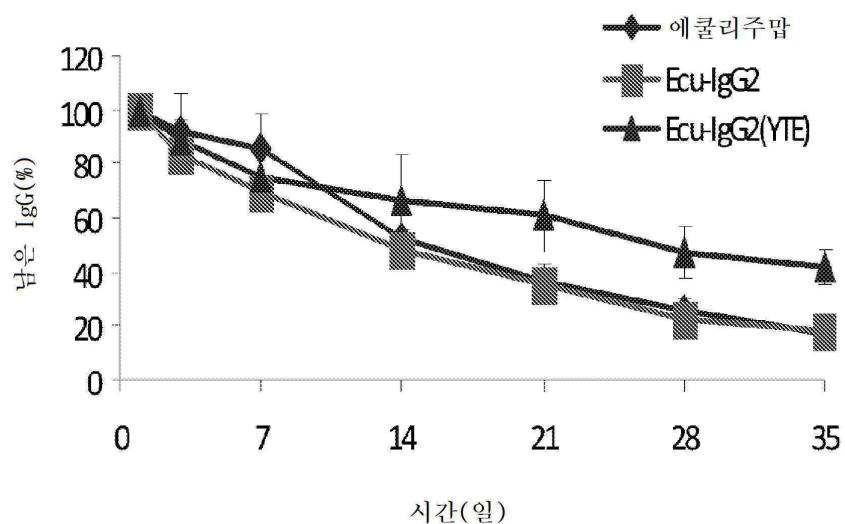
[0465] 본 개시내용이 이의 구체적인 실시형태를 참조하여 기재되어 있지만, 본 개시내용의 진정한 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변경이 이루어질 수 있고, 균등물이 치환될 수 있는 것으로 당해 분야의 당업자에 의해 이해되어야 한다. 또한, 본 개시내용의 객관적인 정신 및 범위에 특정한 상황, 재료, 물질의 조성물, 공정, 공정 단계 또는 단계를 적용하기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 모든 이러한 변형은 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

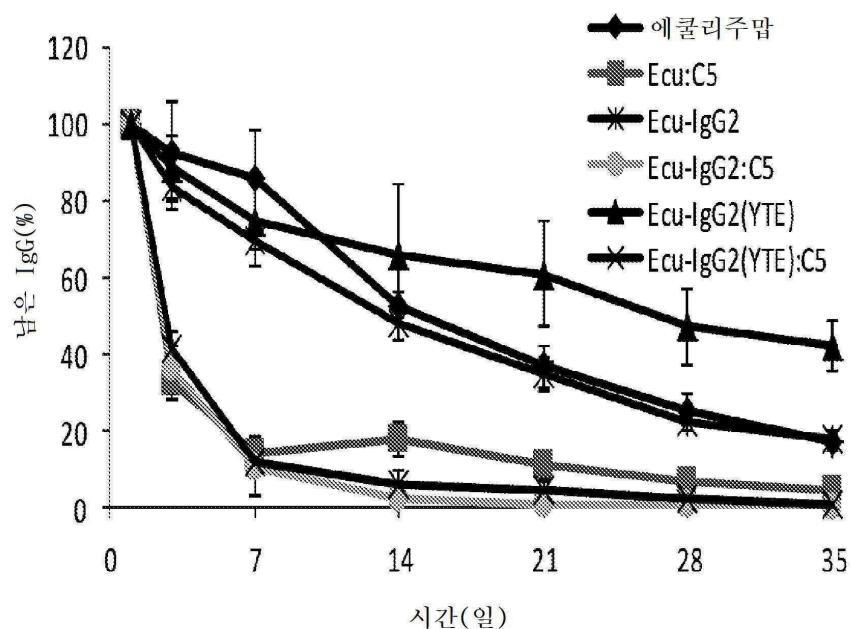
도면1



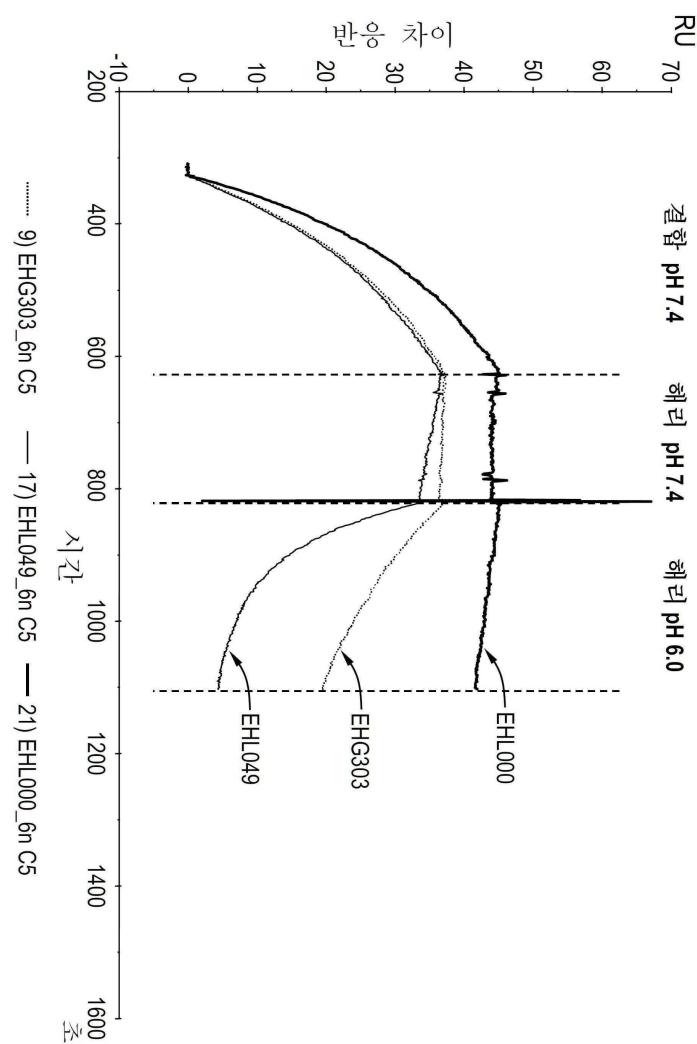
도면2



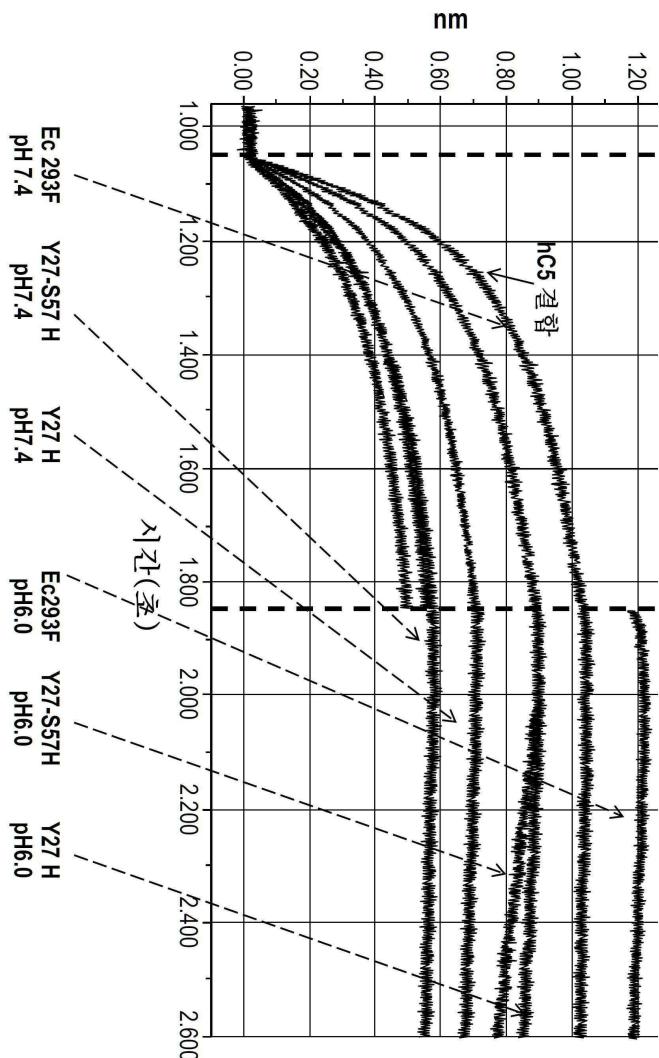
도면3



도면4

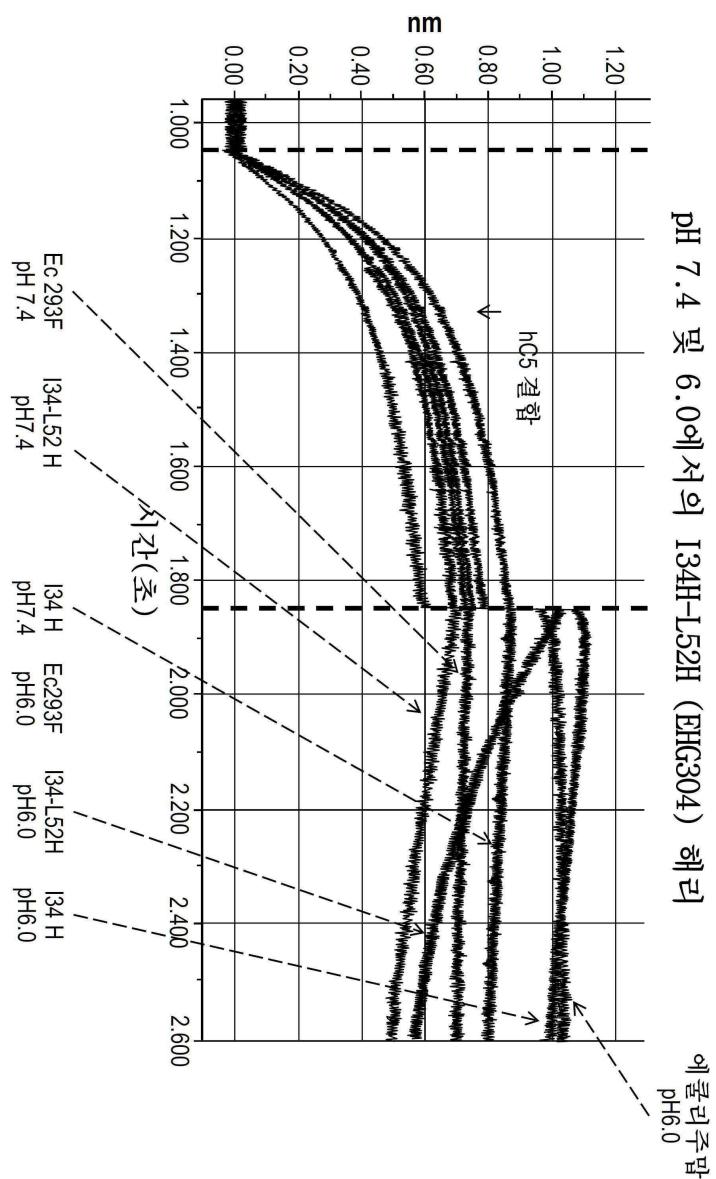


도면5a

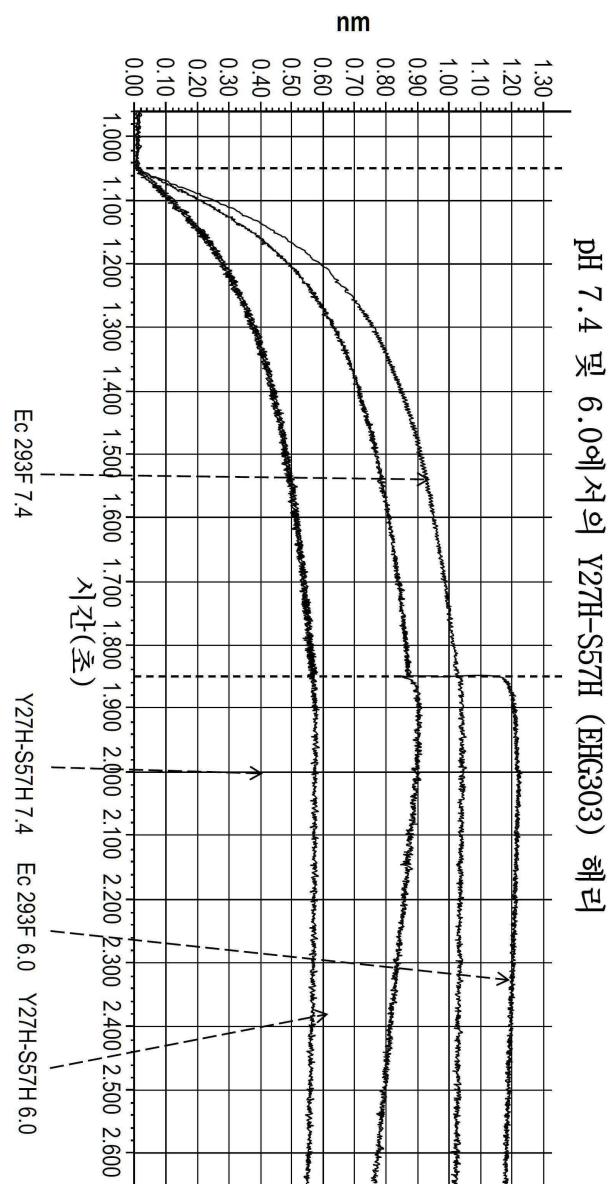


7.4 및 6.0에서의 Y27H-S57H (EHG303) 해리

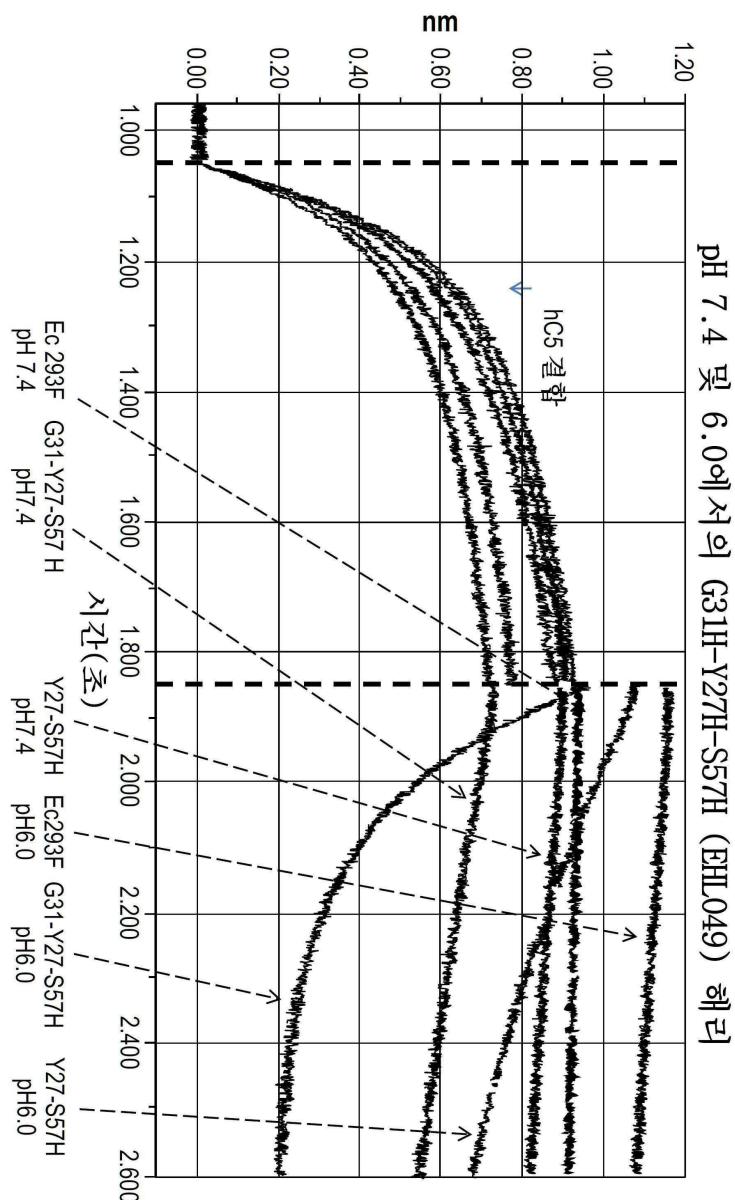
도면5b



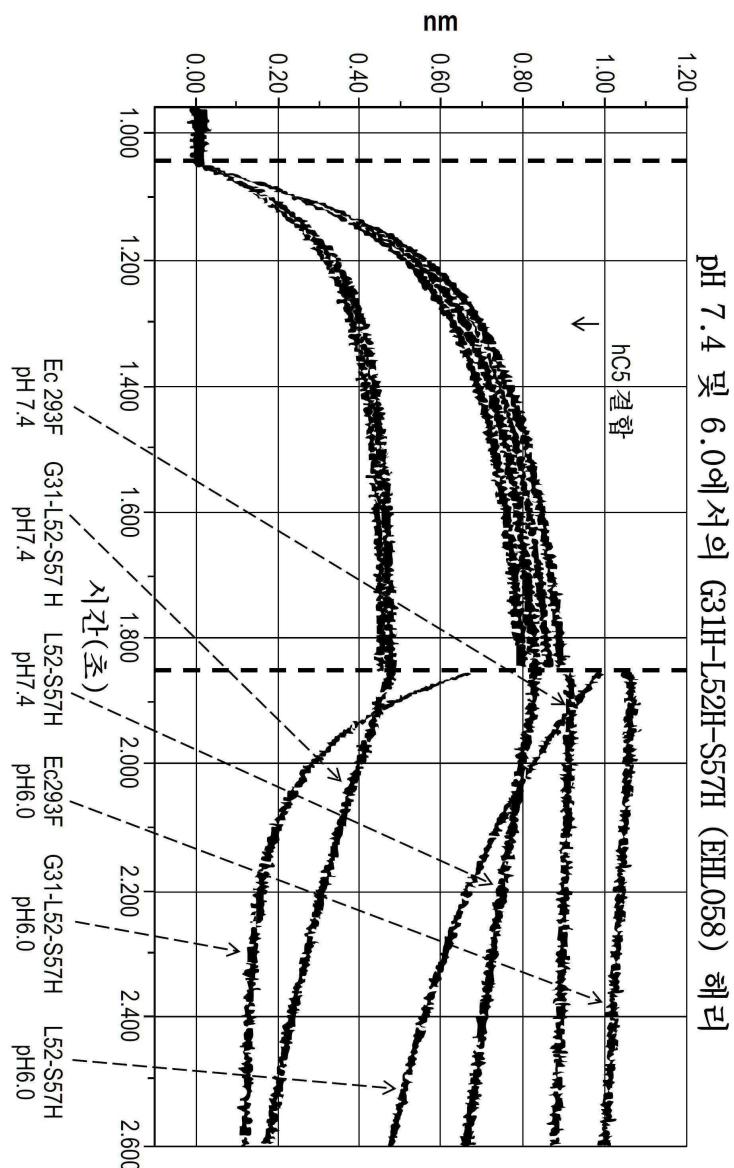
도면5c



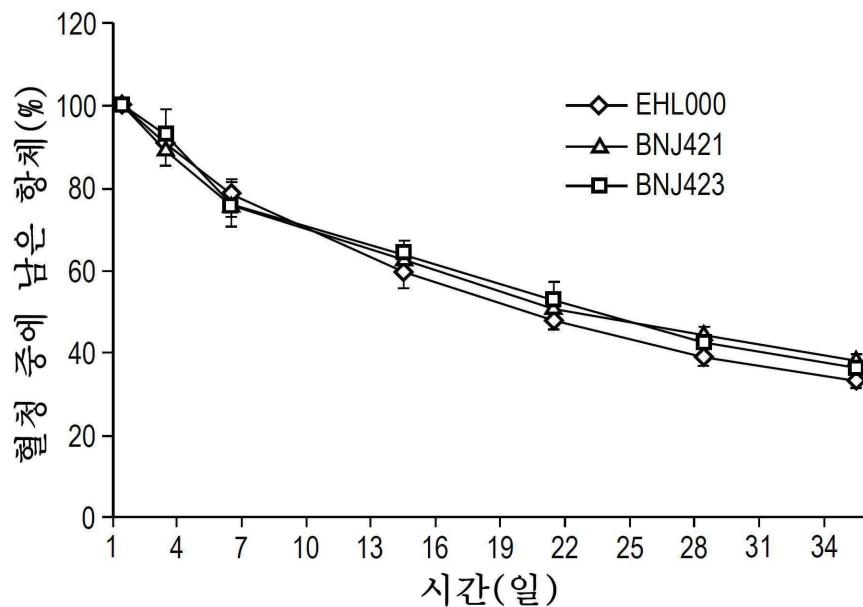
도면5d



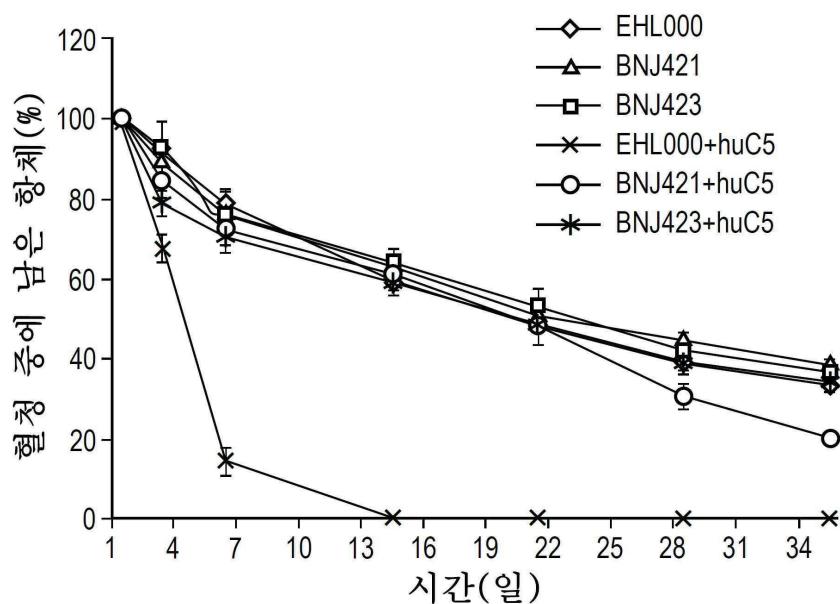
도면5e



도면6

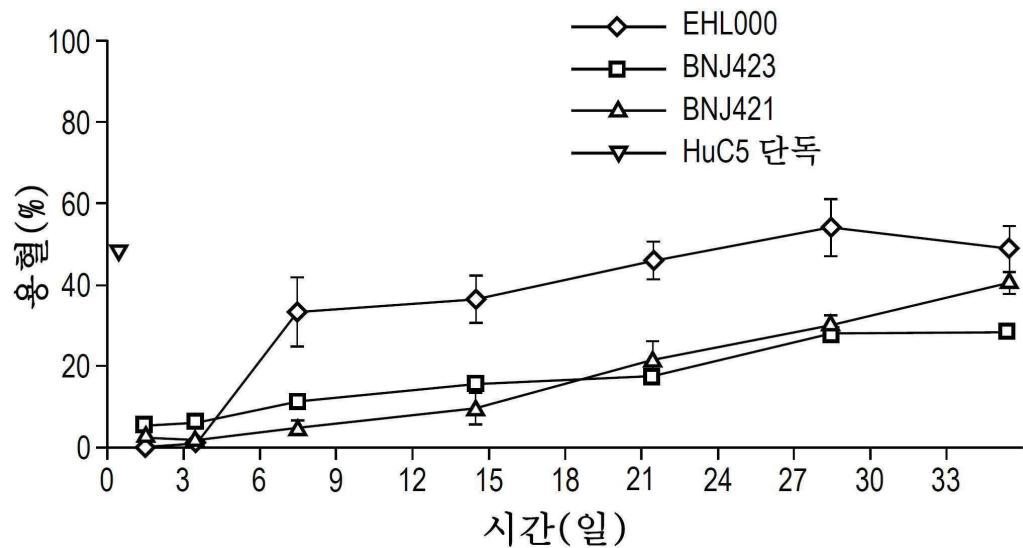


도면7

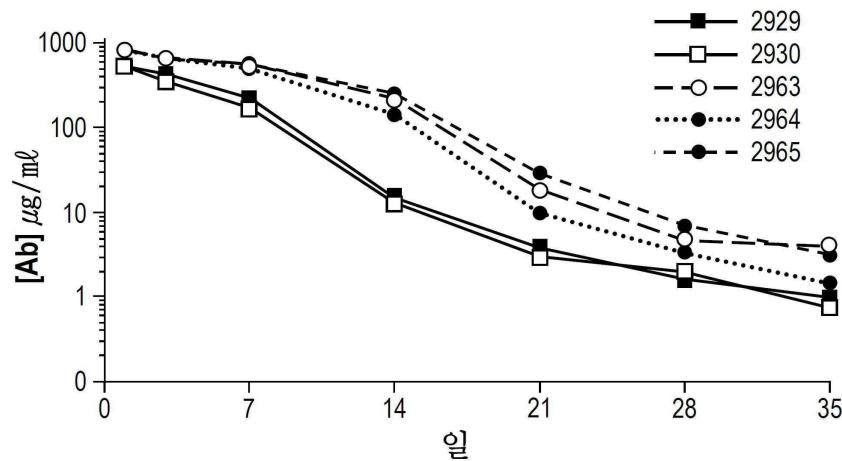


도면8

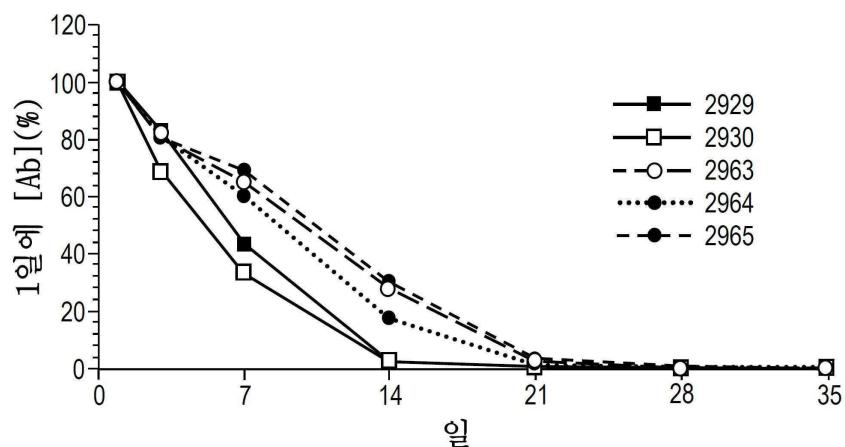
용혈 - 생체외



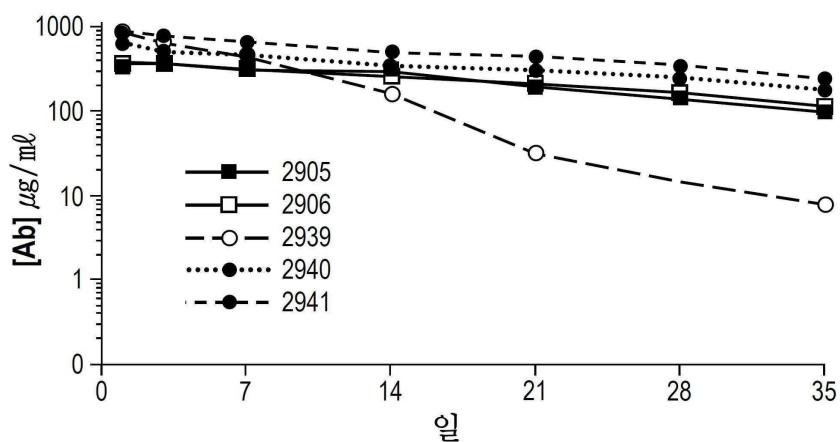
도면9a



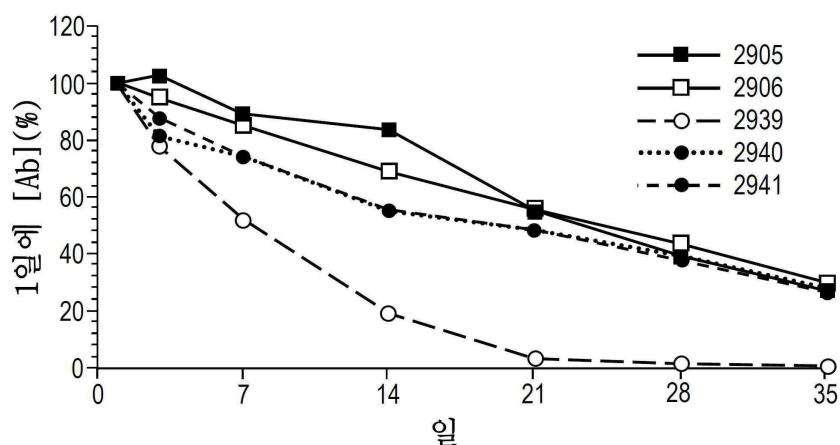
도면9b



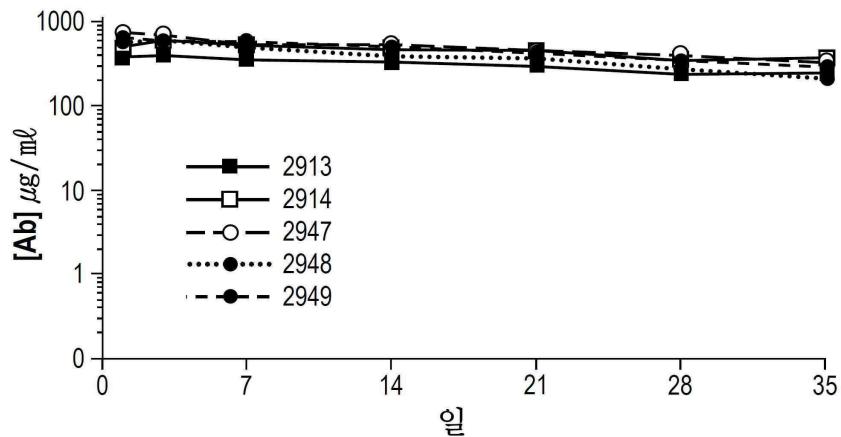
도면10a



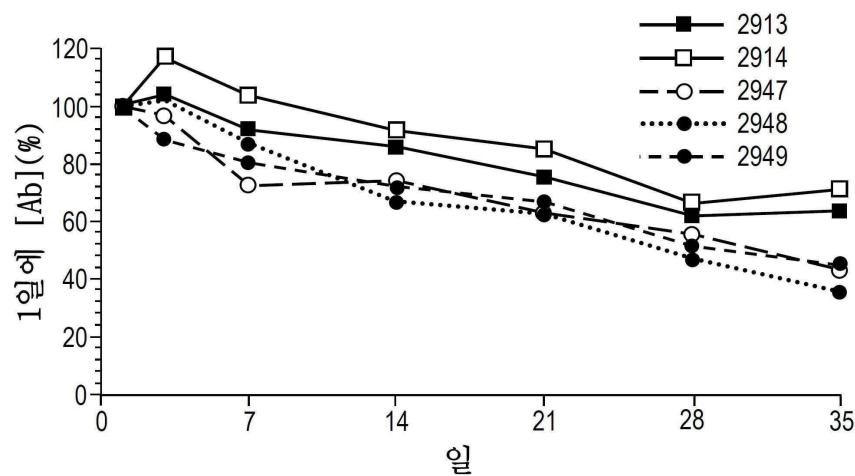
도면10b



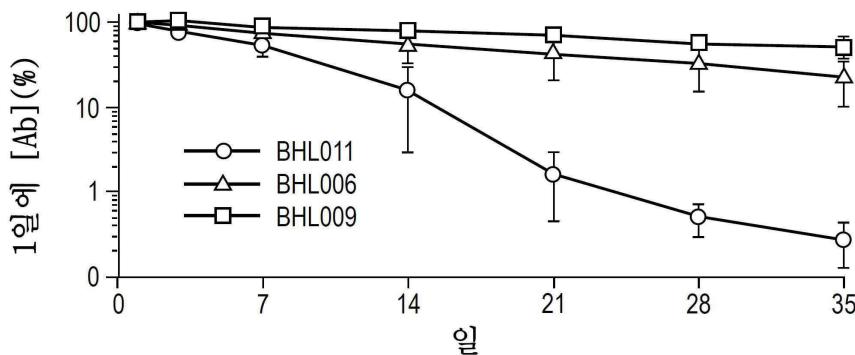
도면11a



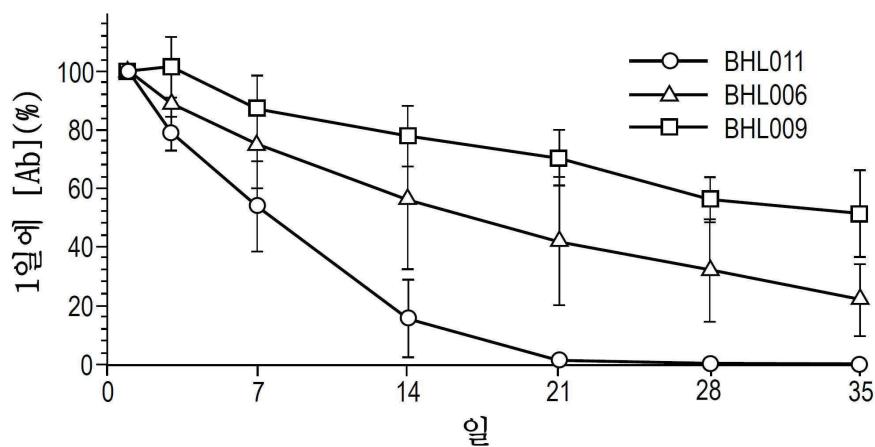
도면11b



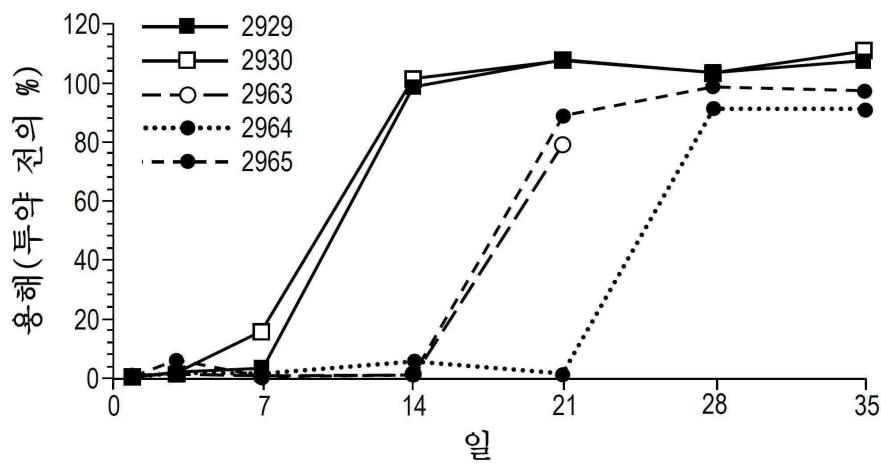
도면12



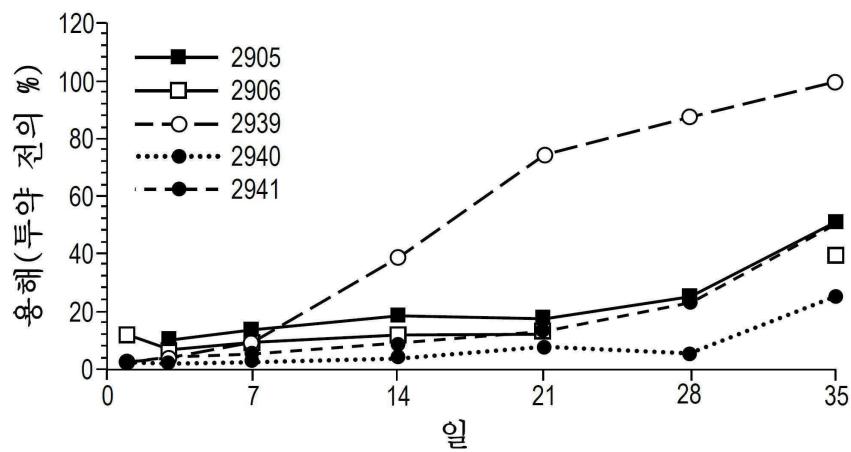
도면13



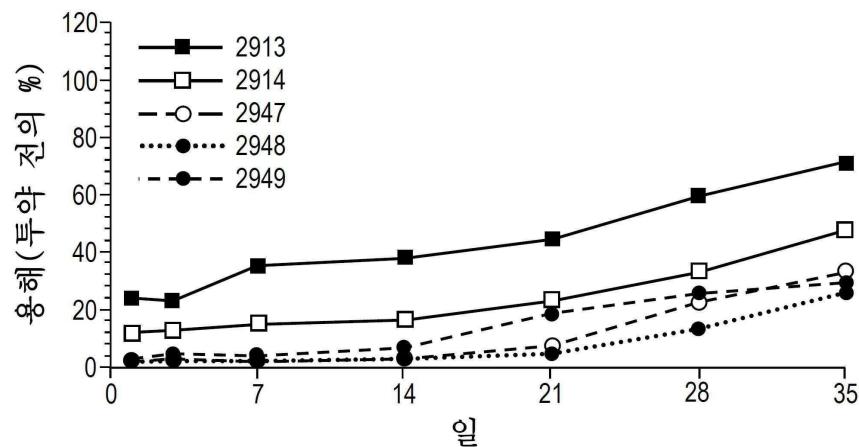
도면14



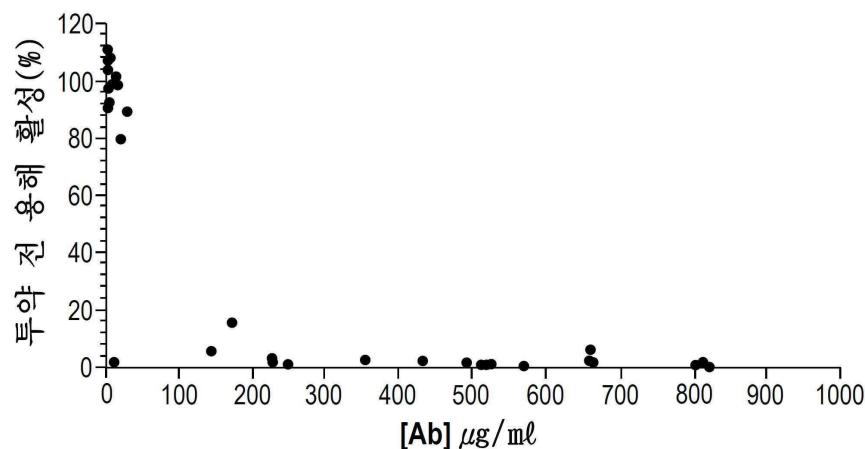
도면15



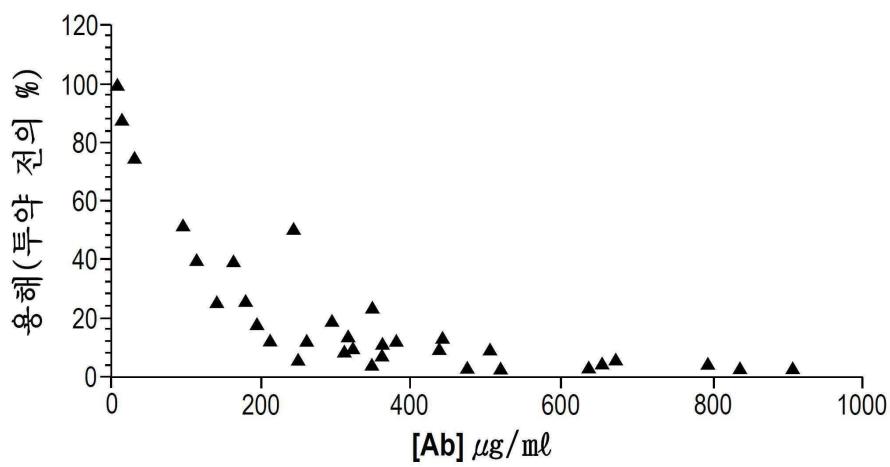
도면16



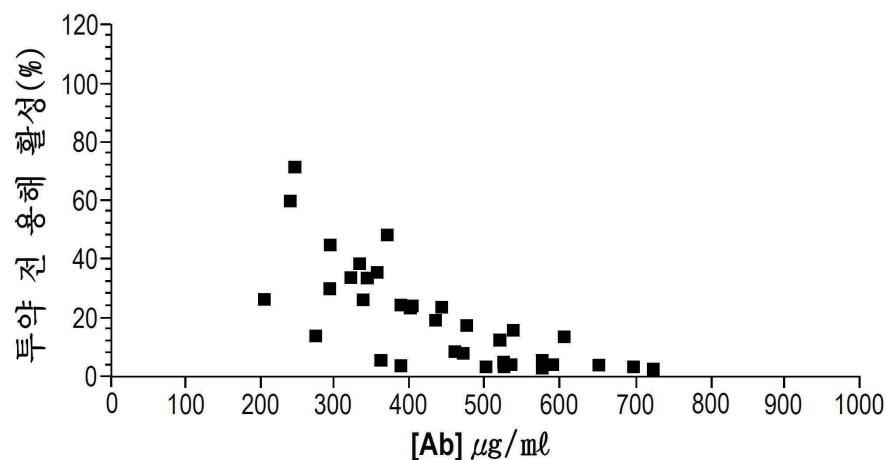
도면17



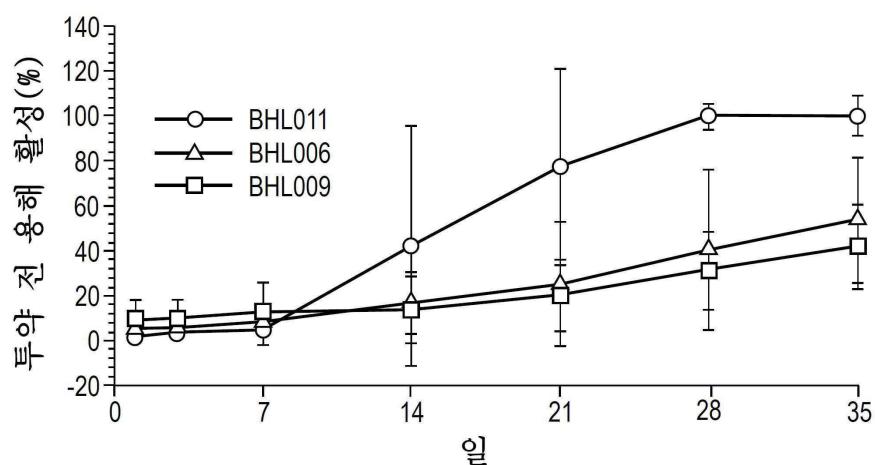
도면18



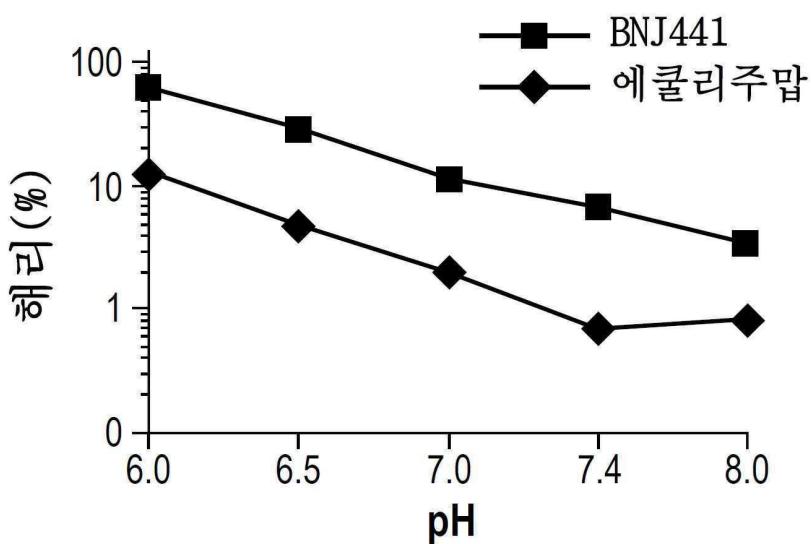
도면19



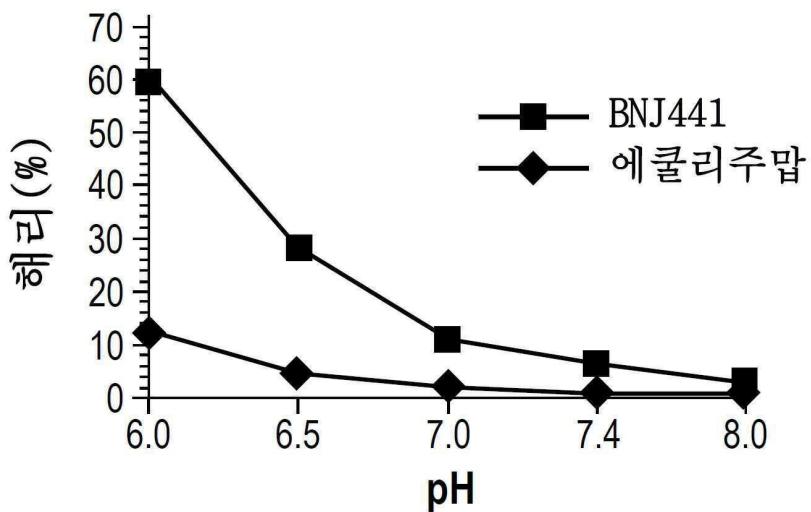
도면20



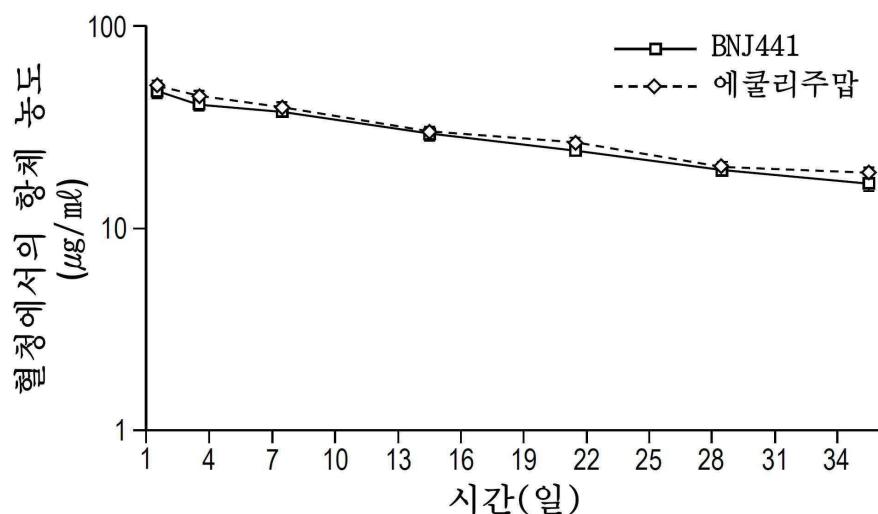
도면21a



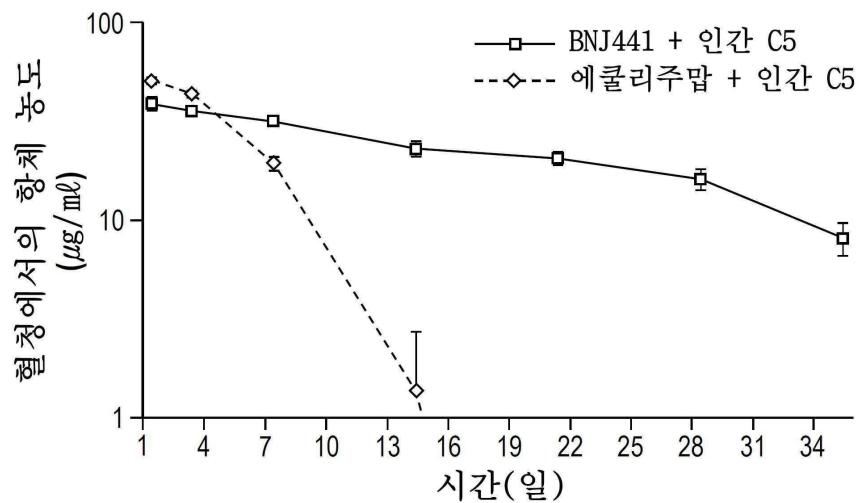
도면21b



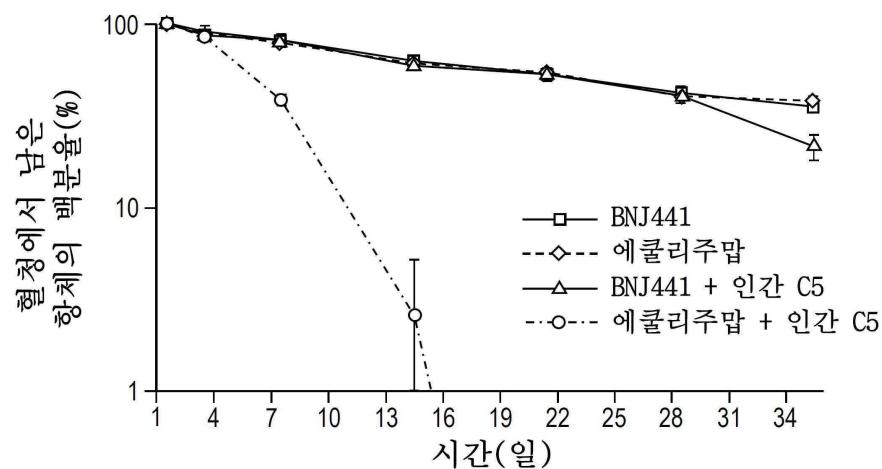
도면22



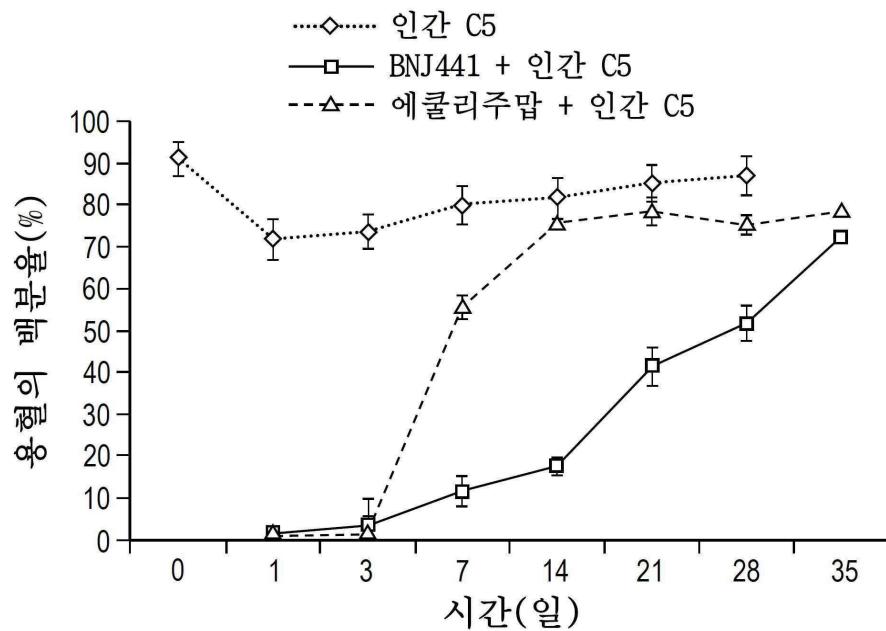
도면23



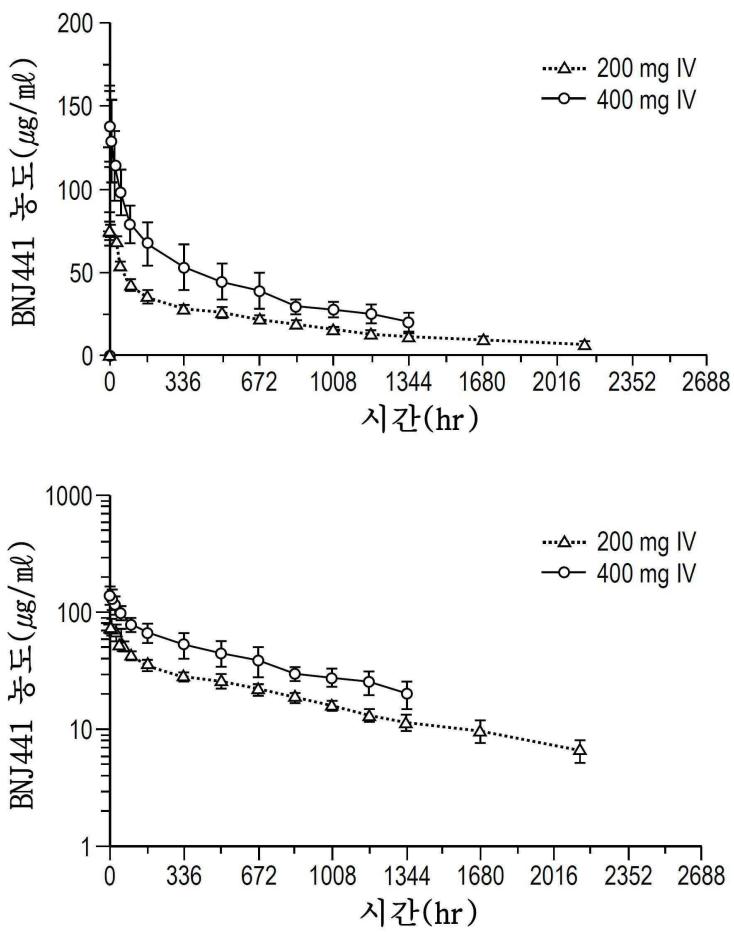
도면24



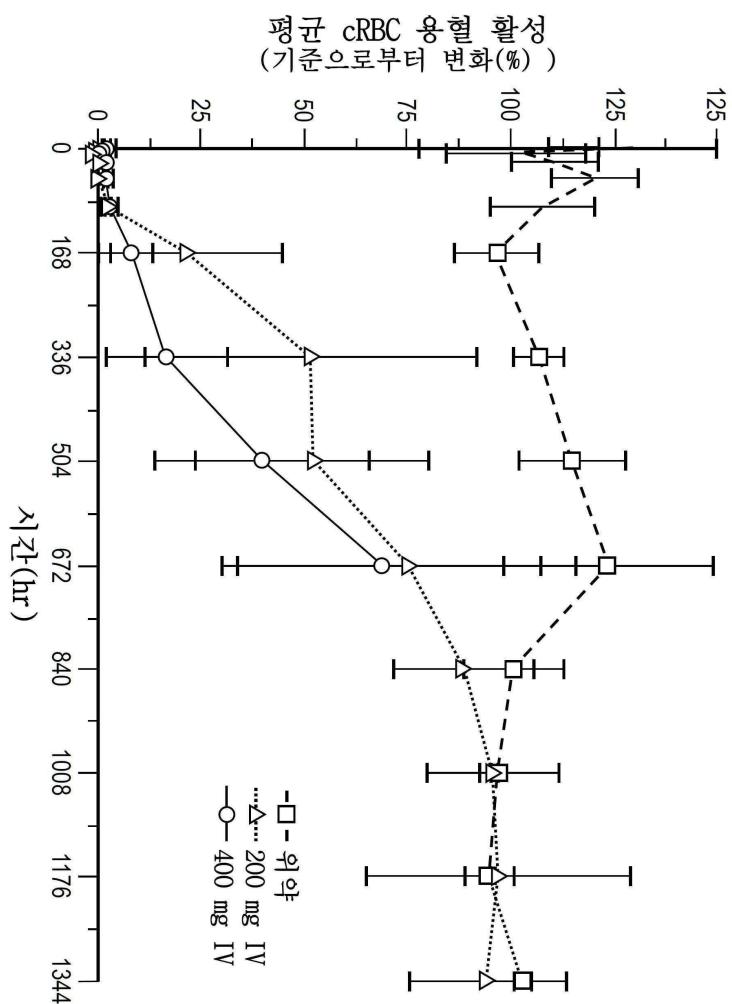
도면25



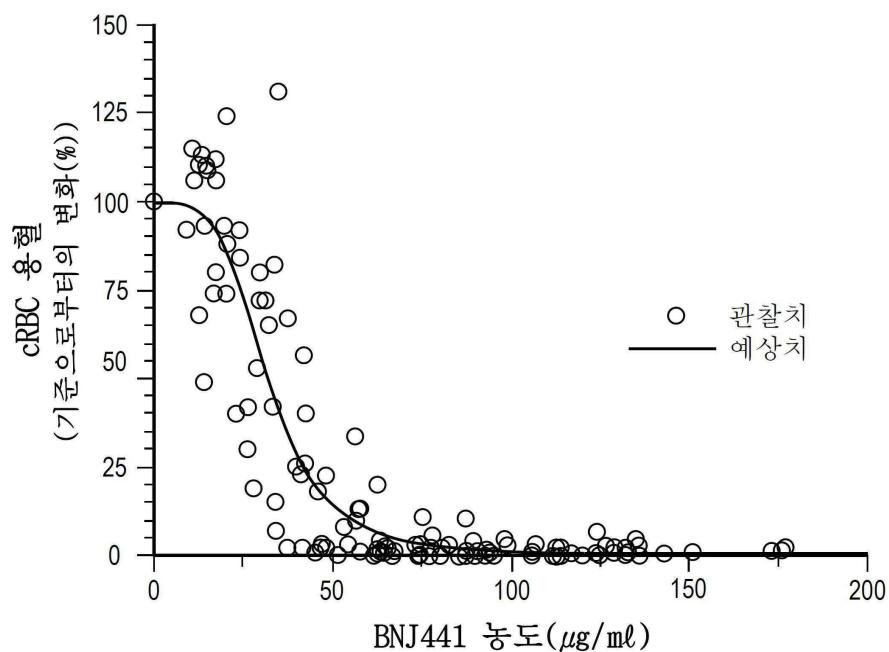
도면26



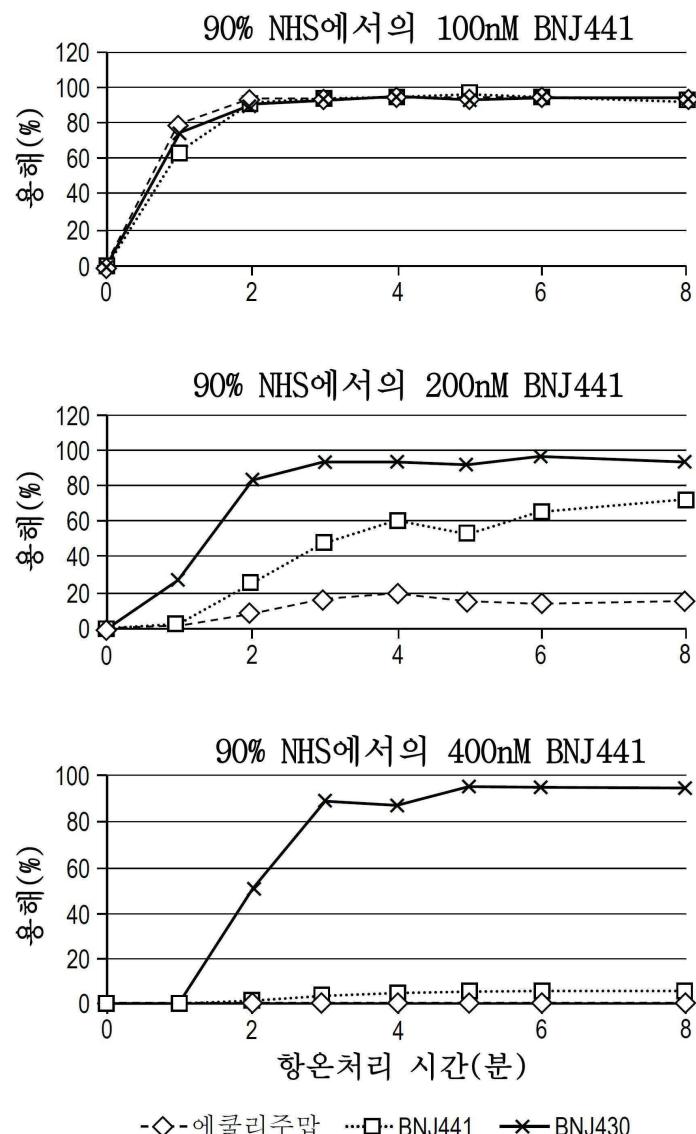
도면27



도면28

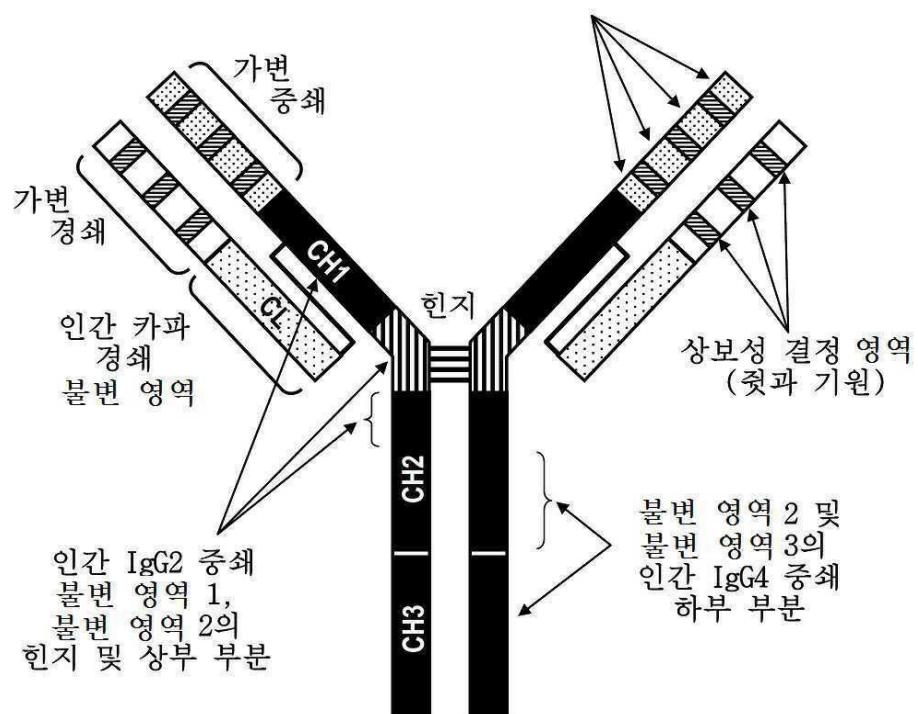


도면29

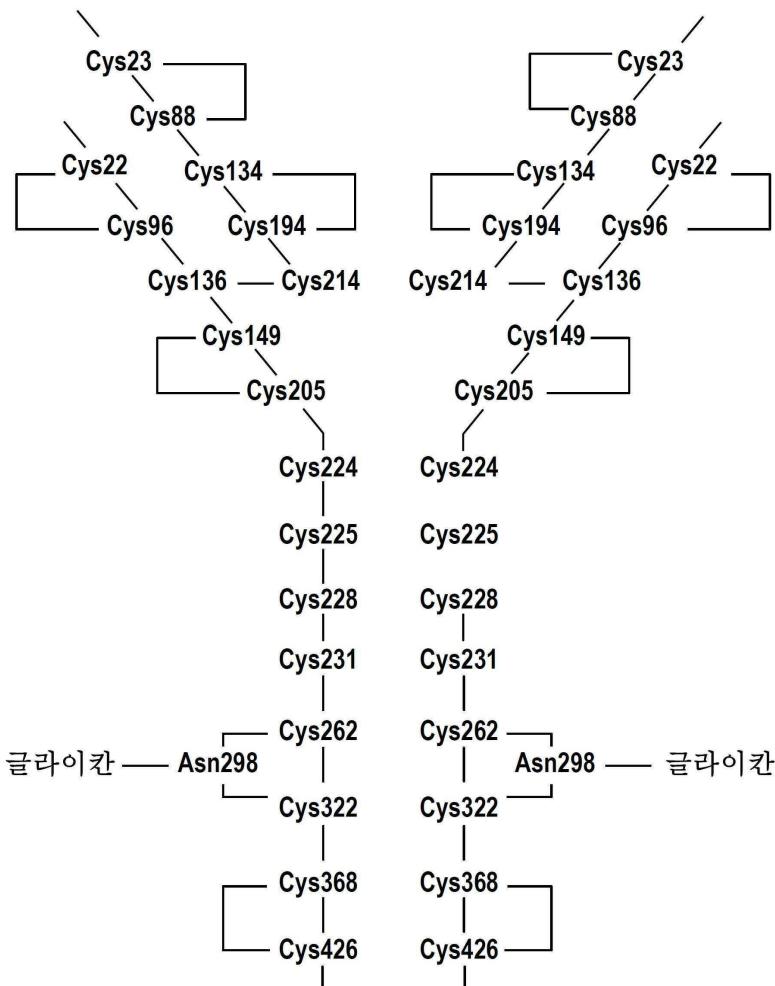


도면30

인간 프레임워크 영역



도면31



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ANTI-C5 ANTIBODIES HAVING IMPROVED PHARMACOKINETICS

<130> AXJ-186PC

<140><141><150> 61/949,932

<151> 2014-03-07

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 4

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 5

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 6

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 6

Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe			
50	55	60	
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 8			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 8			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 10

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 210 215 220
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 11		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"		

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 12

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

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

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys

210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
435	440	445	
<210> 15			
<211> 326			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 15			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	

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

115

120

125

Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130

135

140

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

145

150

155

160

Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165

170

175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180

185

190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245

250

255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 16

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1															
	5							10							15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ser	Asn	Tyr
	20								25						30

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

Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Glu	Asn	Phe
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65															80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85								90							95

Ala	Arg	Tyr	Phe	Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
100									105						110

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
115								120							125
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
130															
135															140

Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145								150							160

Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
165									170						175
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
180									185						190
Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
195															205
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys

210	215	220
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg		
245	250	255
Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
320		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp		
385	390	395
400		
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 17		
<211> 11		

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 17

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr His Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr His Ala

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag"

<400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Gly His Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln

1 5 10

<210> 24

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24

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

1 5 10 15

Val His Ser Leu Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His

35 40 45

Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Glu

65	70	75	80
Tyr Thr Glu Asn Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser			
85	90	95	
Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp			
115	120	125	
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
130	135	140	
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser			
145	150	155	160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
165	170	175	
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
180	185	190	
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
195	200	205	
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr			
210	215	220	
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr			
225	230	235	240
Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro			
245	250	255	
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
260	265	270	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
275	280	285	
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
290	295	300	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser			
305	310	315	320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 340 345 350
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Gly Lys
 465
 <210
 > 25
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 25
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu

100 105 110

Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 26

<211

> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 26

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

1 5 10 15

Val His Ser Leu Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His

35 40 45

Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Glu

65 70 75 80

Tyr Thr Glu Asn Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp

115 120 125

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

130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr

210 215 220

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

325	330	335
-----	-----	-----

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

370	375	380
-----	-----	-----

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405	410	415
-----	-----	-----

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

420	425	430
-----	-----	-----

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

435	440	445
-----	-----	-----

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

450	455	460
-----	-----	-----

Leu Ser Leu Gly Lys

465

<210> 27

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 27

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

1	5	10	15
Val His Ser Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
20	25	30	
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn			
35	40	45	
Ile Tyr His Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
50	55	60	
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser			
65	70	75	80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
85	90	95	
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu			
100	105	110	
Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
115	120	125	
Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 28

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

Val His Ser Leu Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

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

35 40 45

Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu

65 70 75 80

Tyr Thr Glu Asn Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp

115 120 125

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

130	135	140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser		
145	150	155
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
165	170	175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
180	185	190
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
195	200	205
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr		
210	215	220
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr		
225	230	235
240		
Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro		
245	250	255
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
275	280	285
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
305	310	315
320		
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser		
340	345	350
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
370	375	380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Leu Ser Leu Gly Lys

465

<210> 29

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 29

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

1 5 10 15

Val His Ser Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu

100 105 110

Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 30

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 30

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln

85 90 95

His Leu Ser His Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 31

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

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

Gly Val Ile Asp Pro His Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 32		
<211> 219		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"		

<400> 32

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

<210> 33

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asp Pro His Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys

210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu

420 425 430

His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 34

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
85 90 95Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 35

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys

210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445