



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0126054
 (43) 공개일자 2016년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7026580
- (22) 출원일자(국제) 2015년02월25일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년09월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/017578
- (87) 국제공개번호 WO 2015/130826
 국제공개일자 2015년09월03일
- (30) 우선권주장
 61/945,613 2014년02월27일 미국(US)
 61/947,880 2014년03월04일 미국(US)

- (71) 출원인
알러간, 인코포레이티드
 미합중국92612
 캘리포니아얼바인두폰트드라이브2525
- (72) 발명자
리양, 옌뎨
 미합중국 캘리포니아주 92602, 얼바인, 퍼시픽 크
 레스트 57
리, 첸
 미합중국 캘리포니아주 92618, 얼바인, 채드윅 25
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최경준

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **보체 인자 Bb 항체**

(57) 요약

본 개시내용은 보체 경로의 활성을 예방하거나, 제어하거나, 감소시키기 위해 사용될 수 있는 항체 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용은 보체 인자 Bb에 의해 매개되거나 이를 수반하는 질환을 진단하고 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 개시내용은 항-보체 인자 Bb 항체에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

리, 아이리스

미합중국 캘리포니아주 91011, 라 캐나다, 햄프턴
로드 4811

구즈만, 빅터 엠.

미합중국 캘리포니아주 92705, 산타 아나, 에이피
티. 디, 에스. 맨틀 라인 1013

명세서

청구범위

청구항 1

인자 Bb 항체로서, 인자 B에보다 더 큰 친화도로 인자 Bb에 결합하고; 보체 의존적 용혈을 저해하는, 인자 Bb 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 약 1nM 미만의 Kd로 인자 Bb에 결합하는, 인자 Bb 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 환자에서 막 공격 복합체(membrane attack complex: MAC)의 형성을 차단하는, 인자 Bb 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 중쇄 및 경쇄를 포함하는, 인자 Bb 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 경쇄는 서열 번호 8 내지 11로 이루어진 균으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 상기 중쇄는 서열 번호 12 내지 15로 이루어진 균으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인자 Bb 항체.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 경쇄는 서열 번호 24 내지 27로 이루어진 균으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 상기 중쇄는 서열 번호 28 내지 31로 이루어진 균으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인자 Bb 항체.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 서열: 서열 번호 8/서열 번호 12; 서열 번호 8/서열 번호 13; 서열 번호 8/서열 번호 14; 서열 번호 8/서열 번호 15; 서열 번호 9/서열 번호 12; 서열 번호 9/서열 번호 13; 서열 번호 9/서열 번호 14; 서열 번호 9/서열 번호 15; 서열 번호 10/서열 번호 12; 서열 번호 10/서열 번호 13; 서열 번호 10/서열 번호 14; 및 서열 번호 10/서열 번호 15; 서열 번호 11/서열 번호 12; 서열 번호 11/서열 번호 13; 서열 번호 11/서열 번호 14; 및 서열 번호 11/서열 번호 15로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체인, 인자 Bb 항체.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 항체는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열: 서열 번호 24/서열 번호 28; 서열 번호 24/서열 번호 29; 서열 번호 24/서열 번호 30; 서열 번호 24/서열 번호 31; 서열 번호 25/서열 번호 28; 서열 번호 25/서열 번호 29; 서열 번호 25/서열 번호 30; 서열 번호 25/서열 번호 31; 서열 번호 26/서열 번호 28; 서열 번호 26/서열 번호 29; 서열 번호 26/서열 번호 30; 및 서열 번호 26/서열 번호 31; 서열 번호 27/서열 번호 28; 서열 번호 27/서열 번호 29; 서열 번호 27/서열 번호 30; 및 서열 번호 27/서열 번호 31로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체인, 인자 Bb 항체.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 11의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 15의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함하는 항체인, 인자 Bb 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 재조합 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 이중 특이적 항체, 또는 이의 항체 단편인, 인자 Bb 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 다이아바디 또는 단쇄 항체 분자인, 인자 Bb 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 유형인, 인자 Bb 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체는 라벨링 그룹에 커플링된, 인자 Bb 항체.

청구항 14

제1항의 단리된 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 항체를 분비하는 숙주 세포로부터 상기 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 제1항의 단리된 항체를 제조하는 방법.

청구항 15

제1항의 단리된 항체를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 16

제1항의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 추가적인 활성제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

유효량의 제1항의 항체를 상기 환자에게 투여하는 단계; 및 이로써 상기 병태를 치료하는 단계를 포함하는, 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 병태는 눈 질환인, 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 병태는 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration: AMD)인, 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하거나 예방하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2014년 2월 27일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/945,613호, 및 2014년 3월 4일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/947,880호(이들 둘 다 본 명세서에 참고로 그 전문이 인용됨)로부터의 우선권을 주장한다.

[0003] 발명의 기술분야

[0004] 본 개시내용은 항-보체 항체 및 이의 조성물, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 항체의 제조를 위한 발현 벡터 및 숙주 세포, 및 보체에 의해 매개되는 질환을 진단하고 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

인자 B 및 인자 Bb 관련 질환, 특히, 연령 관련 황반 변성(Age-Related Macular Degeneration: AMD)을 진단하고 치료하는 데 사용하기 위한 항-인자 B 및 항-인자 Bb 항체가 구체적으로 개시되어 있다.

배경 기술

- [0005] 보체 시스템은 숙주 방어, 외래 재료의 흡소닌화 및 조직 항상성의 초기 단계를 제공하는 선천성 면역계의 일부로서 작용하는 거의 50개의 개별 단백질로 이루어진다(Ricklin D., 2010, Complement: a Key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature: Immunology*, 785-795). 보체 시스템은 모든 다세포 유기체에서 발견되고, 계통발생적으로 적응 면역계의 형성보다 앞선다(Zarkadis I.K., 2001 Phylogenetic aspects of the complement system. *Development and Comparative Immunology*, 745-762).
- [0006] 보체 시스템의 활성화는 전통적인 경로, 렉틴 경로 및 대안적인 경로의 3개의 1차 경로를 따라 발생한다. 활성화 과정 동안 순차적 단백질-단백질 상호작용 및 단백질분해 활성화는 C3 및 C5 전환효소를 생성시킨다. 이 전환효소는 흡소닌화, 아나필라톡신의 생성 및 막 공격 복합체(membrane attack complex: MAC)의 형성에 중요한 보체 캐스케이드의 이펙터 분자를 나타내는 보체 활성화와 분할 생성물의 생성을 담당한다. 이들 중 후자는 보체 캐스케이드의 용해 활성화에 필수적이다(Ricklin D., 2010). 일반 조건 하에, 보체 캐스케이드의 활성화는 병원균 박테리아에 대한 방어, 및 이환된 및 손상된 조직의 청소를 제공한다. 일반적으로, MAC의 형성은 CFH, CFH 관련 단백질, C4BP, CD46, CD55, CD59 및 보체 인자 I(complement factor I: CFI)를 포함하는 세포 표면 및 가용성 조절 성분의 존재로 인해 주변 조직에 영향을 미치지 않는다. 그러나, 과도한 활성화가 발생할 때 또는 보체 음성 조절 성분을 생성하는 것이 실패할 때, 급성 및 만성 질환 상태 둘 다가 유도된다. 비조절 보체 활성화가 인간 병리학에 대한 원인으로서 인식되는 예는 사구체신염, 전신 홍반성 낭창, 발작 야간혈색소 뇨증, 알츠하이머, 유전성 혈관부종, 중증 근무력증 및 연령 관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration: AMD)을 포함한다(Ricklin & Lambris, 2013, Complement in Immune and inflammatory Disorders: Pthaeological Mechanisms. *Journal of Immunology*, 3831-3838).
- [0007] 보체 인자 B는 단백질 폴립타이드로서 혈액 중에 순환하는 단백질이다. 대안적인 경로의 활성화 시, 인자 B(거의 750개의 aa)는 보체 인자 D에 의해 절단되어서, 더 작은 비촉매 사슬 Ba(약 230개의 aa; 3개의 보체 제어 단백질(complement control protein: CCP) 도메인을 포함) 및 더 큰 촉매 하위단위 Bb(약 510개의 aa; 단백질 상호작용 도메인 및 세린 프로테아제 도메인을 포함)의 2개의 폴립타이드를 생성한다. 인자 Bb는 대안적인 경로의 C3 전환효소를 형성하도록 C3b과 회합하는 세린 프로테아제, 및 C5 단백질을 C5a 및 C5b로 절단하는 C5 전환효소인, 제2 프로테아제이다. 절단 생성물 C5b는 막 공격 경로를 저해하여서, 막 공격 복합체(membrane attack complex: MAC)를 생성한다. MAC는 표적 병원균의 삼투 용해를 발생시키는 막관통 채널이다. 따라서, 인자 B의 절단 및 인자 Bb의 생성은 보체 과정을 돕는다.
- [0008] 인자 B는 치밀하게 규제되는 매우 특이적인 세린 프로테아제이다. 이의 활성화 형태에서, 이것은 염증성 반응, 세포 용해, 식균작용 및 B 세포 자극을 개시시키는 보체 활성화의 중추적인 증폭을 촉매화한다(Carroll et al., *Nat. Immunol.* 5:981-986 (2004)). 인자 B는 어셈블리 과정을 통해 활성화되고: 이것은 단편 Ba(1-234번 잔기; 인자 Ba, 단편 Ba, 보체 인자 Ba) 및 Bb(235-739번 잔기; 인자 Bb, Bb 단편, 보체 인자 Bb)로 인자 B에 의해 절단된 후 표면 결합 C3b, 또는 이의 유체 상 대응물 C3(H₂O)에 결합한다. 단편 Ba는 복합체로부터 해리되어서, 대안적인 경로 C3 전환효소 복합체 C3b-Bb를 남기고, 이것은 C3을 C3a 및 C3b로 남긴다.
- [0009] 연령 관련 황반변성(AMD)은 개발도상국에서 노인의 실명의 주요 원인이다. US 집단에서만, 실명과 연관된 AMD의 진행된 형태의 발병률은 거의 200만 명의 개인에서 발생한다. 중간 AMD를 가지는 또 다른 700만 명의 개인은 AMD의 진행된 형태의 발생에 대한 고위험에 있다. 유럽 집단이 포함은 영향받은 개인의 수의 거의 2배이다. AMD는 신경망막, 및 망막색소상피세포(retinal pigmented epithelium: RPE) 및 맥락막모세혈관층을 포함하는 지지 조직의 진행성 퇴행을 발생시키는 부염증성 과정의 원인이 되는 진행성 실명을 특징으로 한다. 대부분의 임상적으로 유의적인 실명은 신경퇴행성 변화가 미세한 시력을 담당하는 눈의 매우 특수한 구역 내의 중앙 시야의 구역인 황반에 영향을 미칠 때 발생한다. 질환은 실명으로 인한 개인의 신체 및 정신 건강에 막대한 영향을 가지고, 매일의 일을 수행하기 위해 가족 구성원에 대한 의존성을 증가시킨다.
- [0010] 보체 시스템의 조절 이상은 AMD의 발생과 매우 상관된다. 첫째로, 보체 유전자에서의 유전자 돌연변이는 AMD를 발생시킬 위험의 환자를 변경시킨다. 또한, AMD 관련 염증은, 조직병리학적 분석에 의해 전신 순환 및 AMD 조직에서 보체 활성화 생성물의 증가에 의해 표시되는 바와 같은, 보체 활성화의 연관된 조절 이상과 연관된다. 새로운 발견은 질환 발병에서 막 공격 복합체의 잠재적 병리학적 영향을 강조한다(Whitmore S, et al. 2014,

Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: Implications for pathophysiology and therapy. Progress in Retinal and Eye Research, December 5, 2014 Epub ahead of print).

[0011] 본 발명은 보체 관련 질환, AMD, 및 다른 보체 관련 눈 병태의 예방 및 치료를 위한 항-인자 Bb 항체를 제공한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 항-인자 Bb 항체를 포함하는 방법 및 조성물을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-인자 Bb 항체는 보체 인자 B보다 더 큰 친화도로 보체 인자 Bb에 결합한다. 또 다른 양상에서, 항-인자 Bb 항체는 인자 Bb에 결합하고, 의존적 용혈을 저해한다. 또 다른 양상에서, 항-인자 Bb 항체는 약 1nM 미만의 Kd로 보체 인자 Bb에 결합한다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 막 공격 복합체(MAC)의 형성을 차단한다.

[0013] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 제1 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열을 포함하고, 제1 아미노산 서열은 (i) (a) CDR1 아미노산 서열 GDIFSSHW, 서열 번호 1; (b) GDIFSSHW, 서열 번호 1로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR1 아미노산 서열 ; 및 (c) GDIFSSX₁W의 CDR1 아미노산 서열(여기서, X₁은 히스티딘이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR1; (ii) (a) CDR2 아미노산 서열 EILPRSGITHYENFNFG, 서열 번호 2; (b) EILPRSGITHYENFNFG, 서열 번호 2로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR2 아미노산 서열; 및 (c) X₁IX₂PX₃SGITHYENFNFG의 CDR2 아미노산 서열(여기서, X₁은 글루탐산이고, X₂는 류신이고, X₃은 아르기닌이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR2; 및 (iii) (a) CDR3 아미노산 서열 AINWEDS, 서열 번호 3; (b) AINWEDS, 서열 번호 3으로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR3 아미노산 서열; 및 (c) AX₁NX₂X₃X₄S의 CDR3 아미노산 서열(여기서, X₁은 아이소류신산이고, X₂는 트립토판이고, X₃은 글루탐산이고, X₄은 아스파르트산이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR3이고; 제2 아미노산 서열은 (i) (a) CDR1 아미노산 서열 HASQNVNVWL, 서열 번호 4; (b) HASQNVNVWL, 서열 번호 4, 서열 번호 4로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR1 아미노산 서열; 및 (c) HASQNVNVX₁L의 CDR1 아미노산 서열(여기서, X₁은 트립토판이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR1; (ii) (a) CDR2 아미노산 서열 KASNLHT, 서열 번호 5; (b) KASNLHT, 서열 번호 5로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR2 아미노산 서열; 및 (c) KASNLHX₁의 CDR2 아미노산 서열(여기서, X₁은 트레오닌이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR2; 및 (iii) (a) CDR3 아미노산 서열 QQGQSYPYT, 서열 번호 6; (b) QQGQSYPYT, 서열 번호 6으로부터 선택된 전체 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환이 다른 CDR3 아미노산 서열; 및 (c) QX₁GQSPX₂T의 CDR3 아미노산 서열(여기서, X₁은 글루탐산이고, X₂는 타이로신이고, 하나의 다른 아미노산은 알라닌에 의해 치환됨)로부터 선택된 CDR3이다.

[0014] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 서열 번호 8 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 12 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 서열 번호 24 내지 27로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 28 내지 31로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 서열 번호 8 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 12 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 서열 번호 24 내지 27로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 28 내지 31로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진다. 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 서열 번호 11의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열 번호 15의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진다.

[0015] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열: 서열 번호 8/서열 번호 12; 서열 번호 8/서열 번호 13; 서열 번호 8/서열 번호 14; 서열 번호 8/서열 번호 15; 서열 번호 9/서열 번호 12; 서열 번호 9/서열 번호 13; 서열 번호 9/서열 번호 14; 서열 번호 9/서열 번호 15; 서열 번호 10/서열 번호 12; 서열 번호 10/서열 번호 13; 서열 번호 10/서열 번호 14; 및 서열 번호 10/서열 번호 15; 서열

번호 11/서열 번호 12; 서열 번호 11/서열 번호 13; 서열 번호 11/서열 번호 14; 및 서열 번호 11/서열 번호 15로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열: 서열 번호 24/서열 번호 28; 서열 번호 24/서열 번호 29; 서열 번호 24/서열 번호 30; 서열 번호 24/서열 번호 31; 서열 번호 25/서열 번호 28; 서열 번호 25/서열 번호 29; 서열 번호 25/서열 번호 30; 서열 번호 25/서열 번호 31; 서열 번호 26/서열 번호 28; 서열 번호 26/서열 번호 29; 서열 번호 26/서열 번호 30; 및 서열 번호 26/서열 번호 31; 서열 번호 27/서열 번호 28; 서열 번호 27/서열 번호 29; 서열 번호 27/서열 번호 30; 및 서열 번호 27/서열 번호 31로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0017] 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 재조합 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 다중특이적 항체, 또는 항체 단편이다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 다이바디, 또는 단쇄 항체 분자이다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 유형이다. 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-인자 Bb 항체는 라벨링 그룹에 커플링될 수 있다. 이 라벨링 그룹은 광학 라벨, 방사선 동위원소, 방사성핵종, 효소 그룹 또는 바이오티닐 그룹일 수 있다.

[0018] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 항체를 분비하는 숙주 세포로부터 본 발명의 항체를 제조하는 단계를 포함하는 본 발명의 단리된 항체를 제조하는 방법이다. 일 양상에서, 이것은 숙주 세포가 성장하는 세포 배양 배지로부터 항체를 단리하거나 정제하는 것을 의미한다.

[0019] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체를 암호화하는 핵산 분자이다. 일 양상에서, 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자는 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0020] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 일 양상에서, 약제학적 조성물은 추가적인 활성제를 또한 포함할 수 있다.

[0021] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 유효량의 적어도 하나의 본 발명의 항-인자 Bb 항체를 상기 환자에게 투여하는 단계 및 이로써 상기 병태를 치료하거나 예방하는 단계를 포함하는 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하거나 예방하는 방법이다. 일 양상에서, 병태는 눈 질환이다. 또 다른 양상에서, 병태는 연령 관련 황반 변성(AMD)이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 항-인자 Bb 단일클론 항체의 결합 분석을 도시한다.

도 2는 10% 정상 인간 혈청의 존재 하에 항-인자 B 또는 항-인자 Bb 항체를 사용한 용혈 검정의 결과를 도시한다.

도 3은 보체 인자 B 구조의 다이어그램을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 명세서에 사용된 머리 부분은 단지 체계적 목적을 위한 것이고, 기재된 대상을 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0024] 표준 기법은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환, 단백질 정제 등에 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조사의 사양에 따라 또는 당해 분야에서 흔히 달성되는 바대로 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 하기 절차 및 기법은 당해 분야에 널리 공지되고 명세서에 걸쳐 인용되고 기재된 다양한 일반적인 더 구체적인 참조문헌에 기재된 바와 같은 종래의 방법에 따라 일반적으로 수행될 수 있다. 예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.](본 명세서에 임의의 목적을 위해 전체로 참조로 인용됨)을 참조한다. 특별한 정의가 제공되지 않은 한, 본 명세서에 기재된 분자 생물학, 생물학적, 화학적, 물리적 및 생물물리적 화학, 분석 화학, 유기 화학, 및 의학적 및 약제학적 화학과 연결되어 사용되는 명명법 및 이들의 실험실 절차 및 기법은 널리 공지되고 당해 분야에서 흔히 사용되는 것이다. 표준 기법은 환자의 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제제, 제형, 및 전달 및 치료에 사용될 수 있다.

- [0025] 하기 정의가 본 명세서에서 사용된다:
- [0026] "단백질"은, 본 명세서에 사용되는 바대로, 적어도 2개의 공유로 부착된 아미노산을 의미하도록 의도되고, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드 및 펩타이드에 의해 상호 교환되어 사용된다. 2개 이상의 공유로 부착된 아미노산은 펩타이드 결합에 의해 부착된다.
- [0027] "인자 B"는 서열 번호 16에 기재된 아미노산 서열인 인간 인자 B를 의미한다. 인자 B, 단백질 B, 보체 인자 B, 보체 단백질 B는 서열 번호 16과 동일한 서열을 의미한다. 다른 용어는 이것 또는 인자 B의 변이체(예를 들어, "프리프로단백질 B")를 의미하도록 사용될 수 있다. 인자 Ba(서열 번호 17)는 인자 B의 하나의 폴리펩타이드 단편이다.
- [0028] "인자 B"는 인간 인자의 폴리펩타이드 단편(서열 번호 7)을 의미한다.
- [0029] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 복수의 CDR 및 항원의 에피토프의 결합을 통한 특이적 항원과 상호작용하는 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 단백질을 의미하도록 이의 광의에서 상호 교환되어 사용된다. 항체는 단일클론(예를 들어, 전장 또는 온전한 단일클론 항체의 경우), 다중클론, 다가 및/또는 다중특이적(예를 들어, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)일 수 있다. 항체는 또한 (본 명세서에 기재된 바와 같은) 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다.
- [0030] "에피토프"는 항체에 의해 인식되고 결합된 서열, 구조, 또는 분자를 의미하기 위해 사용된다. 에피토프는 "항원 부위"라 칭해질 수 있다.
- [0031] "항체 단편"은 오직 온전한 항체의 일부를 포함하고, 여기서 이 부분은 온전한 항체에 존재할 때 바람직하게는 그 부분과 보통 연관된 기능 중 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 모두를 보유한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 다이아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 단편은 온전한 항체의 항원 결합 부위를 포함하고 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 실시형태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 구역을 포함하는 것은 온전한 항체에 존재할 때 Fc 구역과 보통 연관되는 적어도 하나의 생물학적 기능, 예컨대 FcR 결합, 항체 반감기 조절, ADCC 기능 및 보체 결합을 보유한다. 일 실시형태에서, 항체 단편은 온전한 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 가지는 다가 항체이다. 예를 들어, 이러한 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 암(arm)을 포함할 수 있다.
- [0032] "단일클론" 항체는 본 명세서에 사용되는 바대로 세포의 집단으로부터 얻은 항체를 의미하고, 세포의 집단은 단일 모 세포로부터 클론상 유래한다. 단일클론 항체는 균일한 항체이고, 즉 집단을 포함하는 개별 항체는, 동일한 유전자로부터 유래하고 가능한 천연 발생 돌연변이(소량으로 존재할 수 있음)를 제외하고 동일한 아미노산 서열 및 단백질 구조, 및 번역 후 변형(몇몇 경우에 상이할 수 있음)을 가진다는 점에서 동일하다. 단일클론 항체는 몇몇 실시형태에서 매우 특이적일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 지향될 수 있다. 게다가, 상이한 결정부위(에피토프)에 지향된 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 다른 항체 제제와 반대로, 각각의 단일클론 항체가 항원에서 단일 결정부위에 지향된다. 개별 단일클론 항체는 임의의 특정한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 사용하고자 하는 단일클론 항체는 문헌[Kohler et al. (1975) Nature 256:495]에 의해 처음에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조), 문헌[Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628 및 Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597]에 기재된 기법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 제조될 수 있다.
- [0033] "다중클론" 항체는 모, 항체 생성 세포의 불균일한 집단으로부터 유래한 항체의 불균일한 집단을 기술하도록 사용된다. 대부분의 경우에, 다중클론 항체는 상이한 에피토프에 대한 상이한 친화도를 가지고, 상이한 서열을 가지는 유전자로부터 제조된다.
- [0034] "키메라" 항체는 2개 이상의 상이한 종으로부터 유래한 아미노산 서열을 포함하는 항체이다.
- [0035] "인간화된" 항체는 비인간 모 항체로부터 유래한 키메라 항체이다. 많은 경우에, 인간화된 항체에서의 특정한 아미노산 위치는 인간 항체에서 상응하는 위치에서 아미노산의 동일성에 상응하도록 변화된다. 많은 경우에, 모 (비인간) 항체의 가변 구역에서의 위치는 인간 종의 가변 구역으로부터의 아미노산에 의해 대체된다. 이것은 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 가지는 인간화된 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간-영장류 항체를 생성한다.
- [0036] "변이체"는 모 서열과 비교되는 적어도 하나의 차이를 포함하는 서열을 의미한다. 변이체 폴리펩타이드는 모 서

열과 적어도 약 75%의 아미노산 서열 동일성을 가지는 단백질이다. 변이체 단백질은 네이티브 또는 야생형 아미노산 서열과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 98%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 경우에 변이체 항체는 모 항체와 비교되는 아미노산 서열에서의 하나 이상의 차이(들)를 가지는 항체이다. 인간화된 및 키메라 항체는 변이체 항체이다. 따라서, 변이체 항체는 모 항체와 100% 미만의 서열 동일성을 포함한다.

[0037] "단리된" 또는 "정제된"은 천연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 분리되고/되거나 회수된 분자를 의미하고, 성분은 분자의 사용 또는 활성을 간섭할 수 있는 재료이다. 성분은 펩타이드, 당, 핵산, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함한다.

[0038] "상보성 결정 구역"(Complementarity Determining Region: CDR)은 하나 이상의 CDR의 잔기가 항원 결합을 돕는 항체 내의 하나 이상의 구역을 의미한다. 많은 경우에, CDR의 개별 아미노산은 표적 항원의 원자와 가깝게 밀접할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, CDR은 3개의 CDR 구역으로 이루어질 수 있는 면역글로불린에 위치할 수 있다. 몇몇 경우에, 더 큰 아미노산 서열에 하나 초과 CDR 서열이 있는 경우, CDR은 다른 서열, 및 넘버링된 CDR에 의해 분리될 수 있다. 몇몇 경우에, 다수의 CDR은 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 확인된다. 각각의 CDR은 카밧에 의해 정의된 바와 같은 상보성 결정 구역으로부터의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). 항체, 또는 항체 단편 내의 CDR, 및 다른 서열의 아미노산 넘버링은 카밧의 넘버링에 따른다. 많은 경우에, CDR은 가변 구역 서열(카밧에서와 같은 넘버링)에서 이의 위치에 의해 한정될 수 있고, 예를 들어 경쇄 CDR 1은 LC CDR2에 대해 24번 위치와 33번 위치 사이; 50번 위치와 56번 위치 사이; 및 LC CDR 3에 대해 89번 위치와 97번 위치 사이의 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄 CDR은 CDR1에 대해 26번 위치와 33번 위치 사이; HC CDR 2에 대해 50번 위치와 66번 위치 사이; 및 HC CDR 3에 대해 97번 위치와 103번 위치 사이에 있을 수 있고/있거나, 초가변 루프는 26-32번 경쇄 잔기(LC CDR1), 50-52번 잔기(LC CDR2)와 91-96번 잔기(LC CDR3); 및 26-32번 중쇄 잔기(HC CDR1), 53-55번 잔기(HC CDR2)와 97-101번 잔기(HC CDR3) 사이에 있을 수 있다. 몇몇 경우에, 상보성 결정 구역은 카밧에 따라 정의된 CDR 구역 및 초가변 루프 둘 다로부터의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체가 단쇄 면역글로불린인 경우, 1개 초과 CDR, 2개 초과 CDR, 3개 초과 CDR, 4개 초과 CDR, 또는 5개 초과 CDR이 존재할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 6개의 CDR로 이루어질 수 있다.

[0039] "프레임워크 구역", FR은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 대부분의 실시형태에서, 가변 도메인은 순차적으로 확인된 2개와 4개의 FR을 가진다. 예를 들어 3개의 CDR을 포함하는 가변 구역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4의 4개의 FR을 가진다. CDR이 카밧에 따라 정의되는 경우, 경쇄 FR 잔기는 잔기 약 1-23(LCFR1), 34-49(LCFR2), 57-88(LCFR3) 및 98-107(LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 잔기 약 1-25(HCFR1), 34-49(HCFR2), 67-96(HCFR3) 및 104-113(HCFR4)에 위치한다. CDR이 초가변 루프로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 경우, 경쇄 FR 잔기는 경쇄에서 잔기 약 1-23(LCFR1), 34-49(LCFR2), 57-88(LCFR3) 및 98-107(LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 잔기 약 1-25(HCFR1), 34-49(HCFR2), 67-96(HCFR3) 및 104-113(HCFR4)에 위치한다. 몇몇 경우에, CDR이 카밧에 의해 정의된 바와 같은 CDR 및 초가변 루프의 것 둘 다로부터의 아미노산을 포함할 때, FR 잔기가 따라서 조정될 것이다. 예를 들어, HC CDR1이 아미노산 H26-H35를 포함할 때, 중쇄 FR1 잔기는 1-25번 위치에 있고, FR2 잔기는 36-49번 위치에 있다.

[0040] "가변 도메인"은 상보성 결정 구역(CDR), 및 프레임워크 구역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 전통적인 항체 분자의 경쇄 및 중쇄의 부분을 의미한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 의미한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 의미한다.

[0041] "Fv" 또는 "Fv 단편"은 FR 및 CDR 서열을 포함하는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편을 의미한다. 많은 실시형태에서, Fv는 예를 들어 단쇄 Fv 분자(scFv)에서 사실상 공유될 수 있는 밀접히 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이합체로 이루어진다. 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 폴리펩타이드의 표면에서 항원 결합 부위를 한정한다. 총체적으로, 6개의 CDR 또는 이의 하위세트는 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 오직 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)은 몇몇 경우에 보통 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도에 있지만 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 가진다.

[0042] "Fab" 또는 "Fab 단편"은 경쇄의 가변 및 불변 도메인(CL) 및 중쇄의 가변 도메인 및 제1 불변 도메인(CH1)을

함유한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 이들 사이의 힌지 시스테인에 의해 이의 카복시 말단 근처에 일반적으로 공유로 연결된 Fab 단편의 쌍을 포함한다. 항체 단편의 다른 화학 커플링은 또한 당해 분야에 공지되어 있다.

[0043] "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 최대 서열 동일성 백분율을 획득하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않으면서, 기준 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정할 목적을 위한 정렬은 공중에게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 예를 들어 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당해 분야의 당업자는 비교되는 서열의 완전 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 이후, 서열 동일성은 더 긴 서열에 대해 계산되고, 즉 더 짧은 서열이 더 긴 서열의 일부와 100%의 서열 동일성을 나타내는 경우에도, 전체 서열 동일성은 100% 미만일 것이다.

[0044] "아미노산 서열 상동성 백분율(%)"은 최대 서열 상동성 백분율을 획득하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 기준 서열에서 아미노산 잔기와 상동성인 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 이 방법은 보존적 치환을 고려한다. 보존적 치환은 아미노산이 유사한 아미노산에 의해 치환되게 허용하는 치환이다. 아미노산은 여러 특징, 예를 들어 크기, 형상, 소수화도, 친수화도, 전하, 등전점, 극성, 방향족화도 등에서 유사할 수 있다. 아미노산 서열 상동성 백분율을 결정할 목적을 위한 정렬은 당해 분야의 당업자의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 몇몇 경우에, 아미노산 서열은 공중에게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 정렬될 수 있다. 당해 분야의 당업자는 비교되는 서열의 완전 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 이후, 서열 상동성은 더 긴 서열에 대해 계산되고, 즉 더 짧은 서열이 더 긴 서열의 일부와 100%의 서열 동일성을 나타내는 경우에도, 전체 서열 동일성은 100% 미만일 것이다.

[0045] "핵산 서열 동일성 백분율(%)"은 최대 서열 동일성 백분율을 획득하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 기준 서열에서 뉴클레오타이드와 동일한 후보 서열에서의 뉴클레오타이드의 백분율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성 백분율을 결정할 목적을 위한 정렬은 공중에게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 예를 들어 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당해 분야의 당업자는 비교되는 서열의 완전 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기에 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 이후, 서열 동일성은 더 긴 서열에 대해 계산되고, 즉 더 짧은 서열이 더 긴 서열의 일부와 100%의 서열 동일성을 나타내는 경우에도, 전체 서열 동일성은 100% 미만일 것이다.

[0046] 분자의 "활성" 또는 "생물학적 활성"은 분자의 유형 및 소정의 활성을 평가하기 위한 시험의 이용가능성에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 인자 Bb 항체의 맥락에서, 활성은 인자 Bb의 생물학적 활성, 예를 들어 다른 보체 단백질에 대한 결합, 세린 프로테아제 활성 또는 MAC 형성을 부분적으로 또는 완전히 저해하는 이의 능력을 의미한다. 청구된 인자 Bb 항체의 바람직한 생물학적 활성은 인자 Bb-관련 질환 또는 병태, 예를 들어 보체 연관 눈 병태 등의 상태의 측정 가능한 개선을 달성하는 능력이다. 몇몇 경우에, 개시된 항-인자 Bb 항체에 의해 저해된 활성은 인자 Bb 프로테아제 또는 절단 활성이다. 다른 경우에, 활성은 복합체에서 다른 보체 단백질에 결합하는 능력이다. 몇몇 실시형태에서, 개시된 항-인자 Bb 항체의 활성은 용혈을 저해하는 이의 능력에 의해 측정된다. 활성은 관련 동물 모델 또는 인간 임상 실험을 이용하여 결합 검정을 포함하는 실험실내 또는 생체내 시험의 사용을 통해 결정될 수 있다.

[0047] "보체 관련 눈 병태"는 광의로 사용되고, 전통적인, 력틴, 대안적인 또는 외인성 경로에 의해 활성화된, 보체를 수반하는, 병리학의 모든 눈 병태를 포함한다. 보체 관련 눈 병태는 제한 없이 황반 퇴행성 질환, 예컨대 건성 및 삼출성(비삼출성 및 삼출성) 형태를 포함하는 연령 관련 황반변성(AMD)의 모든 상태, 맥락막 신생혈관화(choroidal neovascularization: CNV), 포도막염, 당뇨병 및 당뇨병 황반 부종을 포함하는 다른 허혈 관련 망막병증, 중앙 망막 정맥 폐색(Central Retinal Vein Occlusion: CRVO), 분지 망막 정맥 폐색(Branched Retinal Vein Occlusion: BRVO), 및 다른 눈내 신생혈관 질환, 예컨대 당뇨병 황반 부종, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우(von Hippel-Lindau) 질환, 눈의 히스토플라스마증, 각막 신생혈관화, 및 망막 신생혈관화를 포함한다. 보체 관련 눈 병태의 바람직한 그룹은 건성 및 습성(비삼출성 및 삼출성) AMD를 포함하는 연령 관련 황반변성(AMD), 맥락막 신생혈관화(CNV), 황반 모세혈관확장증, 포도막염, 당뇨병 및 다른 허혈 관련 신생혈관 관련 망막병증,

또는 세포 퇴행성 당뇨병 황반 부종, 병리학적 근시, 폰 히펠-런다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 도인 허니콤 망막 영양장애(Doyne honeycomb retinal dystrophy)/말라티아 레벤티네스(Malattia Leventinese), 스타르가르츠(Stargarts) 질환, 녹내장, 중앙 망막 정맥 폐색(CRVO), BRVO, 각막 신생혈관화, 망막 신생혈관화를 포함한다.

- [0048] "약제학적으로 허용되는"은 연방정부 또는 주정부의 규제 기관이 승인하거나 이에 의해 승인될 수 있거나 동물, 더 특히 인간에서 사용하기 위해 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 수록된 것을 의미한다.
- [0049] "약제학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 원하는 약역학적 활성을 보유하는 화합물의 염을 의미한다. 이러한 염은 무기산, 예컨대 하이드로염산, 하이드로브롬산, 황산, 질산, 인산 등; 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 헥산산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일) 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-다이설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄페실폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3차 뷰틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 무콘산 등에 의해 형성된 산 부가염; 및 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리토 이온, 또는 알루미늄 이온에 의해 대체될 때 형성된 염; 또는 유기 염기와의 배위물, 예컨대 에탄올아민, 다이에탄올아민, 트라이에탄올아민, N 메틸글루카민 등을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 염산염이다. 소정의 실시형태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 나트륨염이다.
- [0050] "약제학적으로 허용되는 부형제"는 본 개시내용에 의해 제공된 화합물이 환자에게 투여될 수 있고, 이의 약역학적 활성을 파괴하지 않고, 치료학적 유효량의 화합물 또는 이의 약역학적 활성 대사물질을 제공하기에 충분한 용량으로 투여될 때 비독성인, 약제학적으로 허용되는 희석제, 약제학적으로 허용되는 아췌벤트, 약제학적으로 허용되는 비히클, 약제학적으로 허용되는 담체, 또는 임의의 상기의 조합을 의미한다.
- [0051] "치료"는 장애의 발생을 방지하거나 이의 병리학을 변경하거나, 장애의 증상을 경감시키거나, 감소시키기 위한 적어도 하나의 치료제의 투여이다. 따라서, 치료는 치료학적 치료 및 예방학적 또는 예방 조치 둘 다를 의미한다. 치료를 필요로 하는 사람은 이미 장애를 가진 사람, 및 장애를 예방하고자 하는 사람을 포함한다. 본 명세서에 개시된 바대로, 투여를 위한 바람직한 물질은 적어도 하나의 개시된 항-인자 Bb 항체를 포함한다. 보체 관련 질환의 치료에서, 적어도 하나의 현재 개시된 항체 또는 이러한 항체에 대한 암호화 서열을 포함하는 치료제는 보체 경로의 성분의 반응의 규모를 직접적으로 또는 간접적으로 변경하거나, 다른 치료제, 예를 들어 항생제, 항진균제, 소염제, 화학치료제 등에 의해 질환이 치료에 감수성 있게 할 수 있다.
- [0052] "치료학적 유효량"은 질환, 또는 질환의 적어도 하나의 임상 증상을 치료하도록 대상체에게 투여될 때, 질환 또는 이의 증상의 이러한 치료를 실행하기에 충분한 물질의 양을 의미한다. 특정한 치료학적 유효량은 예를 들어 물질, 질환 및/또는 질환의 증상, 질환 및/또는 질환의 증상의 중증도, 치료되는 환자의 연령, 체중 및/또는 건강, 및 주치의의 판단에 따라 변할 수 있다. 임의의 소정의 화합물에서의 적절한 양은 당해 분야의 당업자에 의해 확인되고/되거나 통상적인 실험에 의해 결정될 수 있다.
- [0053] "치료학적 유효 용량"은 환자에서 질환의 효과적인 치료를 제공하는 용량을 의미한다. 치료학적 유효 용량은 물질마다 및/또는 환자마다 다를 수 있고, 인자, 예컨대 환자의 상태 및 질환의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효 용량은 당해 분야의 당업자에게 공지된 일상적인 약역학적 절차에 따라 결정될 수 있다.
- [0054] 질환, 예컨대 보체 관련 눈 병태의 "병리학"은 환자의 웰빙을 손상시키는 모든 현상을 포함한다. 이것은 제한 없이 비정상 또는 제어 불가능한 세포 성장, 단백질 생성, 비정상 또는 제어 불가능한 세포사, 자가항체 생성, 보체 생성, 보체 활성화, MAC 형성, 이웃 세포의 정상 기능에 의한 방해, 비정상 수준에서의 사이토카인 또는 다른 분비 생성물의 방출, 임의의 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화, 세포 공간으로의 염증성 세포의 침윤 등을 포함한다.
- [0055] "포유동물"은 본 명세서에 사용되는 바대로, 제한 없이, 인간, 더 고등의 영장류, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물 이러한 말, 돼지, 소, 개, 고양이 및 흰담비 등을 포함하는 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미한다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0056] 하나 이상의 추가의 치료제"와 조합된" 담체는 동시(공반) 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.
- [0057] 본 개시내용은 인자 Bb 단백질에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0058] 본 명세서에 기재된 항체는 하나 이상의 상보성 결정 구역(CDR)을 가지는 스캐폴드 구조를 포함한다. 소정의 실시형태에서, CDR은 모 서열의 하나 이상의 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로부터의 2개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, CDR은 본 명세서에 기재된 바와 같은 일반 보존된 아미노산 서열 및 가변 아미노산 서열을 가지는 공통 서열에 의해 한정된다.
- [0059] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 인자 Bb 항체의 스캐폴드 구조는 각각 단일클론 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체(예를 들어, 항체 모방체), 키메라 항체, 인간화된 항체, 항체 융합(예를 들어, 항체 접합체), 및 각각의 단편(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 항체에 기초할 수 있다. 다양한 구조는 하기 추가로 기재되고 정의되어 있다. 인자 Bb 항체는 인자 Bb 활성화와 연관된 결과, 증상 및/또는 병리학을 치료하는 데 있어서 유용하다. 이것은 죽상동맥경화증, 급성 심근경색 후 허혈-재관류, 헤노흐-쑤라인 자색반 신장염, 면역 복합 혈관염, 류마티스 관절염, 혈관염, 동맥류, 뇌졸중, 심근병증, 출혈성 쇼크, 충돌 손상, 다발성 장기 부전, 저혈량성 쇼크 및 장관 허혈, 이식 거부, 심장 수술, PTCA, 자연 유산, 뉴런 손상, 척수 손상, 중증 근무력증, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 갈랑 바레 증후군, 파킨슨병, 알츠하이머병, 급성 호흡 곤란 증후군, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 수혈 관련 급성 폐 손상, 급성 폐 손상, 굿패스처병, 심근경색, 심폐 우회술 후 염증, 심폐 우회술, 폐혈성 쇼크, 이식 거부, 이종 이식, 화상 손상, 전신 홍반성 낭창, 막성 신장염, 베게너 질환, 건선, 유사천포창, 피부근염, 항인지질 증후군, 염증성 장 질환, 혈액투석, 류코포레시스(leukopheresis), 혈장교환술, 헤파린 유도 체외 막 산소화장치 LDL 침전, 체외 막 산소화장치 류코포레시스, 혈장교환술, 헤파린 유도 체외 막 산소화장치 LDL 침전, 체외 막 산소화장치 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0060] 개시된 항체에 대한 다른 용도는 예를 들어 보체 및 인자 Bb 관련 질환의 진단을 포함한다.
- [0061] 본 개시내용의 양상은 인자 Bb 항체, 특히 하기 더 완전히 기재된 바와 같은 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 포함하는 적어도 하나의 CDR, 또는 이들의 조합을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0062] 일 양상에서, 인자 Bb 항체는 인자 Bb의 활성을 저해하거나, 단백질 복합체를 형성하는 인자 Bb의 능력을 저해한다. 특정한 기전 또는 이론에 구속되지 않으면서, 몇몇 실시형태에서 항체는 보체 경로를 방해하여서, 보체 캐스케이드, MAC의 형성 및 세포 용해를 방해한다. 이 파괴는 건성 및 습성(비삼출성 및 삼출성) AMD, 맥락막 신생혈관화(CNV), 포도막염, 당뇨병 및 다른 허혈 관련 망막병증, 당뇨병 황반 부종, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 중앙 망막 정맥 폐색(CRVO), 각막 신생혈관화, 망막 신생혈관화 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0063] 본 개시내용의 항체는 따라서 보체 시스템에 연관된 병태 또는 인자 Bb와 관련된 질환 또는 병태를 확인하기 위해 작용할 수 있다. 또한, 항체는 보체 및/또는 인자 Bb와 연관된 다양한 질환 또는 병태의 치료 및 예방에서 효율을 가짐으로써 인자 B 및/또는 다른, 하향, 보체 단백질에 의해 매개되는 효과를 조절하고/하거나 억제하기 위해 사용될 수 있다. 이 파괴는 죽상동맥경화증, 급성 심근경색 후 허혈-재관류, 헤노흐-쑤라인 자색반 신장염, 면역 복합 혈관염, 류마티스 관절염, 혈관염, 동맥류, 뇌졸중, 심근병증, 출혈성 쇼크, 충돌 손상, 다발성 장기 부전, 저혈량성 쇼크 및 장관 허혈, 이식 거부, 심장 수술, PTCA, 자연 유산, 뉴런 손상, 척수 손상, 중증 근무력증, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 갈랑 바레 증후군, 파킨슨병, 알츠하이머병, 급성 호흡 곤란 증후군, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 수혈 관련 급성 폐 손상, 급성 폐 손상, 굿패스처병, 심근경색, 심폐 우회술 후 염증, 심폐 우회술, 폐혈성 쇼크, 이식 거부, 이종 이식, 화상 손상, 전신 홍반성 낭창, 막성 신장염, 베게너 질환, 건선, 유사천포창, 피부근염, 항인지질 증후군, 염증성 장 질환, 혈액투석, 류코포레시스(leukopheresis), 혈장교환술, 헤파린 유도 체외 막 산소화장치 LDL 침전, 체외 막 산소화장치 류코포레시스, 혈장교환술, 헤파린 유도 체외 막 산소화장치 LDL 침전, 체외 막 산소화장치 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0064] 더 구체적으로, 본 개시내용은 항-인자 Bb 항체 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 다양한 양상에서, 항-인자 Bb 항체는 인자 Bb 및/또는 다른 보체 단백질에 의해 매개된 적어도 하나의 생물학적 반응을 저해하고, 그러므로 보체 관련 및 인자 Bb 관련 질환 또는 장애의 효과를 완화하기에 유용할 수 있다. 인자 Bb 항체의 생성을 위한 포유동물 세포주 및 박테리아 세포를 포함하는 발현 시스템, 및 인자 Bb와 연관된 질환을 치료하는 방법이 본 개시내용에 의해 또한 제공된다.
- [0065] 본 개시내용의 항체는 스캐폴드 구조 및 인자 Bb에 결합하는 하나 이상의 상보성 결정 구역(CDR)을 포함한다. 일 실시형태에서, 아미노산 서열은 임의의 서열 번호 1 내지 6 또는 서열 번호 18 내지 23을 포함한다.

- [0066] 다양한 실시형태에서, 항체는 제1 아미노산 서열 및/또는 제2 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 제1 아미노산 서열 및/또는 제2 아미노산 서열은 임의의 서열 번호 8 내지 15 또는 서열 번호 24 내지 31로부터 선택된다.
- [0067] 다양한 실시형태에서, 항체는 제1 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열 중 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 제1 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열은 단일 선형 아미노산 서열일 수 있거나, 다이설파이드 브릿지에 의해 공유로 결합될 수 있거나, 비공유로 결합될 수 있다.
- [0068] 인자 Bb
- [0069] 보체 인자 B는 *CFB* 유전자에 의해 암호화된 단일 93,000Da 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 글라이코실화 단백질이다. 이것은 보체 활성화의 대안적인 경로의 필수 성분이고, 대략 200 μ g/ml에서 인간 형장에서 발견된다. Mg⁺⁺의 존재에서, 인자 B는 C3b에 결합하고, C3b:B 복합체는 활성 트립신 유사 세린 프로테아제로서 순환하는 세린 프로테아제인 인자 D에 의해 활성화될 수 있다. 인자 D에 의한 인자 B의 절단은 단편(33,000Da)의 방출을 발생시키고, C3b에 결합된 (60,000Da) Bb 단편을 남긴다. 이 Bb 하위단위는, 각각 작은 펩타이드 C3a 및 C5a를 절단함으로써 이 단백질의 둘 다를 이의 활성 형태로 전환시킴으로써, C3 및 C5 전환효소라 불리는, 세린 프로테아제이다.
- [0070] 인자 B는 치밀하게 규제되는 매우 특이적인 세린 프로테아제이다. 이의 활성화 형태에서, 이것은 염증성 반응, 세포 용해, 식균작용 및 B 세포 자극을 개시시키는 보체 활성화의 중추적인 증폭을 촉매화한다. 인자 B는 표면 결합 C3b, 또는 이의 가용성 대응물 C3(H₂O)에 의해 어셈블리를 통해 활성화된다. C3에 대한 결합 후, 인자 B는 작은 단편, 인자 Ba(1-234번 잔기) 및 큰 단편, 인자 Bb(235-739번 잔기)로 인자 D에 의해 절단된다. 인자 Ba는 복합체로부터 해리되어, 대안적인 경로 C3 전환효소 복합체 C3b-Bb를 남기고, 이것은 C3을 C3a 및 C3b로 절단한다. C3b-Bb 프로테아제 복합체는 안정하지 않고, 복합체로부터 해리되면 인자 Bb는 C3b와 재회합하지 않는다.
- [0071] 전효소 인자 B는 45개 잔기 링커에 의해 VWA 도메인에 연결된 3개의 N 말단 보체 제어 단백질(CCP) 도메인 및 촉매 중심을 보유하는 C 말단 세린 프로테아제(SP) 도메인으로 이루어진다. 다른 세린 프로테아제로부터의 차이는 인자 B의 활성 중심에서 관찰된다. 인자 Bb는 C 말단 세린 프로테아제 도메인을 포함하고, CCP 도메인은 인자 Ba에서 발견된다.
- [0072] 인간 인자 B의 아미노산 서열은 서열 번호 16에 기재되어 있다. 본 개시내용에서 유용한 인자 B의 다른 형태는 서열 번호 16의 인간 네이티브 인자 B 서열에 적어도 70% 또는 적어도 90% 상동성인 돌연변이체 및 변이체를 포함한다.
- [0073] 인간 인자 Bb의 아미노산 서열은 서열 번호 7이다. 본 개시내용에서 유용한 인자 Bb의 다른 형태는 서열 번호 7의 네이티브 인자 Bb 서열에 적어도 70% 또는 적어도 90% 상동성인 돌연변이체 및 변이체를 포함한다.
- [0074] 인간 인자 Ba의 아미노산 서열은 서열 번호 17이다. 본 개시내용에서 유용한 인자 Ba의 다른 형태는 서열 번호 17의 네이티브 인자 Ba 서열에 적어도 70% 또는 적어도 90% 상동성인 돌연변이체 및 변이체를 포함한다.
- [0075] 본 명세서에 기재된 바와 같은 저해 인자 B, 인자 Bb, 또는 인자 Ba 기능/활성은 인자 Bb의 저해를 나타낸다. 보체 대안적인 경로를 평가하는 일 예는 용혈 검정이다: (AP)의 대안적인 경로의 활성화는 전통적인 경로보다 더 높은 농도의 혈청을 요한다. 일반적으로, 5mM EGTA의 존재 하의 5mM Mg⁺⁺의 최종 농도는 EGTA가 Ca⁺⁺를 우선적으로 킬레이트화하는 검정에서 사용된다. 대부분의 포유동물 종의 AP는 토끼 적혈구에 의해 자발적으로 활성화되어서, 이들은 편리한 표적이다. GVB0(콤프테크 프로덕츠)에 의해 3회 세척하고 5x10⁸/ml로 재현탁시킴으로써 토끼 적혈구(Complement Technology, Inc.)를 준비한다. 상이한 양의 항-인자 Bb 항체를 GVB0에 의해 희석한다. 연속 희석된 항-인자 Bb 항체, 0.1M MgEGTA(콤프테크 프로덕츠), 1/2NHS(GVB0에 의해 1/2 희석된 정상 인간 혈청), 및 토끼 Er의 순서로 얼음에서 100 μ l의 반응물을 혼합한다. 이후, 진탕기에서 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응물을 항온처리한다. 1.0ml의 차가운 GVBE를 첨가한다. 대략 1000xg 이상에서 3분 동안 혼합하고 원심분리하여 세포를 펠렛화한다. 100 μ l의 상청액을 96웰 플레이트로 옮기고, 412nm에서 판독한다(SoftMax Pro 4.7.1). 그래프패드 프리즘 6을 사용하여 데이터를 분석한다.
- [0076] 인자 Bb 항체.
- [0077] 일 양상에서, 본 개시내용은 인자 B에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 인자 Bb에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0078] 소정의 양상에서, 본 개시내용은 인자 Bb, 즉 인자 Bb 항체 또는 항-인자 Bb 항체에 결합하는 재조합 항체를 제공한다. 이 맥락에서, 재조합 항체는 재조합 기법을 이용하여, 즉 하기 기재된 바와 같은 재조합 핵산의 발현을 통해 제조될 수 있다. 재조합 단백질의 제조를 위한 방법 및 기법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0079] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 단리되거나 정제된다. 단리되거나 정제된 항체는 이의 천연 상태에서 보통 연관된 적어도 일부 재료(오염 재료)가 동반되지 않을 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 오염 재료는 소정의 샘플의 전체 중량의 약 50중량% 미만, 더 바람직하게는 약 20중량% 미만, 더 바람직하게는 약 10중량% 미만을 구성한다. 몇몇 실시형태에서, 오염물질은 펩타이드일 수 있다.
- [0080] 순수한 단백질은 전체 단백질의 적어도 약 50중량%를 포함하고, 적어도 약 80%가 바람직하고, 적어도 약 90%가 특히 바람직하다. 많은 실시형태에서, 정제된 항-인자 Bb 항체는 이것이 유래한 유기체 이외의 유기체에서 또는 이로부터 제조된다. 몇몇 실시형태에서, 항-인자 Bb 항체는 유도 가능한 프로모터 또는 높은 발현 프로모터의 사용을 통해 보통 보이는 것보다 상당히 더 높은 농도에서 제조될 수 있어서, 항체는 증가한 농도 수준에서 제조된다.
- [0081] 몇몇 실시형태에서, 단리되거나 정제된 항체는 항체를 위한 진단학적 및/또는 치료학적 용도를 방해할 수 있는 성분으로부터 제거될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바대로 항체의 90중량% 초과, 가장 바람직하게는 99중량% 초과, 일반 아미노산 서열분석 기법(예를 들어, Edman 분해 및 질량 분광법)의 사용에 의해, 또는 쿠마시 블루 또는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 동중성으로, 내부 아미노산 서열 또는 N-말단의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로 정제될 것이다. 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이므로, 단리된 항체는 재조합 세포 내에 인시츄로 항체를 포함한다. 그러나, 보통, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0082] 개시된 항체는 인자 Bb에 특이적으로 결합할 수 있고, 인자 Bb의 생물학적 활성을 저해하거나 조절하기 위해 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 개시된 항체는 동물의 면역화에 의해 생성되고, 다른 경우에 항체는 재조합 DNA 기법에 의해 제조될 수 있다. 추가적인 실시형태에서, 항-인자 Bb 항체는 천연 발생 항체의 효소 또는 화학 절단에 의해 제조될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 사합체를 포함할 수 있다. 이 실시형태의 몇몇에서, 각각의 사합체는 통상적으로 폴리펩타이드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 이루어지고, 각각의 쌍은 1개의 경쇄(통상적으로 약 25kDa의 분자량을 가짐) 및 1개의 중쇄(통상적으로 약 50-70kDa의 분자량을 가짐)를 가진다. 각각의 사슬의 아미노 말단 부분은 약 100개 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 구역을 포함하고, 항원 인식을 담당할 수 있다. 각각의 사슬의 카복시 말단 부분은 불변 구역을 한정할 수 있고, 이것은 주로 이펙터 기능을 담당한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파, 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 아이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 한정한다. IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 여러 하위종류를 가진다.
- [0083] 몇몇 천연 발생 항체, 예를 들어 낙타 및 라마에서 발견되는 항체는 2개의 중쇄로 이루어진 이합체일 수 있고, 경쇄를 포함하지 않는다. Muldermans *et al.*, 2001, *J. Biotechnol.* 74:277-302; Desmyter *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290. 낙타 항체의 결정학 연구는 이 항체의 CDR3 구역이 항원과 상호작용하는 표면을 형성하고 따라서 더 통상적인 사합체 항체에서와 같이 항원 결합에 중요하다는 것을 밝혀냈다. 본 개시내용은 인자 Bb에 결합하고/하거나 이의 생물학적 활성을 저해할 수 있는 2개의 중쇄, 또는 이의 단편으로 이루어진 이합체 항체를 포함한다.
- [0084] 본 개시내용의 항체는 인자 Bb 단백질, 바람직하게는 인간 인자 Bb에 특이적으로 결합한다. 항체가 임의의 다른 항원 또는 단백질보다 이 표적 항원에 더 높은 결합 친화도를 가질 때, 항체는 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 항체는 임의의 다른 단백질보다 인자 Bb에 더 높은 친화도로 결합한다. 통상적으로, 결합 친화도는 평형 결합 상수, 예를 들어 K_d (또는 K_d), 또는 K_a (또는 K_a)를 결정함으로써 측정된다. 몇몇 실시형태에서, 개시된 항체는 약 10^{-7} M 내지 약 10^{-12} M, 또는 약 10^{-8} M 내지 약 10^{-11} M, 또는 약 10^{-9} M 내지 약 10^{-10} M의 K_d 로 표적 항원에 결합한다. 대부분의 경우에, 비표적 항원에 대한 개시된 항체의 K_d 는 표적 항원에 대한 K_d 보다 클 수 있고, 예를 들어 표적에 대한 K_d 는 10^{-10} M이고, 비표적에 대한 K_d 는 10^{-8} M이다. 몇몇 경우에, 다른 항원에 대한 K_d 는 표적 항원 K_d 의 1X 초과, 표적 항원 K_d 의 2X 초과, 표적 항원 K_d 의 3X 초과, 표적 항원 K_d 의 4X 초과, 표적 항원 K_d 의 5X 초과, 표적 항원 K_d 의 6X 초과, 표적 항원 K_d 의 7X 초과, 표적 항원 K_d 의 8X 초과, 표적 항원 K_d 의 9X 초과, 표적 항원 K_d 의 10X 초과이다(예를 들어, 항체의 K_d 가 표적 항원에 대해 X^{-00} M인 경우,

또 다른 항원에 대한 항체의 Kd는 10X 초과, 또는 X^{-08} M일 수 있음), 100X 초과(예를 들어, 항체의 Kd가 표적 항원에 대해 X^{-10} M인 경우, 또 다른 항원에 대한 항체의 Kd는 10X 초과, 또는 X^{-08} M일 수 있음). 몇몇 경우에, 평형 결합 상수는 평형 결합 상수, K_a 또는 K_a 로 표현될 수 있다.

[0085] 평형 결합 상수는 다양한 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 몇몇 경우에, 개시된 항체에 대한 평형 결합 상수는 단백질 결합 검정에서 온(k_1) 및 오프(k_{-1}) 속도를 측정함으로써 결정된다. 평형 결합 상수를 결정하는 하나의 예시적인 방법은 바이오층 간섭계법(BLI)에 의한다. BLI는 용액 중에 결합 동역학을 결정할 수 있는 라벨 비함유 기술이다. 하나의 예시적인 방법에서, 항체는 인간 IgG일 수 있고, 항체는 제조사의 지시에 따라 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 칩(ForteBio(미국 캘리포니아주 덴로 파크))에 의해 포획될 수 있다. 다른 유형의 단백질 결합 검정은 면역공침; 이중분자 형광 보완; 친화도 전기영동; 풀-다운(Pull-down) 검정; 라벨 이동; 효모 2개-하이브리드 스크린; 파지 디스플레이; 광반응성 아미노산 유사체를 사용한 단백질 복합체의 생체내 가교 결합; Tandem 친화도 정제; 화학 가교결합; 화학 가교결합 이후 고질량 MALDI 질량 분광법; 척추(스트렙트로테인 상호작용 실험); 너다운(knock-down)과 조합된 정량적 면역침전; 근접성 결합 검정 바이오층 간섭계법; 이중 편광 간섭계법; 정적 광 산란; 동적 광 산란; 표면 플라즈몬 공명; 형광 편광/이방성; 형광 상관관계 분광학; 형광 공명 에너지 전달; NMR 다핵 이완 측정에 의한 단백질 활성 결정, 또는 NMR 이완의 비선형 회귀 분석과 조합된 2D-용액 중의 FT NMR 분광학 또는 2D-FT 분광학 데이터 세트; 단백질-단백질 도킹(docking); 등온 적정 열량법; 및 마이크로스케일 열확산을 포함한다.

[0086] 항체가 치료학적 적용에 사용되는 실시형태에서, 인자 Bb 항체의 하나의 특징은 이것이 인자 Bb의 하나 이상의 또는 이것에 의해 매개된 생물학적 활성을 조절하고/하거나 저해할 수 있다는 것이다. 이 경우에, 항체는 인자 Bb에 특이적으로 결합할 수 있고, 인자 Bb의 활성을 실질적으로 조절할 수 있고/있거나, 다른 단백질(예를 들어, 인자 C3)에 대한 인자 Bb의 결합을 저해할 수 있다. 몇몇 경우에, 항체는 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 이상 인자 Bb의 세린 프로테아제 활성을 저해할 수 있다.

[0087] 많은 실시형태에서, 인자 Bb 활성, 및 이 활성을 저해하는 항체의 능력은 10% 인간 혈청의 존재 하의 적혈구의 용해를 분석함으로써 측정된다. (AP)의 대안적인 경로의 활성화는 전통적인 경로보다 더 높은 농도의 혈청을 요한다. 일반적으로, 5mM EGTA의 존재 하의 5mM Mg^{++} 의 최종 농도는 EGTA가 Ca^{++} 를 우선적으로 킬레이트화하는 검정에서 사용된다. 대부분의 포유동물 중의 AP는 토끼 적혈구에 의해 동시에 활성화되어서, 이들은 편리한 표적이다. GVB⁰(콤포텍 프로덕츠)에 의해 3회 세척하고 5×10^8 /ml로 재현탁시킴으로써 토끼 적혈구(Complement Technology, Inc.)를 준비한다. 상이한 양의 항-인자 Bb 항체를 GVB⁰에 의해 희석한다. 연속 희석된 항-B 인자b 항체, 0.1M MgEGTA(콤포텍 프로덕츠), 1/2NHS(GVB⁰에 의해 1/2 희석된 정상 인간 혈청), 및 토끼 Er의 순서로 얼음에서 100 μ l의 반응물을 혼합한다. 이후, 진탕기에서 37°C에서 30분 동안 반응물을 항온처리한다. 1.0ml의 차가운 GVBE를 첨가한다. 대략 1000xg 이상에서 3분 동안 혼합하고 원심분리하여 세포를 펠렛화한다. 100 μ l의 상청액을 96웰 플레이트로 옮기고, 412nm에서 판독한다(SoftMax Pro 4.7.1). 그래프패드 프리즘 6을 사용하여 데이터를 분석한다.

[0088] 항원에 특이적으로 결합하는 모든 항체가 이의 정상 리간드에 대한 항원 결합을 차단하고 따라서 항원의 생물학적 효과를 저해하거나 조절할 수 없다. 당해 분야에 공지된 바대로, 이러한 효과는 항체가 결합하는 항원의 어떤 부분인지 및 항원 및 항체, 이러한 경우에, 인자 Bb 항체의 절대 및 상대 농도 둘 다에 따라 달라질 수 있다. 인자 Bb의 생물학적 활성을 저해하거나 조절할 수 있는지 고려하기 위해, 본 명세서에서 의미하는 바대로, 항체는 예를 들어 인자 Bb의 세린 프로테아제 활성 또는 인간 혈청 매개된 용혈을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 이상 저해할 수 있다.

[0089] 인자 Bb 활성을 저해하는 데 필요한 항체의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 항체가 인자 Bb에 어떻게 단단히 결합하는지에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 일 분자 또는 인자 Bb의 분자마다 더 적은 항체는 생물학적 활성을 저해하기에 충분할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 약 1,000:1 내지 약 1:1,000, 예컨대 약 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:100, 1:500, 1:1,000 이상의 인자 Bb 항체의 비율은 인자 Bb의 생물학적 활성을 저해하기에 필요할 수 있다. 많은 경우에, 인자 Bb 활성을 저해하는 능력은 인자 Bb의 농도 및/또는 인자 Bb 항체의 농도에 따라 달라질 수 있다.

[0090] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 (a) 스케폴드, 및 (b) 항원 결합 특이성 및 친화도에 결정적인 구역인 하나 또는 복수의 CDR을 포함한다. 상보성 결정 구역 또는 CDR은 항원 결합에 대한 주요 표면 접촉점을 구성

하는 항체의 구역이다. 하나 이상의 CDR은 항체의 스캐폴드 구조에 임베딩된다. 본 개시내용의 항체의 스캐폴드 구조는 항체의 프레임워크, 또는 단편 또는 이의 변이체일 수 있거나, 사실상 완전히 합성일 수 있다. 본 개시내용의 항체의 다양한 스캐폴드 구조는 본 명세서에 추가로 기재되어 있다.

[0091] 현재 개시된 항체의 바람직한 실시형태에서, 항체는 모 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 75%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 변이체 항체일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 변이체 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 서열은 모 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 서열과 75%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95% 동일하다. 대부분의 경우에, 변이체 항체는 CDR 서열에서 더 적은 변화를 가지거나 변화를 가지지 않을 것이고, 따라서, 대부분의 경우에, 유사한 친화도로 표적 항원에 결합할 것이다. 이 서열과 관련한 동일성 또는 유사성은 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 모 항체 아미노산 서열과 동일한(즉 동일한 잔기) 또는 유사한(즉, 일반 부사슬 특성에 기초한 동일한 기로부터의 아미노산 잔기, 하기 참조) 변이체 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 본 명세서에 정의된다. N 말단, C 말단 또는 가변 도메인의 밖의 항체 서열로의 내부 연장, 결실 또는 삽입은 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 주는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0092] CDR

[0093] 본 개시내용의 항체는 스캐폴드 구역 및 하나 이상의 CDR을 포함한다. 본 개시내용의 항체는 1개와 6개의 사이의 CDR(통상적으로 천연 발생 항체가 하는 것처럼), 예를 들어 1개의 중쇄 CDR1("HC CDR1" 또는 "HC CDR1") 및/또는 1개의 중쇄 CDR2("HC CDR2" 또는 "HC CDR2") 및/또는 1개의 중쇄 CDR3("HC CDR3" 또는 "HC CDR3") 및/또는 1개의 경쇄 CDR1("LC CDR1" 또는 "LC CDR1") 및/또는 1개의 경쇄 CDR2("LC CDR2" 또는 "LC CDR2") 및/또는 1개의 경쇄 CDR3("LC CDR3" 또는 "LC CDR3")을 가질 수 있다. 생물학적 재료, 예컨대 폴리펩타이드, 핵산, 숙주 세포 등과 연결되어 명세서에 걸쳐 사용되는 바대로 용어 "천연 발생"은 자연에서 발견되는 재료를 의미한다. 천연 발생 항체에서, 중쇄 CDR1은 통상적으로 약 다섯(5) 개 내지 약 일곱(7) 개의 아미노산을 포함하고, 중쇄 CDR2는 통상적으로 약 열여섯(16) 개 내지 약 열아홉(19) 개의 아미노산을 포함하고, 중쇄 CDR3은 통상적으로 약 세(3) 개 내지 약 스물다섯(25) 개의 아미노산을 포함한다. 경쇄의 CDR1은 통상적으로 약 열(10) 개 내지 약 열일곱(17) 개의 아미노산을 포함하고, 경쇄 CDR2는 통상적으로 약 일곱(7) 개의 아미노산을 포함하고, 경쇄 CDR3은 통상적으로 약 일곱(7) 개 내지 약 열(10) 개의 아미노산을 포함한다.

[0094] 본 개시내용의 아미노산은 천연 및 합성 아미노산(예를 들어, 호모페닐알라닌, 시트룰린, 오르니틴 및 노르류신)을 포함한다. 이러한 합성 아미노산은 특히 항체가 당해 분야에 널리 공지된 종래의 방법에 의해 실험실내 합성될 때 혼입될 수 있다. 또한, 펩티도미메틱(peptidomimetic), 합성 및 천연 발생 잔기/구조의 임의의 조합을 사용할 수 있다. 아미노산은 이미노산 잔기, 예컨대 프롤린 및 하이드록시프롤린을 포함한다. 아미노산 "R 기" 또는 "부사슬"은 (L)- 또는 (S)-구성에 있을 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 아미노산은 (L)- 또는 (S)-구성에 있을 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 아미노산은 프로테아제 또는 다른 생리학적 및/또는 저장 조건에 저항일 수 있는 펩티도미메틱 구조, 즉 펩타이드 또는 단백질 유사체, 예컨대 펩타이드(문헌[Simon *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367] 참조)(본 명세서에 참조로 인용됨)를 형성할 수 있다.

[0095] 천연 발생 항체 내의 CDR의 구조 및 특성은 하기 추가로 기재되어 있다. 간단히 말하면, 전통적인 항체 스캐폴드에서, CDR은 중쇄 및 경쇄 가변 구역에서 프레임워크 내에 임베딩되고, 여기서 이들은 항원 결합 및 인식을 담당하는 구역을 구성한다. 가변 구역은 프레임워크 구역(카바트 등의 문헌(1991)에 의해 지정된 프레임워크 구역 1-4, FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또한 상기 문헌[Chothia and Lesk, 1987] 참조) 내에 적어도 3개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다(문헌[Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; see also Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342: 877-883] 참조). 그러나, 본 개시내용에 의해 제공된 CDR은 전통적인 항체 구조의 항원 결합 도메인을 한정하기 위해 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 본 명세서에 기재된 바대로 다양한 다른 스캐폴드 구조에 임베딩될 수 있다.

[0096] 알라닌 스캐닝은 항-인자 Bb 항체의 결합 친화도를 변경하는 CDR 서열에서의 아미노산 위치를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0097] 개시된 항체에서 사용하기 위한 특정한 CDR은 표 1에 제시되어 있고, 밑줄 친 아미노산은 알라닌에 대한 치환이 결합을 실질적으로 감소시킨 것이다.

표 1

HC _A CDR1	G <u>D</u> I <u>F</u> S <u>S</u> H <u>W</u>	서열 번호 1
HC _A CDR2	E <u>I</u> L <u>P</u> R <u>S</u> G <u>I</u> T <u>H</u> Y <u>N</u> E <u>N</u> F <u>N</u> G	서열 번호 2
HC _A CDR3	A <u>I</u> N <u>W</u> E <u>D</u> S	서열 번호 3
LC _A CDR1	H <u>A</u> S <u>Q</u> N <u>V</u> N <u>V</u> W <u>L</u>	서열 번호 4
LC _A CDR2	K <u>A</u> S <u>N</u> L <u>H</u> T	서열 번호 5
LC _A CDR3	Q <u>Q</u> G <u>Q</u> S <u>Y</u> P <u>Y</u> T	서열 번호 6
HC _B CDR1	D <u>Y</u> Y <u>M</u> S	서열 번호 18
HC _B CDR2	F <u>S</u> R <u>H</u> R <u>V</u> Y <u>G</u> Y <u>T</u> P <u>E</u> Y <u>S</u> A <u>S</u> V <u>K</u> G	서열 번호 19
HC _B CDR3	D <u>N</u> P <u>G</u> Y <u>Y</u> A <u>M</u> D <u>Y</u>	서열 번호 20
LC _B CDR1	K <u>A</u> S <u>Q</u> S <u>V</u> D <u>Y</u> D <u>G</u> D <u>S</u> Y <u>M</u> N	서열 번호 21
LC _B CDR2	A <u>A</u> S <u>N</u> L <u>E</u> S	서열 번호 22
LC _B CDR3	Q <u>Q</u> S <u>N</u> A <u>D</u> P <u>Y</u> T	서열 번호 23

[0098]

[0099]

인자 B, 인자 Ba 및 인자 Bb에 대한 서열은 표 2에 기재되어 있다.

표 2

<p>인자 Bb(서열 번호 7)</p> <p>KIVLDPSGSMNIYLVLDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIEKVASYGVKPRY GLVTYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQLNEINVEDHKLKSGTNTKKAL QAVYSMMSWPDDVPPEGWNRTRHVIILMTDGLHNMGGDPI TVIDEIRDLL YIGKDRKNPREDYLDVYVFGVGPLVNQVINALASKKDNEQHVFKVKDME NLEDVFYQMIDESQSLSLCGMVWEHRKGTDYHKQPWQAKISVIRPSKGHE SCMGAVVSEYFVL TAAHCFTVDDKEHSIKVSVGGEKRDLIEVVL FHPNY NINGKKEAGIPEFYDYDVALIKLKNLKYGGTIRP ICLPCTEGTTRALRL PPTTTCQQKEELLPAQDIKALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKKGSCERD AQYAPGYDKVKDI SEVVT PRFLCTGGVSPYADPNTCRGDSGGPLIVHKRS RFIQVGVISWGVVDVCKNQKRQKQVPAHARDFHINLFQVLPWLKEKLQDE DLGFL</p>
<p>인자 Bb(서열 번호 16)</p> <p>밀출 친 신호 펩타이드</p> <p><u>MGSNLSPQLCLMPFILGLLGGVTT</u></p> <p>TPWSLARPQGSCSLEGVEIKGGSFRLLQEGQALEYVCPSTGFPYYPVQTRT CRSTGWSWTLKTQDQKTVRKAECRAIHCPRPHDFENGEYWPRSPYYNVSD EISFHCYDGYTLRGSANRTCQVNGRWSGQTAICDNGAGYCSNPGIPIGTR KVGSRQYRLEDSVTYHCSRGLTLRGSQRRTCQEGGSWSGTEPSCQDSFMYD TPQVEAEAFLLSSLTETIEGVDAEDGHGPGEQQRKIVLDPSGSMNIYLV LDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIEKVASYGVKPRYGLVTYATYPKIWVKV SEADSSNADWVTKQLNEINVEDHKLKSGTNTKKALQAVYSMMSWPDDVP PEGWNRTRHVIILMTDGLHNMGGDPI TVIDEIRDLLYIGKDRKNPREDY LDVYVFGVGPLVNQVINALASKKDNEQHVFKVKDMENLEDVFYQMIDES QSLSLCGMVWEHRKGTDYHKQPWQAKISVIRPSKGHESCMGAVVSEYF VLTAAHCFTVDDKEHSIKVSVGGEKRDLIEVVL FHPNYNINGKKEAGI PEFYDYDVALIKLKNLKYGGTIRP ICLPCTEGTTRALRLPPTTTCQQKE ELLPAQDIKALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKKGSCERDAQYAPGYDKV KDI SEVVT PRFLCTGGVSPYADPNTCRGDSGGPLIVHKRSRFIQVGV ISWGVVDVCKNQKRQKQVPAHARDFHINLFQVLPWLKEKLQDEDLGFL</p>
<p>인자 Bb(서열 번호 17)</p> <p>밀출 친 신호 펩타이드</p> <p><u>MGSNLSPQLCLMPFILGLLGGVTTTPWSLARPQGSCSLEGVEIKGGSFR</u> <u>LLQEGQALEYVCPSTGFPYYPVQTRTCRSTGWSWTLKTQDQKTVRKAECRA</u> <u>IHCPRPHDFENGEYWPRSPYYNVSD EISFHCYDGYTLRGSANRTCQVNGR</u> <u>WSGQTAICDNGAGYCSNPGIPIGTRKVGSRQYRLEDSVTYHCSRGLTLRGS</u> <u>QRRTCQEGGSWSGTEPSCQDSFMYDTPQVEAEAFLLSSLTETIEGVDAEDG</u> <u>HGPGEQQR</u></p>

[0100]

[0101]

또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 인자 Bb(서열 번호 7)에 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 임의의 서열 번호 1 내지 3 또는 서열 번호 18 내지 20의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 적어도 하나의 HC CDR 구역 및/또는 임의의 서열 번호 4-6 또는 서열 번호 21-23의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 적어도 하나의 LC CDR 구역을 포함한다. 본 개시내용의 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 구역은 표 3 및 서열 번호 8-15 또는 서열 번호 24-31에 도시되어 있다. 몇몇 실시형태에서, HC CDR3 또는 LC CDR3 구역을 가지는 항체가 특히 사용된다. 추가적으로, 몇몇 실시형태에서 항체는 임의의 서열 번호 1 내지 3 또는 서열 번호 18 내지 20의 HC CDR 구역으로부터 선택된 서열의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 1개의 CDR 및 임의의 서열 번호 4-6 또는 서열 번호 21-23의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 LC CDR을 가질 수 있다(예를 들어, 항체는 2개의 CDR 구역, 1개의 HC CDR 및 1개의 LC CDR을 가지고, 구체적인 실시형태는 HC CDR3 및 LC CDR3, 예를 들어 서열 번호 3 및 6 둘 다를 가지는 항체이다).

표 3

경쇄 서열
L1_A(서열 번호 8) DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNVNWLWVYQQKPGKAPKLLIFKASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED FATYYCQQGQSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L2_A(서열 번호 9) DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNVNWLWVYQQKPGKAPKLLIFKASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED FATYYCQQGQSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L3_A(서열 번호 10) DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNVNWLWVYQQKPGKAPKLLIFKAGNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED FATYYCQQGQSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L4_A(서열 번호 11) DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNVNWLWVYQQKPGKAPKLLIFKAGNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED FATYYCQQGQSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L1_B(서열 번호 24) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLTISLQ EPEDFAVYYCQQSNADPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L2_B(서열 번호 25) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLTISLQ EPEDGATYYCQQSNADPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L3_B(서열 번호 26) EIVLTQSPATLSLSPGERATLGCKASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSDFTLTISLQ EPEDFAVYYCQQSNADPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L4_B(서열 번호 27) EIVLTQSPATLSLSPGERATLGCKASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGQAPRLLIYAASNRESGIPARFSGSGSDFTLTISLQ EPEDFAVYYCQQSNADPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0102]

중쇄 서열	
H1 _A (서열 번호 12)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDI FSSHW IEW IRQAPGQGLEWMGE ILPRSG ITNYAQKFQGRVTF TADTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAINWEDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H2 _A (서열 번호 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDI FSSHW IEW IRQAPGQGLEWMGE ILPRSG ITHYAEKFQGRVTF TADTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAINWEDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H3 _A (서열 번호 14)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKADGDI FSSHW IEW IRQAPGQGLEWMGE ILPRSG ITHYAEKFQGRVTF TADTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAINWEDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H4 _A (서열 번호 15)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKADGDI FSSHW IEW VWRQAPGQGLEWMGE ILPRSG ITNYAEKFQGRVTF TADTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAINWEDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H1 _B (서열 번호 28)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFRDYYMSWVRQAPGKGLEWVGF SRHRVYGYTPEY AASVKGRFT I SRDNSKNTLY LQMNLSKTEDTAVYYCARDNPGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H2 _B (서열 번호 29)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFRDYYMSWVRQAPGKGLEWVGF SRHRVYGYTPEY AASVKGRFT I SRDNSKNTLY LQMNLSKTEDTAVYYCARDNPGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H3 _B (서열 번호 30)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGTTGFTFRDYYMSWVRQAPGKGLEWVGF SRHRVYGYTPEY AASVKGRFT I SRDNSKNTLY LQMNLSKTEDTAVYYCARDNPGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
H4 _B (서열 번호 31)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGTTGFTFRDYYMSWVRQAPGKGLEWVGF SRHRAYGYTPEY AASVKGRFT I SRDNSKNTLY LQMNLSKTEDTAVYYCARDNPGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

[0103]

[0104]

변이체 CDR 서열

[0105]

본 개시내용의 추가적인 양상은 인자 Bb에 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 단리된 항체는 임의의 서열 번호 12-15 또는 서열 번호 28-31의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 중쇄 아미노산 서열, 또는 임의의 서열 번호 8-11 또는 서열 번호 24-27의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0106]

본 개시내용의 추가적인 양상은 인자 Bb에 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 단리된 항체는 임의의 서열 번호 12-15 또는 서열 번호 28-31의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 중쇄 아미노산 서열, 및 임의의 서열 번호 8-11 또는 서열 번호 24-27의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 중쇄 서열이 임의의 경쇄 서열과 혼합되고 일치될 수 있다는 것에 주목한다.

[0107]

또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 C5에 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열 번호 1 내지 3 또는 서열 번호 18 내지 20의 (상기 기재된) 임의의 HC CDR1, HC CDR2, 또는 HC CDR3 구역의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 1개의 HC CDR 및/또는 서열 번호 4-6 또는 서열 번호 21-23의 (상기 기재된) 임의의 LC CDR1, LC CDR2, 또는 LC CDR3 구역의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 1개의 LC CDR을 포함한다. 이 실시형태에서, HC CDR3 또는 LC CDR3 구역을 가지는 항체가 특히 사용된다. 추가적인 실시형태는 임의의 서열 번호 1 내지 3 또는 서열 번호 18 내지 20의 HC CDR 구역으로부터 선택된 서열의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 1개의 CDR 및 임의의 서열 번호 4-6 또는 서열 번호 21-23의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 LC CDR 구역을 가지는 항체를 사용한다(예를 들어, 항체는 2개의 CDR 구역, 1개의 HC CDR 및 1개의 LC CDR을 가지고, 구체적인 실시형태는 HC CDR3 및 LC

CDR3 구역, 예를 들어 서열 번호 3 및 6 둘 다를 가지는 항체이다).

- [0108] 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 도시된 서열로부터 하나 초과 CDR을 가지는 임의의 항체의 경우, 도시된 서열로부터 독립적으로 선택된 CDR의 임의의 조합이 유용하다. 따라서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 독립적으로 선택된 CDR을 가지는 항체를 생성할 수 있다. 그러나, 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 구체적인 실시형태는 일반적으로 비반복적인 CDR의 조합을 이용하고, 예를 들어 항체는 일반적으로 2개의 HC CDR2 구역 등에 의해 제조되지 않는다.
- [0109] 본 개시내용의 추가적인 양상은 인자 Bb에 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 단리된 항체는 임의의 서열 번호 12-15 또는 서열 번호 28-31의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 중쇄 아미노산 서열, 또는 임의의 서열 번호 8-11 또는 서열 번호 24-27의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0110] 본 개시내용의 추가적인 양상은 인자 Bb에 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 단리된 항체는 임의의 서열 번호 12-15 또는 서열 번호 28-31의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 중쇄 아미노산 서열, 및 임의의 서열 번호 8-11 또는 서열 번호 24-27의 두(2) 개 이하의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 중쇄 서열이 임의의 경쇄 서열과 혼합되고 일치될 수 있다는 것에 주목한다.
- [0111] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 개별 변이체 CDR 사이의 아미노산 상동성, 유사성, 또는 동일성은 본 명세서에 개시된 서열과 비교할 때 적어도 80%이다. 많은 경우에, aa 상동성, 유사성, 또는 동일성은 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99%이다.
- [0112] 서열 동일성/상동성
- [0113] 당해 분야에 공지된 바대로, 다수의 상이한 프로그램은 단백질 또는 핵산이 공지된 서열에 가져야 하는 서열 동일성 또는 유사성의 정도를 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0114] 아미노산 서열의 경우, 서열 동일성 및/또는 유사성은 문헌[Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 서열 동일성 알고리즘, 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443]의 서열 동일성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444]의 유사성 방법에 대한 조사, 이 알고리즘(Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group)(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)의 컴퓨터 실행, 바람직하게는 디폴트 설정을 이용하여 또는 검사에 의해 문헌[Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395]에 기재된 베스트 피트 서열 프로그램(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 당해 분야에 공지된 표준 기법을 이용하여 결정된다. 바람직하게는, 동일성 백분율은 1의 불일치 패널티; 1의 갭 패널티; 0.33의 갭 크기 패널티; 및 30의 연결 패널티의 매개변수에 기초하여 FastDB에 의해 계산된다("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.).
- [0115] 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP는 진행성 쌍 지음 정렬을 사용하여 관련 서열의 그룹으로부터 다수의 서열 정렬을 생성한다. 이것은 또한 정렬을 생성하기 위해 사용된 클러스터링 관계를 보여주는 나무를 도시한다. PILEUP는 문헌[Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360]의 진행성 정렬 방법의 단순화를 이용하고; 상기 방법은 문헌[Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153]에 의해 기재된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 매개변수는 3.00의 디폴트 갭 중량, 0.10의 디폴트 갭 길이 중량, 및 가중 말단 갭을 포함한다.
- [0116] 유용한 알고리즘의 또 다른 예는 문헌[Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; and Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5877]에 기재된 BLAST 알고리즘이다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 문헌[Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480]로부터 얻은 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 여러 조사 매개변수를 이용하고, 이들 중 대부분은 디폴트 값에 설정된다. 조정 가능한 매개변수는 단백질에 대한 하기 값에 의해 설정된다: 오버랩 스패น(overlap span)=1, 오버랩 분획=0.125, 워드 한계치, T=11. HSP S 및 HSP S2 매개변수는 동적 값이고, 특정한 서열의 조성물 및 관심 있는 서열이 조사되는 특정한 데이터베이스의 조성물에 따라 그 자체가 프로그램에 의해 확립되지만; 값은 민감성을 증가시키도록 조정될 수 있다.
- [0117] 추가적인 유용한 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402]에 보고된 바대로 갭핑 BLAST이다. 갭핑 BLAST는 BLOSUM-62 치환 스코어를 이용한다; 9로 설정된 한계치 T 매개변수; 비갭핑 연장

을 촉발하고, k의 갭 길이를 충전하기 위한 2개 히트 방법, 10+k의 비용; 16으로 설정된 X_u , 및 데이터베이스 조사 단계에 대해 40으로 그리고 알고리즘의 출력 단계에 대해 67로 설정된 X_g . 갭핑 정렬은 약 22비트에 상응하는 스코어에 의해 촉발된다.

- [0118] 일반적으로, 개별 변이체 CDR 또는 가변 구역 사이의 아미노산 상동성, 유사성 또는 동일성은 본 명세서에 기재된 서열에 적어도 80%, 더 통상적으로 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 거의 100%의 증가한 상동성 또는 동일성이다.
- [0119] 유사한 방식으로, 개시된 항체의 핵산 서열과 관련하여 핵산 서열 동일성 백분율(%)은 항체의 암호화 서열에서 뉴클레오타이드 잔기와 동일한 후보 서열에서의 뉴클레오타이드 잔기의 백분율이다. 특정한 방법은, 각각 1 및 0.125로 설정된 오버랩 스패 및 오버랩 분획으로, 디폴트 매개변수로 설정된 WU-BLAST-2의 BLASTN 모듈을 이용한다.
- [0120] 일반적으로, 개별 변이체 CDR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 변이체 가변 도메인 서열 사이의 핵산 서열 상동성, 유사성 또는 동일성은 적어도 80%, 및 더 통상적으로 바람직하게는 적어도 85%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 거의 100%의 증가한 상동성 또는 동일성이다. 많은 경우에, 비동일한 핵산 서열은 유전자 코드의 축퇴성 때문에 동일한 아미노산 서열을 암호화할 수 있다.
- [0121] 뉴클레오타이드 서열 사이의 상동성은 서로에 하이브리드화하는 이의 능력에 의해 대해 한정된다. 몇몇 실시형태에서, 선택적 하이브리드화는 높은 특이성을 가지는 결합을 의미할 수 있다. 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및 이의 단편은 비특이적 핵산에 대한 검출 가능한 결합의 상당한 양을 최소화하는 하이브리드화 및 세척 조건 하에 핵산 가닥에 선택적으로 하이브리드화한다. 높은 엄격도 조건은 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 선택적 하이브리드화 조건을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0122] 하이브리드화 반응의 엄격도는 당해 분야의 당업자에 의해 용이하게 결정 가능하고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따른 경험적 계산이다. 일반적으로, 더 긴 프로브는 적절한 어닐링을 위한 더 높은 온도를 요하는 반면, 더 짧은 프로브는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 하이브리드화는 일반적으로 상보성 가닥이 이의 용점 미만의 환경에 있을 때 변성된 DNA가 재어닐링하는 능력에 따라 달라진다. 프로브와 하이브리드화 가능한 서열 사이의 원하는 상동성의 정도가 더 높으면, 사용될 수 있는 상대 온도가 더 높다. 그 결과, 더 높은 상대 온도는 반응 조건이 더 엄격하게 만드는 경향이 있는 반면, 더 낮은 온도는 덜 그럴 것이란 결론이다. 하이브리드화 반응의 엄격도의 추가적인 상세내용 및 설명을 위해, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0123] 높은 엄격도 조건은 당해 분야에 공지되어 있다; 예를 들어 문헌[상기 Sambrook 등의 문헌(2001) 및 Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992](이들 둘 다 본 명세서에 참조로 인용됨)을 참조한다. 엄격한 조건은 서열 의존적이고, 상황에서 다를 것이다. 더 긴 서열은 더 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드화한다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 가이드는 문헌[Tijssen, *Techniques In Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에서 발견된다.
- [0124] 몇몇 실시형태에서, 엄격한 또는 매우 엄격도 조건은 (1) 50°C에서 예를 들어 0.015M 염화나트륨/0.0015M 스티르산나트륨/0.1% 도데실 황산 나트륨을 세척하기 위한 낮은 이온 농도 및 높은 온도를 사용하거나; (2) 하이브리드화 동안 42°C에서 변성화제, 예컨대 폼아마이드, 예를 들어 50%(v/v) 폼아마이드와 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficol1)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50mM 인산나트륨 완충제(pH 6.5)와 750mM 염화나트륨, 75mM 스티르산나트륨을 사용하거나; 또는 (3) 42°C에서의 0.2XSSC(염화나트륨/스티르산나트륨) 및 55°C에서의 50% 폼아마이드 중의 세척과 42°C에서 50% 폼아마이드, 5XSSC(0.75M NaCl, 0.075M 스티르산나트륨), 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 나트륨 피로포스페이트, 5X 덴하르트(Denhardt) 용액, 음과처리 연어 정자 DNA(50μg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 설페이트, 이후 55°C에서의 0.1XSSC 함유 EDTA로 이루어진 고엄격도 세척을 사용하는 것에 의해 확인될 수 있다.
- [0125] 일반적으로, 엄격한 조건은 한정된 이온 농도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열 용점(T_m)보다 약 5-10°C 낮도록 선택된다. T_m은 표적 서열에 상보적인 50%의 프로브가 평형으로 표적 서열에 하이브리드화하는(표적 서열이 초과로 존재하면서, T_m에서, 50%의 프로브가 평형으로 점유됨) (한정된 이온 농도, pH 및 핵산 농도 하에) 온도이다. 엄격한 조건은 염 농도가 약 1.0M 나트륨 이온 미만, 통상적으로 pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0M

나트륨 이온 농도(또는 다른 염)인 것이고, 온도는 짧은 프로브(예를 들어, 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 30°C 및 긴 프로브(예를 들어, 50개 초과 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 60°C이다. 엄격한 조건은 탈안정화제, 예컨대 폼아마이드의 첨가에 의해 또한 달성될 수 있다.

- [0126] 또 다른 실시형태에서, 덜 엄격한 하이브리드화 조건이 사용될 수 있다; 예를 들어, 당해 분야에 공지된 바대로 보통 또는 낮은 엄격도 조건을 이용할 수 있다; 상기 Sambrook 등의 문헌(2001); 상기 Ausubel 등의 문헌(1992) 및 상기 Tijssen의 문헌(1993) 참조.
- [0127] 몇몇 경우에, 보통의 엄격한 조건은 세척 용액의 사용 및 상기 기재된 것보다 덜 엄격한 하이브리드화 조건(예를 들어, 온도, 이온 농도 및 SDS(%))을 포함할 수 있다. 보통의 엄격한 조건의 예는 20% 폼아마이드, 5XSSC(150mM NaCl, 15mM 트라이소듐 시트레이트), 50mM 인산나트륨(pH 7.6), 5X 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20mg/ml 변성 공유 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중의 37°C에서의 밤샘 항온처리, 이어서 약 37-50°C에서의 1XSSC 중의 필터 세척이다. 당업자는 인자, 예컨대 프로브 길이 등을 수용하기에 필요한 온도, 이온 농도 등을 어떻게 조정할지를 인식할 것이다.
- [0128] 몇몇 실시형태에서, 개시된 항체 및 이의 변이체는 항체를 암호화하는 DNA 서열 내의 뉴클레오타이드의 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 이것은 변이체를 암호화하는 DNA를 제조하기 위해 카세트 또는 PCR 돌연변이유발 또는 당해 분야에 널리 공지된 다른 기법을 이용하고, 이후 본 명세서에 기재된 바대로 세포 배양물 중에 제조된 DNA를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 몇몇 경우에, 약 100-150개까지의 잔기를 가지는 변이체 CDR을 포함하는 항체 단편은 확립된 기법을 이용하여 실험실내 합성에 의해 제조될 수 있다. 이 변이체 단편은 인자 Bb에 대한 결합 및 보체의 저해와 같은 천연 발생 유사체와 동일한 정성적 생물학적 활성을 나타낼 수 있지만, 하기 더 완전히 기재된 것처럼 변형 특징을 가지는 변이체가 또한 선택될 수 있다.
- [0129] 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위 또는 구역이 미리 결정되지만, 특히 돌연변이는 미리 결정될 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서 돌연변이를 최적화하기 위해, 랜덤 돌연변이유발은 표적 코돈 또는 구역, 및 발현된 항체 CDR 또는 최적 원하는 항체 활성에 대해 스크리닝되는 가변 구역 서열 변이체에서 수행될 수 있다. 공지된 서열을 가지는 DNA에서의 미리 결정된 부위에서 치환 돌연변이를 만드는 기법, 예를 들어 M13 프라이머 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발이 널리 공지되어 있다. 항체 활성, 예컨대 인자 Bb 결합의 검정을 이용하여 돌연변이체의 스크리닝을 수행한다.
- [0130] 아미노산 치환은 통상적으로 단일 잔기이고; 삽입은 보통 약 한(1) 개 내지 약 스무(20) 개의 아미노산 잔기의 차수에 있을 것이지만, 상당히 더 큰 삽입이 허용될 수 있다. 결실은 약 한(1) 개 내지 약 스무(20) 개의 아미노산 잔기 범위이지만, 몇몇 경우에 결실은 훨씬 더 클 수 있다.
- [0131] 치환, 결실, 삽입 또는 임의의 이들의 조합은 최종 유도체 또는 변이체에 도달하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로 이 변화는 분자의 변형을 최소화하기 위해 몇몇 아미노산, 특히 항체의 면역원성 및 특이성에서 이루어진다. 그러나, 더 큰 변화는 소정의 상황에서 허용될 수 있다. 보존적 치환은 일반적으로 표 4에 기재된 하기 차트에 따라 만들어진다.

표 4

원래 잔기	예시적인 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Set
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0132]

[0133]

기능 또는 번역학적 동일성의 변화는 표 4에서 보이는 것보다 덜 보존적인 치환을 선택함으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 더 상당히게 영향을 미치는 치환이 만들어질 수 있다: 변경 부위에서의 폴리펩타이드 골격의 구조, 예를 들어 알파 나선 또는 베타 시트 구조; 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수화도; 또는 부사슬의 벌크. 폴리펩타이드의 특성에 가장 큰 변화를 생성시키는 것으로 일반적으로 예상되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예를 들어 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예를 들어 류실, 아이소류실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; (c) 양전기 부사슬을 가지는 잔기, 예를 들어 라이실, 아르기닐, 또는 히스티딜이 음전기 잔기, 예를 들어 글루타밀 또는 아스파르틸에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것; 또는 (d) 벌키한 부사슬을 가지는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 부사슬을 가지지 않는 것, 예를 들어 글리신에 대해(또는 이에 의해) 치환된 것이다.

[0134]

변이체는 통상적으로 동일한 정성적 생물학적 활성을 나타내고, 천연 발생 유사체와 동일한 번역 반응을 발생시킬 것이지만, 변이체는 또한 필요한 바대로 개시된 인자 Bb 항체의 특징을 변형시키도록 선택된다. 대안적으로, 변이체가 선택될 수 있고, 개시된 항체의 생물학적 활성이 변경된다. 예를 들어, 글라이코실화 부위는 본 명세서에 기재된 바대로 변경되거나 제거될 수 있다.

[0135]

1-6 및 8-15 및 서열 번호 18-23 및 서열 번호 24-31에 상동성인 폴리펩타이드 서열이 본 명세서에 개시되어 있다. 본 명세서에 개시된 폴리펩타이드는 개시된 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 청구된 폴리펩타이드는 개시된 서열과 비교되는 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 치환된 아미노산과 특징을 공유하는 아미노산을 포함할 수 있다. 다양한 경우에, 보존적 치환은 폴리펩타이드의 구조 또는 기능의 상당한 변화 없이 만들어질 수 있다.

[0136]

보존적 아미노산 치환은 부사슬의 상대 유사성, 크기, 전하, 소수화도, 친수화도, 등전점 등에 기초하여 만들어질 수 있다. 다양한 경우에, 치환은 일상적 시험에 의해 단백질의 기능에 대한 이의 효과에 대해 평가될 수 있다. 보존된 아미노산 치환은 유사한 친수화도 값을 가지는 아미노산을 가지고, 아미노산은 아미노산의 소수화도 및 전하에 기초할 수 있는 수치화법 지수를 가진다. 다양한 경우에, 보존된 아미노산 치환은 예를 들어 비극성 아미노산, 산성 아미노산, 염기성 아미노산 및 중성 아미노산의 동일한 종류의 아미노산 사이에 만들어질 수 있다. 보존적 치환은 또한 크기 또는 용적에 기초할 수 있다. 아미노산은 소정의 구조, 예컨대 알파 나선, 베타 시트 또는 분자내 또는 분자간 상호작용을 형성하거나 파괴하는 능력에 기초하여 또한 분류될 수 있다. 다양한

경우에 보존적 아미노산 치환은 하나 초과에 특징에 기초한다.

- [0137] 현재 개시된 폴리펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산 둘 다를 포함할 수 있다. 다양한 경우에, 천연 아미노산 부사슬은 비천연 부사슬에 의해 치환될 수 있다. 다양한 경우에, 아미노산은 유도체화될 수 있다.
- [0138] 개시된 폴리펩타이드는 서열 번호 1-6 및 8-15 및 서열 번호 18-31의 서열과 상동성인 폴리펩타이드를 포함한다. 상동성은 동일성(%) 또는 유사성(%) 또는 양성(%)으로서 표현될 수 있다. 다양한 경우에, 동일성(%)은 2개의 정렬된 폴리펩타이드 사이에 동일한 아미노산의 백분율이고, 유사성(%) 또는 양성(%)은 비동일하지만 보존적 치환을 나타내는 아미노산의 백분율이다. 보존적 치환은 유사 전하의 아미노산, 유사 크기의 아미노산, 유사 극성의 아미노산 등의 치환일 수 있다. 예를 들어, 아르기닌에 대한 라이신은 전하가 고려될 때 보존적 치환으로 생각될 수 있다.
- [0139] 다양한 경우에, 2개의 폴리펩타이드는 알고리즘, 예를 들어 BLASTp에 의해 정렬될 수 있다. 다양한 경우에, BLASTp 매개변수는 2개 초과에 폴리펩타이드의 길이에 동일하거나, 이보다 크거나 이보다 작은 최대 표적 서열 길이로 설정될 수 있고, 예상 한계치는 10으로 설정될 수 있고, 워드 크기는 3으로 설정될 수 있고, 존재에 대해 11 및 연장에 대해 1의 갭 비용으로 스코어링 매트릭스는 BLOSUM62일 수 있다. BLASTp는 "동일성" 및 "양성"으로 정렬된 폴리펩타이드의 상동성을 보고할 수 있다. 정렬된 서열은 정렬을 달성하기 위해 갭을 포함할 수 있다.
- [0140] 다양한 경우에, 아미노산 서열의 상동성은 상기 기재된 바와 같이 최적으로 정렬될 때 동일성 또는 양성의 백분율을 반영할 수 있다. 다양한 경우에, 상동성(%) (양성(%) 또는 동일성(%)은 비교창 내에 정렬된 아미노산의 수를 나눔으로써 계산될 수 있다. 2개의 폴리펩타이드가 동일하지 않은 길이인 경우, 비교창은 1개 또는 다른 폴리펩타이드의 전체 길이일 수 있다. 다른 경우에, 비교창은 1개의 폴리펩타이드의 부분일 수 있다. 다양한 경우에, 2개의 폴리펩타이드 서열의 상동성 또는 동일성을 측정하기 위한 비교창은 약 40개 초과에 aa(아미노산), 45개의 aa, 50개의 aa, 55개의 aa, 60개의 aa, 65개의 aa, 70개의 aa, 75개의 aa, 80개의 aa, 85개의 aa, 90개의 aa, 95개의 aa, 100개의 aa, 150개의 aa, 또는 200개의 aa 및/또는 약 200개 미만의 aa, 150개의 aa, 100개의 aa, 95개의 aa, 90개의 aa, 85개의 aa, 80개의 aa, 75개의 aa, 70개의 aa, 65개의 aa, 60개의 aa, 55개의 aa, 50개의 aa, 또는 45개의 aa이다. 몇몇 실시형태에서, CDR 서열에서처럼, 비교창은 40개 미만의 aa, 예를 들어 약 25개 미만의 aa, 24개의 aa, 23개의 aa, 22개의 aa, 21개의 aa, 20개의 aa, 19개의 aa, 18개의 aa, 17개의 aa, 16개의 aa, 15개의 aa, 14개의 aa, 13개의 aa, 12개의 aa, 11개의 aa, 10개의 aa, 9개의 aa, 8개의 aa, 7개의 aa, 6개의 aa, 5개의 aa, 또는 4개의 aa, 및 약 3개 초과에 aa, 4개의 aa, 5개의 aa, 6개의 aa, 7개의 aa, 8개의 aa, 9개의 aa, 10개의 aa, 11개의 aa, 12개의 aa, 13개의 aa, 14개의 aa, 15개의 aa, 16개의 aa, 17개의 aa, 18개의 aa, 19개의 aa, 20개의 aa, 21개의 aa, 22개의 aa, 23개의 aa, 또는 24개의 aa일 수 있다.
- [0141] 다양한 경우에, 청구된 아미노산 서열은 약 60% 초과, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 및/또는 약 100% 미만, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80%, 75%, 또는 70%인 소정의 비교창에 걸쳐 동일성(%) 또는 상동성(%) (양성(%)을 가질 수 있다.
- [0142] 다양한 경우에, 서열 정렬은 동적, 국소 및 전체 정렬을 포함하는 다양한 알고리즘을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482]의 알고리즘; 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443]의 정렬 알고리즘; 문헌[Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444]의 유사성 방법. 다양한 경우에, 컴퓨터 프로그램은 이들 알고리즘(예컨대, EMBOSS, GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA BLAST, BLOSUM 등)을 실행할 수 있다.
- [0143] 대안적인 경우에, 아미노산 잔기가 동일한 종류에서 또 다른 것에 치환될 때, 예를 들어 아미노산이 하기와 같은 비극성, 산성, 염기성 및 중성 종류로 분할될 때 보존된 아미노산 치환이 이루어질 수 있다: 비극성: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; 산성: Asp, Glu; 염기성: Lys, Arg, His; 중성: Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.
- [0144] 몇몇 경우에, 아미노산 잔기가 (예를 들어, + 또는 - 2.0의 값 내) 유사한 친수화도 값을 가지는 또 다른 것에 대해 치환될 때 보존된 아미노산 치환이 이루어질 수 있고, 하기가 약 -1.6의 수치요법 지수를 가지는 아미노산일 수 있을 때, 예컨대 Tyr(-1.3) 또는 Pro(-1.6)이 하기 아미노산 잔기로 배정된다: Arg(+3.0); Lys(+3.0); Asp(+3.0); Glu(+3.0); Ser(+0.3); Asn(+0.2); Gln(+0.2); Gly(0); Pro(-0.5); Thr(-0.4); Ala(-0.5); His(-0.5); Cys(-1.0); Met(-1.3); Val(-1.5); Leu(-1.8); Ile(-1.8); Tyr(-2.3); Phe(-2.5); 및 Trp(-3.4).
- [0145] 대안적인 경우에, 아미노산 잔기가 (예를 들어, + 또는 - 2.0의 값 내) 유사한 수치요법 지수를 가지는 또 다른

것에 대해 치환될 때 보존된 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 이러한 경우에, 각각의 아미노산 잔기는 하기와 같은 바대로 이의 소수화도 및 전하 특징에 기초하여 수치요법 지수가 배정될 수 있다: Ile(+4.5); Val(+4.2); Leu(+3.8); Phe(+2.8); Cys(+2.5); Met(+1.9); Ala(+1.8); Gly(-0.4); Thr(-0.7); Ser(-0.8); Trp(-0.9); Tyr(-1.3); Pro(-1.6); His(-3.2); Glu(-3.5); Gln(-3.5); Asp(-3.5); Asn(-3.5); Lys(-3.9); 및 Arg(-4.5).

[0146] 대안적인 경우에, 보존적 아미노산 변화는 친수화도 또는 소수화도, 크기 또는 용적, 또는 전하의 고려에 기초한 변화를 포함한다. 아미노산은 주로 아미노산 부사슬의 특징에 따라 일반적으로 소수성 또는 친수성으로서 분류될 수 있다. Eisenberg 등(J. Mol. Bio. 179:125-142, 184)의 정규화 공통 소수화도 스케일에 기초하여, 소수성 아미노산은 0 초과와 소수화도를 나타내고, 친수성 아미노산은 0 미만의 친수화도를 나타낸다. 유전적으로 암호화된 소수성 아미노산은 Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met 및 Trp를 포함하고, 유전적으로 암호화된 친수성 아미노산은 Thr, His, Glu, Gln, Asp, Arg, Ser 및 Lys를 포함한다. 비유전적으로 암호화된 소수성 아미노산은 t-뷰틸알라닌을 포함하는 반면, 비유전적으로 암호화된 친수성 아미노산은 시트룰린 및 호모시스테인을 포함한다.

[0147] 소수성 또는 친수성 아미노산은 이의 부사슬의 특징에 기초하여 추가로 세분될 수 있다. 예를 들어, 방향족 아미노산은 하나 이상의 치환기, 예컨대 --OH, --SH, --CN, --F, --Cl, --Br, --I, --NO₂, --NO, --NH₂, --NHR, --NRR, --C(O)R, --C(O)OH, --C(O)OR, --C(O)NH₂, --C(O)NHR, --C(O)NRR 등(여기서, R은 독립적으로 (C₁-C₆) 알킬, 치환된 (C₁-C₆) 알킬, (C₀-C₆) 알케닐, 치환된 (C₁-C₆) 알케닐, (C₁-C₆) 알키닐, 치환된 (C₀-C₆) 알키닐, (C₅-C₂₀) 아릴, 치환된 (C₀-C₂₀) 아릴, (C₆-C₂₆) 알크아릴, 치환된 (C₆-C₂₆) 알크아릴, 5-20원 헤테로아릴, 치환된 5-20원 헤테로아릴, 6-26원 알크헤테로아릴 또는 치환된 6-26원 알크헤테로아릴이다)을 함유할 수 있는 적어도 하나의 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 함유하는 부사슬을 가지는 소수성 아미노산이다. 유전적으로 암호화된 방향족 아미노산은 Phe, Tyr 및 Trp를 포함한다.

[0148] 비극성 또는 극성 아미노산은 생리학적 pH에서 비하전되고, 2개의 원자에 의해 공통으로 공유한 전자의 쌍이 일반적으로 2개의 원자의 각각에 의해 동등하게 보유되는 결합을 가지는 부사슬(즉, 부사슬은 극성이 아님)을 가지는 소수성 아미노산이다. 유전적으로 암호화된 비극성 아미노산은 Gly, Leu, Val, Ile, Ala 및 Met를 포함한다. 비극성 아미노산은 지방족 탄화수소 부사슬을 가지는 소수성 아미노산인 지방족 아미노산으로 추가로 세분될 수 있다. 유전적으로 암호화된 지방족 아미노산은 Ala, Leu, Val 및 Ile를 포함한다.

[0149] 극성 아미노산은 생리학적 pH에서 비하전되고, 2개의 원자에 의해 공통으로 공유한 전자의 쌍이 하나의 원자에 의해 더 밀접하게 있는 결합을 가지는 부사슬을 가지는 친수성 아미노산이다. 유전적으로 암호화된 극성 아미노산은 Ser, Thr, Asn 및 Gln을 포함한다.

[0150] 산성 아미노산은 7 미만의 부사슬 pKa 값을 가지는 친수성 아미노산이다. 산성 아미노산은 통상적으로 수소 이온의 소실로 인해 생리학적 pH에서 음으로 하전된 부사슬을 가진다. 유전적으로 암호화된 산성 아미노산은 Asp 및 Glu를 포함한다. 염기성 아미노산은 7 초과와 부사슬 pKa 값을 가지는 친수성 아미노산이다. 염기성 아미노산은 하이드로늄 이온과의 회합으로 인해 생리학적 pH에서 양으로 하전된 부사슬을 통상적으로 가진다. 유전적으로 암호화된 염기성 아미노산은 Arg, Lys 및 His를 포함한다.

[0151] 아미노산 서열 동일성 값(%)은 비교창에서 "더 긴" 서열의 잔기의 전체 수로 나눈 일치하는 동일한 잔기의 수에 의해 결정된다. "더 긴" 서열은 비교창에서의 대부분의 실제 잔기를 가지는 것이다(정렬 스코어를 최대화하기 위해 WU-Blast-2에 의해 도입된 갭은 무시됨).

[0152] 정렬은 정렬하고자 하는 서열의 갭의 도입을 포함할 수 있다. 또한, 개시된 서열 폴리펩타이드에 의해 암호화된 단백질보다 많거나 적은 아미노산을 함유하는 서열의 경우, 일 경우에 서열 동일성의 백분율은 아미노산의 전체 수에 대한 동일한 아미노산의 수에 기초하여 결정될 것으로 이해된다. 동일성 백분율 계산에서 상대 가중은 서열 변이, 예컨대, 삽입, 결실, 치환 등의 다양한 표시로 배정되지 않는다.

[0153] 일 경우에, 유일한 동일성은 양으로 점수 매겨지고(+1), 갭을 포함하는 서열 변이의 모든 형태는 서열 유사성 계산에 대해 하기 기재된 바와 같은 가중 스케일 또는 매개변수에 대한 필요성을 제거하는, "0"의 값이 배정된다. 서열 백분율 동일성은 예를 들어 정렬된 구역에서의 "더 짧은" 서열의 잔기의 전체 수로 일치하는 동일한 잔기의 수를 나누고 100을 곱함으로써 계산될 수 있다. "더 긴" 서열은 정렬된 구역에서 대부분의 실제 잔기를 가지는 것이다.

[0154] 스캐폴드

- [0155] 본 명세서에 기재된 바대로, 본 개시내용의 항체는 상기 기재된 CDR(들)이 그래프팅될 수 있는 스캐폴드 구조를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 스캐폴드 구조는 전통적인 항체 구조, 즉 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체이다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 항체 조합은 중쇄 및/또는 경쇄를 구성하는 추가적인 성분(프레임워크, J 및 D 구역, 불변 구역 등)을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태는 인간 스캐폴드 성분의 사용을 포함한다.
- [0156] 따라서, 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 전통적인 항체의 스캐폴드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 개시된 항체는 각각 인간 및 단일클론 항체, 이종특이적 항체, 다이아바디, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 항체 융합 및 각각의 단편일 수 있다. 상기 기재된 CDR 및 CDR의 조합은 임의의 하기 스캐폴드로 그래프팅될 수 있다.
- [0157] 본 개시내용의 키메라 항체는 특정한 종으로부터 유래한 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서 항-인자 Bb 항체는 인간 Fc 도메인을 포함하는 키메라 항체인 반면, 항체의 나머지는 상응하는 마우스 또는 설치류 서열과 동일하거나 상동성일 수 있다. 단편이 원하는 생물학적 활성을 나타내고, 또 다른 종, 항체의 종류, 또는 항체의 하위종류(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855)로부터 유래한 서열을 포함하는 한, 키메라 항체는 이러한 항체의 단편일 수 있다.
- [0158] 몇몇 실시형태에서, 현재 개시된 항-인자 Bb 항체의 가변 구역은 프레임워크 구역(상기 카밧 등의 문헌(1991)에 의해 지정된 프레임워크 구역 1-4, FR1, FR2, FR3 및 FR4; 또한 상기 문헌[Chothia and Lesk, 1987] 참조) 내에 임베딩된 적어도 3개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함한다(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; 또한 문헌[Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883] 참조).
- [0159] 몇몇 경우에, 항체는 중쇄 가변 도메인 서열 또는 경쇄 가변 도메인 서열로 이루어질 수 있다. 몇몇 경우에, 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 서열은 표 3의 서열로부터 선택된 서열을 포함할 수 있다.
- [0160] 전통적인 항체 구조 단위는, 대부분의 경우에, 사합체를 포함한다. 각각의 사합체는 통상적으로 폴리펩타이드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 이루어지고, 각각의 쌍은 1개의 경쇄(통상적으로 약 25kDa의 분자량을 가짐) 및 1개의 중쇄(통상적으로 약 50-70kDa의 분자량을 가짐)를 가진다. 각각의 사슬의 아미노 말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100개 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 구역을 포함한다. 각각의 사슬의 카복시 말단 부분은 불변 구역을 한정하는 반면, 중쇄는 전체 3개의 불변 구역(CH1, CH2 및 CH3)을 포함할 수 있고, 불변 구역은 이펙터 기능을 조절하는 것을 도울 수 있다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파, 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 아이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 한정한다. IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 여러 하위종류를 가진다. IgM은 IgM1 및 IgM2(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 하위종류를 가진다.
- [0161] 경쇄 및 중쇄 내에, 가변 및 불변 구역은 약 열두(12) 개 이상의 아미노산의 "J" 구역에 의해 연결되고, 중쇄는 또한 약 열(10) 개의 아미노산의 "D" 구역을 포함한다. 일반적으로, 문헌[Paul, W., ed., 1989, Fundamental Immunology Ch. 7, 2nd ed. Raven Press, N.Y.]을 참조한다. 각각의 경쇄 및 중쇄 쌍의 가변 구역은 항체 결합 부위를 형성한다.
- [0162] 예를 들어, 낙타 및 라마에서 발견되는 몇몇 천연 발생 항체는 2개의 중쇄로 이루어진 이합체이고, 경쇄를 포함하지 않는다. Muldermans et al., 2001, *J. Biotechnol.* 74:277-302; Desmyter et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290. 낙타 항체의 결정학 연구는 CDR3 구역이 항원과 상호작용하는 표면을 형성하고 따라서 더 통상적인 사합체 항체에서와 같이 항원 결합에 중요하다는 것을 밝혀냈다. 본 개시내용은 인자 Bb에 결합하고/하거나 이의 생물학적 활성을 저해할 수 있는 2개의 중쇄, 또는 이의 단편으로 이루어진 이합체 항체를 포함한다.
- [0163] 중쇄 및 경쇄의 가변 구역은 통상적으로 3개의 상보성 결정 구역 또는 CDR에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 구역(FR)의 동일한 일반적인 구조를 나타낸다. CDR은 항원 인식 및 결합을 담당하는 항체의 초가변 구역을 포함한다. 각각의 쌍의 2개의 사슬로부터의 CDR은 프레임워크 구역에 의해 정렬되고 지지되어, 특이적 에피토프에 대한 결합을 허용한다. N 말단으로부터 C 말단으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 정렬은 문헌[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest. Chothia et al., 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342:878-883]의 정의에 따른다.

- [0164] CDR은 항원 결합에 대한 주요 표면 접촉점을 구성한다. 예를 들어 문헌[Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917]을 참조한다. 추가로, 경쇄의 CDR3 및 특히 중쇄의 CDR3은 경쇄 및 중쇄 가변 구역 내에 항원 결합에서 가장 중요한 결정부위를 구성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chothia and Lesk, 1987, *supra*; Desiderio *et al.*, 2001, *J. Mol. Biol.* 310:603-615; Xu and Davis, 2000, *Immunity* 13:37-45; Desmyter *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; 및 Muyldermans, 2001, *J. Biotechnol.* 74:277-302]을 참조한다. 몇몇 항체에서, 중쇄 CDR3은 항원과 항체 사이의 주요 접촉 구역을 구성하는 것으로 보인다. 상기 Desmyter 등(2001)의 문헌. CDR3 단독이 변하는 실험실내 선택 반응식은 항체의 결합 특성을 변화시키도록 사용될 수 있다. 상기 Muyldermans, 2001; 상기 Desiderio 등(2001) 참조.
- [0165] 천연 발생 항체는 통상적으로 항체를 단백질 분비를 위한 세포 경로로 지시하고 성숙 항체에 존재하지 않는 신호 서열을 포함한다. 본 개시내용의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하기 기재된 바와 같은 천연 발생 신호 서열 또는 비상동성 신호 서열을 암호화할 수 있다.
- [0166] 일 실시형태에서, 항-인자 Bb 항체는 단일클론 항체이고, 한(1) 개 내지 여섯(6) 개의 CDR은 본 명세서에 기재되어 있다. 본 개시내용의 항체는 IgM, IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 포함), IgD, IgA, 또는 IgE 항체를 포함하는 임의의 유형일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 항체는 IgG 유형 항체이다. 훨씬 더 구체적인 실시형태에서, 항체는 IgG2 유형 항체이다.
- [0167] 몇몇 실시형태에서, 항체는 완전한 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있고, CDR은 모두 동일한 종, 예를 들어 인간 유래이다. 대안적으로, 예를 들어 항체가 상기 기재된 서열로부터 6개 미만의 CDR을 함유하는 실시형태에서, 추가적인 CDR은 다른 종(예를 들어, 컷과 CDR) 유래일 수 있거나, 서열에 기재된 것과 다른 인간 CDR일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 확인된 적절한 서열로부터의 인간 HC CDR3 및 LC CDR3 구역이 사용될 수 있고, HC CDR1, HC CDR2, LC CDR1 및 LC CDR2는 대안 종, 또는 상이한 인간 항체 서열, 또는 이들의 조합으로부터 임의로 선택된다. 예를 들어, 본 개시내용의 CDR은 상업적으로 관련된 키메라 또는 인간화된 항체의 CDR 구역을 대체할 수 있다.
- [0168] 구체적인 실시형태는 인간 성분인 항체의 스캐폴드 성분을 이용한다.
- [0169] 그러나, 몇몇 실시형태에서, 스캐폴드 성분은 상이한 종으로부터의 혼합물일 수 있다. 그러므로, 항체는 키메라 항체 및/또는 인간화된 항체일 수 있다. 일반적으로, 키메라 항체 및 인간화된 항체 둘 다는 하나 초과 종으로부터의 아미노산 또는 구역을 조합하는 항체일 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체는, 대부분의 실시형태에서, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 다른 적합한 비인간 동물로부터의 가변 구역(들), 및 인간으로부터의 불변 구역(들)을 포함한다.
- [0170] 인간화된 항체는 비인간 항체, 예를 들어 마우스 항체로부터 원래 유래한 항체이다. 인간화된 항-인자 Bb 항체의 다양한 실시형태에서, 비인간 항체로부터 유래한 가변-도메인 프레임워크 구역 또는 프레임워크 아미노산은 인간 항체에서 상응하는 위치에서 발견된 아미노산 동일성하도록 변화될 수 있다. 인간화된 항체의 몇몇 실시형태에서, CDR을 제외한, 전체 항체는 인간 기원의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있거나, 이의 CDR 내를 제외하고 이러한 항체와 동일하다. 다른 실시형태에서, 인간화된 항체는 동일성이 상응하는 인간 항체에서 동일한 또는 유사한 위치의 동일성으로 변화한 특정한 아미노산 위치를 포함할 수 있다. CDR(이들 중 일부 또는 모두는 비인간 유기체에 기원하는 핵산에 의해 암호화될 수 있음)은 항체를 생성하기 위해 인간 항체 가변 구역의 베타 시트 프레임워크로 그래프팅되고, 이 구역의 특이성은 그래프팅된 CDR에 의해 결정된다. 이러한 항체의 생성은 예를 들어 WO 제92/11018호, 문헌[Jones, 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536]에 기재되어 있다. 인간화된 항체는 유전적으로 조작된 면역계를 가지는 마우스를 사용하여 또한 생성될 수 있다. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. 몇몇 실시형태에서, CDR은 인간일 수 있고, 따라서 인간화된 및 키메라 항체 둘 다는 이 맥락에서 몇몇 비인간 CDR을 포함한다. 몇몇 경우에, HC CDR3 및 LC CDR3 구역을 포함하는 인간화된 항체가 생성될 수 있고, 다른 CDR 구역 중 하나 이상은 상이한 특별한 기원이다.
- [0171] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 다중특이적 항체, 특히 이중특이적 항체(예를 들어, 다이아바디)일 수 있다. 이것은 2개(또는 이상)의 상이한 항원, 예를 들어 인자 Bb, 및 또 다른 항원, 또는 인자 Bb의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 항체이다. 예를 들어, 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조된, 다이아바디는 당해 분야에 공지된 다양한 방식으로 제조될 수 있다(Holliger and Winter, 1993, *Current Opinion Biotechnol.* 4:446-449).

- [0172] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 미니바디이다. 미니바디는 CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 최소화된 항체 유사 단백질이다. Hu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061.
- [0173] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 도메인 항체이다; 예를 들어 미국 특허 제6,248,516호를 참조한다. 도메인 항체(dAb)는 대략 13kDa의 분자량, 또는 전체 항체의 크기의 1/10 미만을 가지는 인간 항체 dAb의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 구역에 상응하는 항체의 기능적 결합 도메인이다. dAb는 박테리아, 효모 및 포유동물 세포 시스템을 포함하는 다양한 숙주에서 잘 발현된다. 또한, dAb는 매우 안정하고, 가혹한 조건, 예컨대 동결 건조 또는 열 변성으로 처리된 후에도 활성을 유지한다. 예를 들어 미국 특허 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 미국 출원 번호 제2004/0110941호; 유럽 특허 제0368684호; 미국 특허 제6,696,245호, WO 제04/058821호, WO 제04/003019호 및 WO 제03/002609호(모두 전체로 참조문헌으로 포함됨)를 참조한다.
- [0174] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 인자 Bb에 대한 결합 특이성을 보유하는 본 명세서에 기재된 임의의 항체의 단편인 항체 단편이다. 다양한 실시형태에서, 항체는 F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, 또는 단쇄 Fv 단편이다. 최소로, 항체는, 본 명세서에서 의미하는 바대로, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 포함하고, 폴리펩타이드는 경쇄 및/또는 중쇄 가변 구역의 모두 또는 일부를 포함한다.
- [0175] 특이적 항체 단편은 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편, (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편, (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) 단일 가변으로 이루어진 dAb 단편 (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341:544-546), (v) 단리된 CDR 구역, (vi) F(ab')₂ 단편, 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, (vii) 단쇄 Fv 분자(scFv)(여기서, VH 도메인 및 VL 도메인은 항원 결합 부위를 형성하도록 2개의 도메인이 회합되게 하는 펩타이드에 의해 연결됨)(Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) 이중특이적 단쇄 Fv 이합체 (PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 작제된 다이아바디 또는 트리아바디, 다가 또는 다중특이적 단편 (Tomlinson *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; W094/13804; Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 항체 단편은 변형될 수 있다. 예를 들어, 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 이황화 브릿지의 혼입에 의해 안정화될 수 있다(Reiter *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). 다시, 본 명세서에 기재된 바대로, 이 단편의 비-CDR 성분은 바람직하게는 인간 서열이다.
- [0176] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 전통적인 항체, 예를 들어 인간 면역글로불린이다. 이 실시형태에서, 상기 기재된 바대로, 특이적 구조는 CDR 구역을 포함하는 도시된 완전한 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 추가적인 실시형태는 다른 인간 항체로부터 생긴 다른 CDR, 프레임워크 구역, J 및 D 구역, 불변 구역 등과 함께 본 개시내용의 하나 이상의 CDR을 이용한다. 예를 들어, 본 개시내용의 CDR은 임의의 수의 인간 항체, 특히 상업적으로 관련된 항체의 CDR을 대체할 수 있다.
- [0177] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 항체 융합 단백질(예를 들어, 항체 접합체)이다. 이 실시형태에서, 항체는 접합 파트너에 융합된다. 접합체 파트너는 단백질성 또는 비단백질성일 수 있고; 후자는 일반적으로 항체(항체의 공유 변형에서의 설명 참조) 및 접합체 파트너에서 작용기를 사용하여 생성된다. 예를 들어 링커는 당해 분야에 공지되어 있고; 예를 들어, 호모- 또는 헤테로-이작용성 링커는 널리 공지되어 있다(피어스 케미컬 컴퍼니 카탈로그, technical section on cross-linkers, 155-200 페이지(본 명세서에 참조문헌으로 인용됨) 참조).
- [0178] 일 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 항체 유사체이다. 몇몇 경우에, 항체 유사체는 합성 항체라 칭해질 수 있다. 예를 들어, 다양한 최근의 작업은 그래프팅된 CDR을 가지는 대안적인 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 이용한다. 이러한 스캐폴드는 항체의 3차원 구조를 안정화시키도록 도입된 돌연변이, 및 예를 들어 생체적합성 중합체로 이루어진 완전 합성 스캐폴드를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들어 문헌[Korndorfer *et al.*, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654]을 참조한다. 또한, 펩타이드 항체 모방체(PAM), 및 스캐폴드로서 피브로넥틴 성분을 사용하는 항체 모방체에 기초한 작업을 이용할 수 있다.
- [0179] VH 및 VL 변이체
- [0180] 상기 기재된 바대로, 몇몇 실시형태에서 본 개시내용은 각각 서열 번호 1 내지 3을 포함하는 중쇄 가변 구역 및/또는 서열 번호 4 내지 6의 경쇄 가변 구역, 또는 상기 정의된 바와 같은 임의의 단편을 포함하거나 이것으로 이루어진 항체를 제공한다. 따라서, 이 실시형태에서, 항체는 적어도 하나의 CDR 또는 변이체뿐만 아니라, 도시된

프레임워크 서열의 적어도 일부를 포함한다. 또한, 본 개시내용은 이러한 중쇄 가변 서열 또는 경쇄 가변 서열의 변이체를 포함한다.

[0181] 변이체 가변 구역은 일반적으로 이 모 가변 구역, 예컨대 본 명세서에 개시된 것과 적어도 80%의 아미노산 상동성, 유사성, 또는 동일성을 공유한다. 몇몇 실시형태에서, 변이체 및 모 서열 상동성 또는 동일성은 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 거의 100%이다. 개별 변이체 VH 및 VL을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 본 명세서에 도시된 핵산 서열 사이의 핵산 서열 상동성, 유사성, 또는 동일성은 본 명세서에 기재된 것과 적어도 70%이고, 더 통상적으로 바람직하게는 상동성 또는 동일성은 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 거의 100% 증가한다. 또한, 변이체 가변 구역은 많은 실시형태에서 모 CDR의 특이성 및/또는 활성의 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 생물학적 기능을 공유할 수 있다. 몇몇 경우에, 상동성 및/또는 동일성은 동일할 수 있는 CDR 서열 밖에서 오직 측정된다. 다른 경우에, 상동성 및/또는 동일성은 CDR 서열을 포함하는 전체 서열에 걸쳐 측정된다. 몇몇 실시형태에서, 불변 구역 변이체가 또한 포함될 수 있다.

[0182] 다양한 경우에, 아미노산 서열의 상동성은 상기 기재된 바와 같이 최적으로 정렬될 때 동일성 또는 양성의 백분율을 반영할 수 있다. 다양한 경우에, 상동성(%)(양성(%)) 또는 동일성(%)은 비교창 내에 정렬된 아미노산의 수를 나눔으로써 계산될 수 있다. 2개의 폴리펩타이드가 동일하지 않은 길이인 경우, 비교창은 1개 또는 다른 폴리펩타이드의 전체 길이일 수 있다. 다른 경우에, 비교창은 1개의 폴리펩타이드의 부분일 수 있다. 다양한 경우에, 2개의 폴리펩타이드 서열의 상동성 또는 동일성을 측정하기 위한 비교창은 약 40개 초과와 aa(아미노산), 45개의 aa, 50개의 aa, 55개의 aa, 60개의 aa, 65개의 aa, 70개의 aa, 75개의 aa, 80개의 aa, 85개의 aa, 90개의 aa, 95개의 aa, 100개의 aa, 150개의 aa, 또는 200개의 aa 및/또는 약 200개 미만의 aa, 150개의 aa, 100개의 aa, 95개의 aa, 90개의 aa, 85개의 aa, 80개의 aa, 75개의 aa, 70개의 aa, 65개의 aa, 60개의 aa, 55개의 aa, 50개의 aa, 또는 45개의 aa이다. 몇몇 실시형태에서, CDR 서열에서처럼, 비교창은 40개 미만의 aa, 예를 들어 약 25개 미만의 aa, 24개의 aa, 23개의 aa, 22개의 aa, 21개의 aa, 20개의 aa, 19개의 aa, 18개의 aa, 17개의 aa, 16개의 aa, 15개의 aa, 14개의 aa, 13개의 aa, 12개의 aa, 11개의 aa, 10개의 aa, 9개의 aa, 8개의 aa, 7개의 aa, 6개의 aa, 5개의 aa, 또는 4개의 aa, 및 약 3개 초과와 aa, 4개의 aa, 5개의 aa, 6개의 aa, 7개의 aa, 8개의 aa, 9개의 aa, 10개의 aa, 11개의 aa, 12개의 aa, 13개의 aa, 14개의 aa, 15개의 aa, 16개의 aa, 17개의 aa, 18개의 aa, 19개의 aa, 20개의 aa, 21개의 aa, 22개의 aa, 23개의 aa, 또는 24개의 aa일 수 있다.

[0183] 다양한 경우에, 청구된 아미노산 서열은 약 70% 초과, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 및/또는 약 100% 미만, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80%, 또는 75%인 소정의 비교창에 걸쳐 동일성(%) 또는 상동성(%)(양성(%))을 가질 수 있다.

[0184] 항-인자 Bb 항체의 공유 변형

[0185] 항체의 공유 변형은 본 개시내용의 범위 내에 포함되고, 일반적으로 항상은 아니지만 번역 후 수행된다. 예를 들어, 항체의 여러 유형의 공유 변형은 항체의 특정한 아미노산 잔기를 선택된 부사슬 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 분자로 도입된다.

[0186] 시스테인 잔기는 대부분 흔히 α-할로아세테이트(및 상응하는 아민), 예컨대 클로로아세트산 또는 클로로아세트아마이드와 반응하여 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 생성한다. 시스테인 잔기는 브로모트라이플루오로아세톤, α-브로모-β-(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-나이트로-2-피리딜 다이설파이드, 메틸 2-피리딜 다이설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-나이트로페놀, 또는 클로로-7-나이트로벤조-2-옥사-1,3-다이아졸과의 반응에 의해 또한 유도체화된다.

[0187] 히스티딘 잔기는 pH 5.5-7.0에서 다이에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 이 물질이 히스티딘 부사슬에 비교적 특이적이기 때문이다. 파라-브로모펜아실 브로마이드가 또한 유용하고; 반응은 바람직하게는 pH 6.0에서 0.1M 나트륨 카코딜레이트 중에 수행된다.

[0188] 라이시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카복실산 언하이드라이드와 반응한다. 이 물질에 의한 유도체화는 라이시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 가진다. 알파-아미노 함유 잔기를 유도체화하기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스터, 예컨대 메틸 피롤리니미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트라이나이트로벤젠설포산; 0-메틸아미소우레아; 2,4-펜탄다이온; 및 글라이옥실레이트에 의한 트랜스아미나제 촉매화 반응물을 포함한다.

[0189] 아르기닐 잔기는 하나 또는 여러 종래의 시약(이들 중 페닐글라이옥살, 2,3-뷰탄다이온, 1,2-사이클로헥산다이

온 및 닌하이드린)과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용기의 높은 pK_a 때문에 반응이 알칼리 조건 하에 수행될 것을 요한다. 게다가, 이 시약은 라이신의 기, 및 아르기닌 엡실론-아미노기와 반응할 수 있다.

[0190] 타이로실 잔기의 특정한 변형은 방향족 다이아조늄 화합물 또는 테트라나이트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 라벨을 타이로실 잔기로 도입하는 것에 있어서 특히 중요하게 이루어질 수 있다. 대부분 흔히, N-아세틸이미디졸 및 테트라나이트로메탄은 각각 O-아세틸 타이로실 중 및 3-나이트로 유도체를 형성하기 위해 사용된다. 타이로실 잔기는 방사면역검정에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조하기 위해 ^{125}I 또는 ^{131}I 를 사용하여 요요드화되고, 상기 기재된 클로라민 T 방법이 적합하다.

[0191] 카복실 사이드 기(아스파르틸 또는 글루타밀)는 카르보다이이미드($R'-N=C=N-R'$)(여기서, R 및 R'는 임의로 상이한 알킬기, 예컨대 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카르보다이이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸) 카르보다이이미드)와의 반응에 의해 선택적으로 변형된다. 게다가, 아스파르틸 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.

[0192] 이작용성 물질에 의한 유도체화는 다양한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지 매트릭스 또는 표면에 항체를 가교결합시키기에 유용하다. 흔히 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(다이아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스터, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스터, 호모이작용성 이미도에스터, 예컨대 다이숙신이미드 에스터, 예컨대 3,3'-다이티오비스(숙신이미드)프로피오네이트, 및 이작용성 말레이미드, 예컨대 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄을 포함한다. 유도체화제, 예컨대 메틸-3-[(p-아지도페닐)다이티오]프로피오이미데이트는 광의 존재 하에 가교결합을 형성할 수 있는 광활성화 가능한 중간체를 생성한다. 대안적으로, 미국 특허 제3,969,287호; 제3,691,016호; 제4,195,128호; 제4,247,642호; 제4,229,537호; 및 제4,330,440호에 기재된 반응성 수불용성 매트릭스, 예컨대 사이아노젠 브로마이드 활성화 탄수화물 및 반응성 기질은 단백질 부동화에 사용된다.

[0193] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로 흔히 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 온화한 산성 조건 하에 탈아미드화된다. 이들 잔기의 어느 한 형태는 본 개시내용의 범위 내에 해당한다.

[0194] 다른 변형은 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실기의 포스포릴화, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 부사슬의 α -아미노기의 메틸화(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실기의 아마이드화를 포함한다.

[0195] 글라이코실화

[0196] 본 개시내용의 범위 내에 포함된 항체의 또 다른 유형의 공유 변형은 단백질의 글라이코실화 패턴을 변경하는 것을 포함한다. 당해 분야에 공지된 바대로, 글라이코실화 패턴은 단백질(예를 들어, 하기 기재된 특정한 글라이코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재), 또는 단백질이 생성되는 숙주 세포 또는 유기체의 서열 둘 다에 따라 달라질 수 있다. 특정한 발현 시스템은 하기 기재되어 있다.

[0197] 폴리펩타이드의 글라이코실화는 통상적으로 N 연결 또는 O 연결된다. N 연결은 아스파라긴 잔기의 부사슬에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트라이-펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 부사슬에 대한 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드 내의 이 트라이-펩타이드 서열의 존재는 잠재적 글라이코실화 부위를 생성한다. O 연결 글라이코실화는 하이드록시아미노산, 가장 흔히 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세틸 갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나의 부착을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신을 또한 사용할 수 있다.

[0198] 개시된 항체에 대한 글라이코실화 부위의 첨가는 이것이 (N 연결된 글라이코실화 부위에 대해) 상기 기재된 트라이-펩타이드 서열 중 하나 이상을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 변경은 (O 연결된 글라이코실화 부위에 대한) 출발 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 이에 의한 치환에 의해 또한 만들어질 수 있다. 용이함을 위해, 항체의 아미노산 서열은 바람직하게는 원하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생성되도록 특히 미리 선택된 염기에서 표적 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 돌연변이시키므로써 DNA 수준에서의 변화를 통해 변경된다.

- [0199] 항체에 대한 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 단백질에 대한 글라이코사이드의 화학 또는 효소 커플링에 의한다. 이 절차는 이것이 N 및 O 연결된 글라이코실화에 대한 글라이코실화 능력을 가지는 숙주 세포에서 단백질의 생성을 요구하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용된 커플링 모드에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프하이드릴기, 예컨대 시스테인의 것, (d) 유리 하이드록실기, 예컨대 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것, 또는 (f) 글루타민기의 아마이드기에 부착될 수 있다. 이 방법은 1987년 9월 11일에 공개된 WO 제 87/05330호, 및 문헌[Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306]에 기재되어 있다.
- [0200] 출발 항체에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학 탈글라이코실화는 화합물 트라이플루오로메탄설폰산, 또는 동등한 화합물에 대한 단백질의 노출을 요한다. 이 처리는 폴리펩타이드가 온전하게 남기면서 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외하고 대부분 또는 모든 당을 절단시킨다. 화학 탈글라이코실화는 문헌[Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 and by Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131]에 기재되어 있다. 폴리펩타이드에서 탄수화물 모이어티의 효소 절단은 문헌[Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350]에 기재된 바대로 다양한 엔도- 및 엑소-글라이코시다제의 사용에 의해 달성될 수 있다. 잠재적 글라이코실화 부위에서의 글라이코실화는 문헌[Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105]에 기재된 바대로 화합물 투니카마이신의 사용에 의해 방지될 수 있다. 투니카마이신은 단백질-N-글라이코사이드 연결의 형성을 차단한다.
- [0201] PEG화
- [0202] 항체의 또 다른 유형의 공유 변형은 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 및/또는 제4,179,337호(모두 참조로 본 명세서에 포함됨)에 기재된 방식으로 다양한 폴리올, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌을 포함하는 다양한 비단백질성 중합체에 항체를 연결시키는 것을 포함한다. 또한, 당해 분야에 공지된 바대로, 아미노산 치환은 중합체의 첨가, 예컨대 PEG를 수월하게 하도록 항체 내의 다양한 위치에서 이루어질 수 있다.
- [0203] 라벨
- [0204] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 항체의 공유 변형은 하나 이상의 라벨의 첨가를 포함한다.
- [0205] 용어 "라벨링 그룹"은 임의의 검출 가능한 라벨을 의미한다. 적합한 라벨링 그룹의 예는 방사성 동위원소 또는 방사성핵종(예를 들어, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 형광 기(예를 들어, FITC, 로다민, 란탄족 인광체), 효소 그룹(예를 들어, 겨자무과산화효소, β-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리 포스파타제), 화학 발광 기, 바이오티닐 그룹, 또는 2차 리포터에 의해 인식된 미리 결정된 폴리펩타이드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 라벨링 그룹은 잠재적 입체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지하기 위한 다양한 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 개시내용을 수행하는 데 있어서 사용될 수 있다.
- [0206] 일반적으로, 라벨은 이들이 검출되는 검정에 따라 다양한 종류에 해당한다: a) 방사성 또는 무거운 동위원소일 수 있는 동위원소 라벨; b) 자기 라벨(예를 들어, 자기 입자); c) 산화환원 활성 모이어티; d) 광학 염료; 효소 그룹(예를 들어, 겨자무과산화효소, β-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리 포스파타제); e) 바이오티닐화 기; 및 f) 2차 리포터에 의해 인식된 미리 결정된 폴리펩타이드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등). 몇몇 실시형태에서, 라벨링 그룹은 잠재적 입체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지하기 위한 다양한 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 개시내용을 수행하는 데 있어서 사용될 수 있다.
- [0207] 특정한 라벨은 발색단, 인광체 및 형광단(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 광학 염료를 포함하고, 후자는 많은 경우에 특정하다. 형광단은 "소분자" 형광체(fluore), 또는 단백질성 형광체일 수 있다.
- [0208] 형광 라벨은 이의 고유 형광 특성을 통해 검출될 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 적합한 형광 라벨은 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 에오신, 에르쓰로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라사이트(Malacite) 그린, 스틸벤, 루시퍼 옐로우, 캐스케이드 블루J, 텍사스 레드(Texas Red), IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, 오투곤 그린, 알렉사-플루오르 염료(알렉사-플루오르 350, 알렉사-플루오르 430, 알렉사-플루오르 488, 알렉사-플루오르 546, 알렉사-플루오르 568, 알렉사-플루오르 594, 알렉사-플루오르 633, 알렉사-플루오르 660, 알렉사-플루오르 680), 캐스케이드 블루, 캐스케이드 옐로우 및 R-피코에리트

린(PE)(모레큘러 프로브즈(Molecular Probes)(오리건주 유진)), FITC, 로다민 및 텍사스 레드(피어스(Pierce)(일리노이주 락포드)), Cy5, Cy5.5, Cy7(Amersham Life Science(펜실베이니아주 피츠버그))를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 형광단을 포함하는 적합한 광학 염료는 문헌[Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland](본 명세서에 참조문헌으로 명확히 인용됨)에 기재되어 있다.

[0209] 적합한 단백질성 형광 라벨은 또한 GFP의 레닐라(Renilla), 프틸로사르쿠스(Ptilosarcus) 또는 아에쿠오레아(Aequorea) 종(Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805)을 포함하는 녹색 형광 단백질, EGFP(Clontech Laboratories, Inc., 진뱅크 수탁 번호 U55762), 블루 형광 단백질(BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., 캐나다 H3H 1J9 퀘벡 몬트리올 1801 드 메종네르 블리바드 웨스트 8층; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), 증대된 황색 형광 단백질(EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), 루시퍼라제(Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β 갈락토시다제(Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) 및 레닐라(W092/15673, W095/07463, W098/14605, W098/26277, W099/49019, 미국 특허 제5292658호, 제5418155호, 제5683888호, 제5741668호, 제5777079호, 제5804387호, 제5874304호, 제5876995호, 제5925558호)(모두 참조로 본 명세서에 포함됨)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0210] 인자 Bb 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드

[0211] 소정의 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 항체를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 몇몇 경우에 개시된 핵산은 본 명세서에 기재된 IgG, 가변 구역, 또는 CDR을 암호화한다. 핵산은 DNA 및 RNA 분자 둘 다를 포함한다. 핵산은 천연 또는 합성 핵산일 수 있다. 본 개시내용의 핵산은 통상적으로 폴리핵산; 즉 3', 5' 포스포다이에스터 결합에 의해 공유로 연결된 개별 뉴클레오타이드의 중합체이다. 다양한 경우에, 뉴클레오타이드 서열은 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 이들의 조합일 수 있다. 몇몇 변형에서, 뉴클레오타이드 서열은 천연 핵산, 합성 핵산, 비천연 핵산, 및/또는 핵산 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 다른 비핵산 분자, 예컨대 아미노산, 및 다른 단량체를 추가로 포함할 수 있다.

[0212] 많은 실시형태에서, 암호화 서열은 단리된 핵산 분자일 수 있다. 단리된 핵산 분자는 이것이 천연 소스에서 원래 연관되는 적어도 하나의 성분으로부터 확인되고 분리된다. 몇몇 경우에, 성분은 뉴클레오타이드 서열, 단백질, 또는 비단백질성 분자일 수 있다. 단리된 항-인자 Bb 항체 암호화 핵산 분자는 이것이 천연에서 발견되는 형태 또는 환경 이외이다. 단리된 항-인자 Bb 항체 암호화 핵산 분자는 천연 세포에 존재하면서 따라서 암호화 핵산 분자(들)로부터 구별된다. 그러나, 단리된 항-인자 Bb 항체 암호화 핵산 분자는 항-인자 Bb 항체를 원래 발현하는 세포에 함유된 항-인자 Bb 항체 암호화 핵산 분자를 포함하고, 여기서 예를 들어 핵산 분자는 천연 세포와 다른 염색체 위치에 있다. 단리된 핵산 분자는 유기체에 존재하면서 따라서 핵산 분자로부터 구별된다. 그러나, 몇몇 경우에, 단리된 핵산 분자는 세포 내에 함유된 핵산일 수 있고, 예를 들어 여기서 단리된 핵산 분자는 세포로 도입되고, 이의 네이티브 위치와 다른 염색체의 위치 또는 염색체 위치에 있다.

[0213] 이의 용도에 따라, 핵산은 이중 가닥, 단일 가닥일 수 있거나, 이중 가닥 또는 단일 가닥 서열 둘 다의 부분을 함유한다. 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 단일 가닥("왓슨(Watson)")의 도시는 또한 다른 가닥("크릭(Crick)")의 서열을 정의한다. 재조합 핵산은 일반적으로 천연에서 보통 발견되는 형태의 엔도뉴클레아제에 의해 핵산을 조각함으로써 실험실내 원래 형성된 핵산일 수 있다. 따라서, 단리된 항체는 선형 형태의 핵산에 의해 암호화될 수 있거나, 보통 연결되지 않은 DNA 분자를 결합함으로써 실험실내 형성된 발현 벡터는 둘 다 본 개시내용의 목적을 위해 재조합으로 생각된다. 재조합 핵산이, 모든 필요한 제어 요소와 함께, 일단 만들어지고 숙주 세포 또는 유기체로 재도입되면, 이것이 비재조합으로, 즉 실험실내 조작보다는 숙주 세포의 생체내 세포 기계를 이용하여 복제할 수 있지만; 이러한 핵산이, 일단 재조합으로 생성되면, 후속하여 비재조합으로 복제되더라도, 본 개시내용의 목적을 위해 여전히 재조합인 것으로 생각되는 것으로 이해된다.

[0214] 몇몇 실시형태에서, 재조합 핵산은 하나 이상의 제어 요소 또는 제어 서열을 포함할 수 있다. 제어 요소 및 제어 서열은 특정한 숙주 유기체에서 작동 가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로 작동자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 작동 가능하게 연결된 서열은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있는 핵산 서열이다. 예를 들어, 핵산 암호화 서열은 핵산 제어 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 프리서열 또는 분비 리더를 위한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 프리단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대해 DNA에 작동 가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게

연결되거나; 리보솜 결합 부위는 번역을 수월하게 하도록 배치되는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된다. 대부분의 실시형태에서, 작동 가능하게 연결된 서열은 예를 들어 분비 리더 서열에 공유로 연결된 DNA 서열이다. 많은 실시형태에서, 인핸서 서열은 암호화 서열에 인접하는 것이 필요하지 않고, 오히려 2개의 서열은 하나 이상의 핵산에 의해 분리될 수 있다.

[0215] 다양한 경우에, 개시된 뉴클레오타이드 서열의 핵산은 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 제한 없이, 포스포다이에스터, 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 알킬 포스포트라이에스터, 설파메이트, 3'-티오아세탈, 메틸렌(메틸이미노), 3'-N-카바메이트, 모르폴리노 카바메이트, 및 펩타이드 핵산(PNA)을 포함하는, 합성 골격 유사체를 갖는 핵산 유사 구조가 또한 포함된다(예를 들어, 문헌["Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach," edited by F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991); "Antisense Strategies," Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 600, Eds. Baserga and Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36:1923-1937; 및 "Antisense Research and Applications" (1993, CRC Press)] 참조). PNA는 비이온성 골격, 예컨대 N-(2-아미노에틸) 글리신 단위를 함유한다. 포스포로티오에이트 연결은 WO 97/03211; WO 96/39154; 및 문헌[Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197]에 기재되어 있다. 이 용어에 의해 포함된 다른 합성 골격은 메틸-포스포네이트 연결 또는 교대하는 메틸-포스포네이트 및 포스포다이에스터 연결(Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698), 및 벤질-포스포네이트 연결(Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153-156)을 포함한다.

[0216] 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 매우 다수의 핵산이 제조될 수 있고, 이들 모두 본 개시내용의 CDR(및 중쇄 및 경쇄 또는 항체의 다른 성분)을 암호화한다. 따라서, 특정한 아미노산 서열이 확인되면서, 당해 분야의 당업자는 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않는 방식으로 하나 이상의 코돈의 서열을 단순히 변형시킴으로써 임의의 수의 상이한 핵산을 만들 수 있다.

[0217] 다양한 경우에, 서열 번호 1 내지 6 및 8 내지 15 및 18 내지 31의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 포함된다. 이 뉴클레오타이드 암호화 서열은 개시된 폴리펩타이드 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드로 번역될 수 있다. 많은 경우에, 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드는 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가지지 않을 수 있다. 이는 유전자 코드의 축퇴성으로 인한다. 개시된 암호화 서열은 비번역된 서열, 예를 들어 폴리-아데닐화 서열을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 암호화 서열은 번역 전에 전사된 mRNA로부터 스플라이싱된 인트론 또는 개재하는, 비번역된, 서열을 또한 포함할 수 있다. 다양한 경우에, 전사된 mRNA는 말단 7-메틸구아노신에 의해 캡핑될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 암호화 서열은 최종 항체에 보이지 않는 아미노산을 위한 암호화 서열, 예를 들어 항체의 배출에 필요한 서열을 포함할 것이다.

[0218] 몇몇 변형에서, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 다수의 뉴클레오타이드 암호화 서열은 동일한 폴리펩타이드 서열을 암호화할 수 있다. 이 본 발명의 핵산 암호화 서열은 또한 개시된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 상동성일 수 있다. 뉴클레오타이드 암호화 서열은 상기 기재된 바와 같이 BLASTn에 의해 정렬될 수 있다. 다양한 경우에, 이 정렬된 뉴클레오타이드 서열의 상동성(또는 BLASTn에서의 동일성)은 약 40% 초과, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 및/또는 약 100% 미만, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 또는 45%일 수 있다. 다양한 경우에, 상동성 정렬된 서열은 약 700 nt 미만, 600 nt, 500 nt, 400 nt, 300 nt, 200 nt, 100 nt, 90 nt, 80 nt, 70 nt, 60 nt, 50 nt 또는 40 nt 및/또는 약 50 nt 초과, 60 nt, 70 nt, 80 nt, 90 nt, 100 nt, 200 nt, 300 nt, 400 nt, 500 nt, 또는 600 nt일 수 있다.

[0219] 다양한 경우에, 암호화 서열은 표준 유전자 코드에 따라 아미노산 서열로 번역될 수 있는 리보핵산 서열의 전사를 지시한다. 다양한 경우에, 코드는 정규 코드에 대한 변형을 포함할 수 있다. 몇몇 변형에서, 암호화 서열은 아미노산을 암호화하지 않지만, 리보핵산이 폴리펩타이드로 번역되기 전에 전사되고 후에 제거될 수 있는, 인트론, 또는 개재 서열을 포함할 수 있다.

[0220] 항체를 생성하는 방법

[0221] 본 개시내용은 상기와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태의 발현 시스템 및 작제물을 또한 제공한다. 또한, 본 개시내용은 이러한 발현 시스템 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0222] 통상적으로, 임의의 숙주 세포에서 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오타이드 서열의 클로

닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 총체적으로 플랭킹 서열이라 불리는 이러한 서열은 소정의 실시형태에서 통상적으로 하기 뉴클레오타이드 서열 중 하나 이상을 포함할 것이다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 도너 및 억셉터 슬라이스 부위를 함유하는 완전한 인트론 서열, 폴리펩타이드 분비를 위한 리더 서열을 암호화하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현시키고자 하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 구역, 및 선택 가능한 마커 요소. 각각의 이들 서열은 하기 기재되어 있다.

[0223] 임의로, 벡터는 "태그" 암호화 서열, 즉 인자 Bb 항체 암호화 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치한 올리고뉴클레오타이드 분자를 함유할 수 있고; 올리고뉴클레오타이드 서열은, 상업적으로 구입 가능한 항체가 존재하는, 폴리 His 태그(예컨대, 헥사His), 또는 또 다른 "태그", 예컨대 FLAG, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 *myc*를 암호화할 수 있다. 이 태그는 통상적으로 폴리펩타이드의 발현 시 폴리펩타이드에 융합되고, 숙주 세포로부터 인자 Bb 항체의 친화도 정제 또는 검출을 위한 수단으로서 작용할 수 있다. 친화도 정제는 친화도 매트릭스로서 태그에 대해 항체를 사용하여 예를 들어 칼럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 임의로, 태그는 다양한 수단에 의해, 예컨대 절단을 위한 소정의 펩티다제를 사용하여 정제된 인자 Bb 항체로부터 후속하여 제거될 수 있다.

[0224] 플랭킹 서열은 상동성(즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주 유래), 비상동성(즉, 숙주 세포 종 또는 균주 이외의 종 유래), 하이브리드(즉, 하나 초과와 소스로부터의 플랭킹 서열의 조합), 합성 또는 네이티브일 수 있다. 그러므로, 플랭킹 서열의 소스는 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 유기체, 임의의 척추동물 또는 비척추동물 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있되, 단 플랭킹 서열은 숙주 세포 기계에서 기능적이고, 이에 의해 활성화될 수 있다.

[0225] 본 개시내용의 벡터에서 유용한 플랭킹 서열은 당해 분야에 널리 공지된 임의의 여러 방법에 의해 얻어질 수 있다. 통상적으로, 본 명세서에서 유용한 플랭킹 서열은 맵핑 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 이전에 확인될 것이고, 따라서 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직 소스로부터 단리될 수 있다. 몇몇 경우에, 플랭킹 서열의 완전 뉴클레오타이드 서열은 공지될 수 있다. 여기서, 플랭킹 서열은 핵산 합성 또는 클로닝에 대해 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 합성될 수 있다.

[0226] 플랭킹 서열 중 모두 또는 오직 일부가 공지되든, 이것은 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 및/또는 게놈 라이브러리를 동일한 또는 또 다른 종 유래의 적합한 프로브, 예컨대 올리고뉴클레오타이드 및/또는 플랭킹 서열 단편에 의해 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. 플랭킹 서열이 공지되어 있지 않은 경우, 플랭킹 서열을 함유하는 DNA의 단편은 예를 들어 암호화 서열 또는 심지어 또 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 DNA의 더 큰 조각으로부터 단리될 수 있다. 단리는 적절한 DNA 단편을 생성하기 위한 제한 엔도뉴클레아제 분해, 이어서 아가로스 겔 정제, 퀴아젠(Qiagen)(등록상표) 칼럼 크로마토그래피(캘리포니아주 채츠워스), 또는 당업자에게 공지된 다른 방법을 이용한 단리에 의해 달성될 수 있다. 이 목적을 달성하기 위한 적합한 효소의 선택은 당해 분야의 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.

[0227] 복제 기원은 통상적으로 상업적으로 구입된 이 원핵생물 발현 벡터의 일부이고, 기원은 숙주 세포에서의 벡터의 증폭을 돕는다. 선택된 벡터가 복제 기원 부위를 함유하지 않는 경우, 이것은 공지된 서열에 기초하여 화학적으로 합성되고, 벡터에 결합될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322(New England Biolabs(매사추세츠주 버벌리))로부터의 복제 기원은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 다양한 바이러스 기원(예를 들어, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 또는 파필로마 바이러스, 예컨대 HPV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기원 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다(예를 들어, SV40 기원은 바이러스 초기 프로모터를 또한 함유하므로 이것은 대개 유일하게 사용된다).

[0228] 전사 종결 서열은 통상적으로 폴리펩타이드 암호화 구역의 말단 3'에 위치하고, 전사를 종결시키도록 작용한다. 보통, 원핵생물 세포에서의 전사 종결 서열은 G-C 농후 단편, 이어서 폴리-T 서열이다. 서열이 라이브러리로 부터 용이하게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로서 상업적으로 구입되지만, 이것은 또한 핵산 합성에 대한 방법, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 이용하여 용이하게 합성될 수 있다.

[0229] 선택 가능한 마커 유전자는 선택적 배양 배지 중에 성장한 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 암호화한다. 통상적인 선택 마커 유전자는 (a) 원핵생물 숙주 세포에 대해 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 테트라사이클린 또는 카나마이신에 내성을 부여하거나; (b) 세포의 영양요구성 결핍을 보완하거나; (c) 복합 또는 한정 배지로부터 이용 가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다. 특이적 선택 가

능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 글루타민 합성효소(glutamine synthetase: GS) 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유리하게는, 네오마이신 내성 유전자는 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포 둘다에서 선택에 대해 또한 사용될 수 있다.

[0230] 다른 선택 가능한 유전자는 발현되는 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 생존에 중요한 단백질의 생성에 필요한 유전자가 재조합 세포의 연속 생성의 염색 내에 탠덤식으로 반복되는 과정이다. 포유동물 세포에 적합한 선택 가능한 마커의 예는 다이하이드로엽산 환원효소(DHFR) 및 프로모터 없는 티미딘 키나제 유전자를 포함한다. 포유동물 세포 형질전환체는 오직 형질전환체가 벡터에 존재하는 선택 가능한 유전자에 의해 생존에 독특하게 적합한 선택 압력 하에 놓인다. 선택 압력은 배지 중의 선택 물질의 농도가 연속하여 증가하여서, 선택 가능한 유전자 및 또 다른 유전자를 암호화하는 DNA, 예컨대 인자 Bb 폴리펩타이드 또는 인자 Bb 에피토프에 결합하는 항체 둘 다의 증폭을 발생시키는 조건 하에 형질전환된 세포를 배양함으로써 부여된다. 그 결과, 증가한 분량의 폴리펩타이드, 예컨대 인자 Bb 항체는 증폭된 DNA로부터 합성된다.

[0231] 리보솜 결합 부위는 보통 mRNA의 번역 개시에 필요하고, 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열(원핵생물) 또는 코작(Kozak) 서열(진핵생물)에 의해 규명된다. 요소는 통상적으로 프로모터의 3' 및 발현되는 폴리펩타이드의 암호화 서열의 5'에 위치한다.

[0232] 몇몇 경우에, 예컨대 글라이코실화가 진핵생물 숙주 세포 발현 시스템에서 원해지는 경우, 글라이코실화 또는 수율을 개선하기 위해 다양한 프리- 또는 프로서열을 조작할 수 있다. 예를 들어, 특정한 신호 펩타이드의 펩티다제 절단 부위를 변경하거나, 글라이코실화에 또한 영향을 미칠 수 있는 프로서열을 첨가할 수 있다. 최종 단백질 생성물은 (성숙 단백질의 제1 아미노산에 대한) -1 위치에서 발현에 따른 하나 이상의 추가적인 아미노산을 가질 수 있고, 이것은 전체로 제거될 수 없다. 예를 들어, 최종 단백질 생성물은 아미노 말단에 부착된 펩티다제 절단 부위에서 발견되는 1개 또는 2개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 효소가 성숙 폴리펩타이드 내에 이러한 부위에서 절단되는 경우, 몇몇 효소 절단 부위의 사용은 원하는 폴리펩타이드의 약간 절두된 형태를 생성시킬 수 있다.

[0233] 본 개시내용의 발현 및 클로닝 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되고 인자 Bb 항체를 암호화하는 분자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 통상적으로 함유할 것이다. 프로모터는 구조적 유전자의 전사를 제어하는 (일반적으로 약 100 내지 1000bp 내의) 구조적 유전자의 시작 코돈의 상류(즉, 5')에 위치한 비전사 서열이다. 프로모터는 2개의 종류 중 하나로 종래대로 그룹화된다: 유도성 프로모터 및 구성적 프로모터. 유도성 프로모터는 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화와 같은 배양 조건에서의 여러 변화에 반응하여 이의 제어 하에 DNA로부터 증가한 전사 수준을 개시시킨다. 구성적 프로모터는 다른 한편 작동 가능하게 연결된, 즉 유전자 발현에 대해 제어하지 않거나 약간 제어하는, 유전자를 균일하게 전사한다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식된 다수의 프로모터는 널리 공지되어 있다. 적합한 프로모터는 제한 효소 절단에 의해 소스 DNA로부터 프로모터를 제거하고 원하는 프로모터 서열을 벡터로 삽입함으로써 본 개시내용의 인자 Bb 항체를 포함하는 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 DNA에 작동 가능하게 연결된다.

[0234] 몇몇 실시형태에서, 효모 세포는 현재 개시된 인자 Bb 항체를 생성하도록 사용될 수 있다. 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터는 당해 분야에 또한 널리 공지되어 있다. 효모 인헨서는 효모 프로모터와 유리하게 사용된다. 포유동물 숙주 세포와 사용하기에 적합한 프로모터는 널리 공지되어 있고, 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 2), 소 파필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 얻은 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 적합한 포유동물 프로모터는 비상동성 포유동물 프로모터, 예를 들어 열 쇼크 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.

[0235] 관심 있을 수 있는 추가적인 프로모터는 SV40 초기 프로모터(Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); CMV 프로모터(Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); 라우스(Rous) 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복에 함유된 프로모터(Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터(Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); 메탈로티오닌 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열(Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); 및 원핵생물 프로모터, 예컨대 베타-락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); 또는 tac 프로모터(DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 조직 특이성을 발현하고 형질전환 동물에서 사용되는 하기 동물 전사 제어 구역이 또한 관심 있다: 돼장 신포 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 제어 구역(Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*,

1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* **7**:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 제어 구역(Hanahan, 1985, *Nature* **315**:115-122); 림프성 세포에서 활성인 면역글로블린 유전자 제어 구역(Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* **38**:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* **318**:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* **7**:1436-1444); 고환, 유방, 림프성 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유방 종양 바이러스 제어 구역(Leder *et al.*, 1986, *Cell* **45**:485-495); 간에서 활성인 알부민 유전자 제어 구역(Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* **1**:268-276); 간에서 활성인 알파-태아-단백질 유전자 제어 구역(Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* **5**:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* **253**:53-58); 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 제어 구역(Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* **1**:161-171); 골수성 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 제어 구역(Mogram *et al.*, 1985, *Nature* **315**:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* **46**:89-94); 뇌에서의 올리고수지상 세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 제어 구역(Readhead *et al.*, 1987, *Cell* **48**:703-712); 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 제어 구역(Sani, 1985, *Nature* **314**:283-286); 및 시상하부에서 활성인 고나도트로핀 방출 호르몬 유전자 제어 구역(Mason *et al.*, 1986, *Science* **234**:1372-1378).

[0236] 인헨서 서열은 더 고등의 진핵생물에 의한 본 개시내용의 인자 Bb 항체를 포함하는 경쇄 또는 중쇄를 암호화하는 DNA의 전사를 개시하기 위해 벡터에 삽입될 수 있다. 인헨서는 전사를 증가시키기 위해 프로모터에서 작용하는, 보통 약 10-300bp 길이의, DNA의 시스 작용 요소이다. 인헨서는 전사 단위의 5' 및 3' 둘 다 위치에서 발견되는 비교적 배향 및 위치 독립적이다. 포유동물 유전자로부터 이용 가능한 여러 인헨서 서열이 공지되어 있다 (예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아-단백질 및 인슐린). 통상적으로, 그러나, 바이러스로부터의 인헨서를 사용한다. 당해 분야에 공지된 SV40 인헨서, 사이토메갈로 바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서는 진핵생물 프로모터의 활성화에 대한 예시적인 인헨싱 요소이다. 인헨서가 벡터에서 암호화 서열의 5' 또는 3'에 위치할 수 있으면서, 이것은 통상적으로 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다. 적절한 네이티브 또는 비상동성 신호 서열(리더 서열 또는 신호 펩타이드)을 암호화하는 서열은 항체의 세포외 분비를 촉진하기 위해 발현 벡터로 혼입될 수 있다. 신호 펩타이드 또는 리더의 선택은 항체가 생성되는 숙주 세포의 유형에 따라 달라지고, 비상동성 신호 서열은 네이티브 신호 서열을 대체할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 기능적인 신호 펩타이드의 예는 하기를 포함한다: 미국 특허 제4,965,195호에 기재된 인터류킨-7(IL-7)에 대한 신호 서열; 문헌[Cosman *et al.*, 1984, *Nature* **312**:768]에 기재된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; EP 특허 제0367 566호에 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩타이드; 미국 특허 제4,968,607호에 기재된 I형 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드; EP 특허 제0 460 846호에 기재된 II형 인터류킨-1 수용체 신호 펩타이드.

[0237] 본 개시내용의 현재 청구된 항체를 발현하기 위한 발현 벡터는 시작 벡터, 예컨대 상업적으로 구입 가능한 벡터로부터 작제될 수 있다. 이러한 벡터는 모든 원하는 플랭킹 서열을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 본 명세서에 기재된 하나 이상의 플랭킹 서열이 벡터에 이미 존재하지 않을 때, 이것은 개별적으로 얻어지고 벡터에 결합될 수 있다. 각각의 플랭킹 서열을 얻는 방법은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0238] 벡터가 작제되고, 경쇄, 중쇄를 암호화하는 핵산 분자, 또는 인자 Bb 항원 결합 서열을 포함하는 경쇄 및 중쇄가 벡터의 적절한 부위로 삽입된 후, 완전한 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩타이드 발현을 위해 적합한 숙주 세포로 삽입될 수 있다. 선택된 숙주 세포로 인자 Bb 항체에 대한 발현 벡터의 형질전환은 형질감염, 감염, 인산칼슘 공침, 전기천공, 마이크로주사, 리포펙틴, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 또는 다른 공지된 기법을 포함하는 널리 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로 사용하고자 하는 숙주 세포의 유형의 기능일 것이다. 이 방법 및 다른 적합한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어 상기 Sambrook 등의 문헌(2001)에 기재되어 있다.

[0239] 숙주 세포는, 적절한 조건 하에 배양될 때, (숙주 세포가 이것을 배지로 분비하는 경우) 배양 배지로부터 또는 직접적으로 (이적이 분비되지 않는 경우) 이것을 생성하는 숙주 세포로부터 후속하여 수집될 수 있는 인자 Bb 항체를 합성시킨다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 인자, 예컨대 원하는 발현 수준, 활성화에 바람직하거나 필요한 폴리펩타이드 변형(예컨대, 글라이코실화 또는 포스포릴화) 및 생물학적 활성 분자로의 폴딩의 용이성에 따라 달라질 것이다. 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물일 수 있다.

[0240] 발현을 위해 숙주로서 이용 가능한 포유동물 세포주는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(baby hamster kidney: BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), 및 다수의 다른 세포주(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 미국 균주 은행(American Type Culture Collection: ATCC)으로부터 이용 가능한 불활화된 세포주

를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에서, 세포주는 어떤 세포주가 높은 발현 수준을 가지고 C5 결합 특성을 가지는 항체를 구성적으로 생성하는지를 결정하는 것을 통해 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 그 자체의 항체를 만들지 않지만 비상동성 항체를 만들고 분비하는 능력을 가지는 B 세포 계통으로부터의 세포주를 선택할 수 있다.

[0241] 진단학적 및 치료학적 목적을 위한 인자 Bb 항체의 용도

[0242] 본 개시내용의 항체는 생물학적 샘플에서의 인자 Bb의 검출 및 인자 Bb 단백질을 생성하는 세포 또는 조직의 확인에 유용하다. 예를 들어, 본 개시내용의 인자 Bb 항체는 조직 또는 세포에서 발현된 인자 Bb를 검출하고/하거나 정량화하기 위한 진단학적 검정, 예를 들어 결합 검정에서 사용될 수 있다. 인자 Bb의 증가한 수준은 눈 장애, 암, 감염 및/또는 케양성 대장염과 같은 질환의 적응증일 수 있다. 인자 Bb의 감소한 수준은 간경변증, 사구체신염, 유전성 혈관부종, 간염, 신장 이식 거부, 루푸스 신염, 영양실조 및/또는 전신 홍반성 루푸스의 적응증일 수 있다.

[0243] 몇몇 실시형태에서, 인자 Bb에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항체는 이를 필요로 하는 환자에서 인자 Bb 매개 질환의 치료에서 사용될 수 있다. 또한, 본 개시내용의 인자 Bb 항체는 인자 Bb가 다른 보체 단백질과 복합체를 형성하는 것을 저해하여, 세포 또는 조직에서 인자 Bb의 생물학적 활성을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 인자 Bb에 결합하는 항체는 따라서 다른 결합 화합물과의 상호작용을 조절하고/하거나 차단할 수 있고, 그러므로 인자 Bb 매개 질환을 경감시키는 데 있어서 치료학적 용도를 가질 수 있다.

[0244] 몇몇 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 인자 Bb의 프로테아제 활성을 차단할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 인자 Bb 항체에 의한 인자 Bb의 결합은 인자 Bb 유도 신호 전달 캐스케이드를 파괴시킬 수 있다.

[0245] 진단학적 방법

[0246] 본 개시내용의 항체는 인자 Bb 또는 인자 B와 연관된 질환 및/또는 병태를 검출하거나, 진단하거나, 모니터링하기 위한 진단학적 목적에 사용될 수 있다. 본 개시내용은 당해 분야의 당업자에게 공지된 전통적인 면역조직학적 방법을 이용하여 샘플 중의 인자 Bb의 존재의 검출을 제공한다(예를 들어, 문헌[Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen *et al.*, 1985, *J. Cell. Biol.* 101:976-985; Jalkanen *et al.*, 1987, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096]). 인자 Bb의 검출은 생체내 또는 실험실내 수행될 수 있다.

[0247] 본 명세서에 제공된 진단학적 용도는 인자 Bb의 발현 및/또는 인자 Bb에 대한 결합을 검출하기 위한 항체의 용도를 포함한다. 인자 Bb의 존재의 검출에서 유용한 방법의 예는 면역검정, 예컨대 효소 결합 면역흡착 검정 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA) 및 방사면역검정(radioimmunoassay: RIA)을 포함한다.

[0248] 진단학적 용도를 위해, 항체는 통상적으로 검출 가능한 라벨링 그룹에 의해 표지될 수 있다. 적합한 라벨링 그룹은 방사성 동위원소 또는 방사성핵종(예를 들어, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 형광 그룹(예를 들어, FITC, 로다민, 란탄족 인광체), 효소 그룹(예를 들어, 겨자무과산화효소, β-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제), 화학발광 그룹, 바이오틀린 그룹, 또는 2차 리포터에 의해 인식된 미리 결정된 폴리펩타이드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 라벨링 그룹은 잠재적 입체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암을 통해 항체에 커플링된다. 단백질을 표지하기 위한 다양한 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 개시내용을 수행하는 데 있어서 사용될 수 있다.

[0249] 본 개시내용의 일 양상은 인자 Bb를 발현하는 세포 또는 세포들을 확인하는 것을 제공한다. 구체적인 실시형태에서, 항체는 라벨링 그룹에 의해 표지되고, 인자 Bb에 대한 표지된 항체의 결합이 검출된다. 추가의 구체적인 실시형태에서, 인자 Bb에 대한 항체의 결합은 생체내 검출될 수 있다. 추가의 구체적인 실시형태에서, 항체/인자 Bb 복합체는 당해 분야에 공지된 기법을 이용하여 단리되고 측정된다. 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 and periodic supplements); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons]을 참조한다.

[0250] 본 개시내용의 또 다른 양상은 인자 Bb에 대한 결합에 대해 본 개시내용의 항체와 경쟁하는 시험 분자의 존재를 검출하는 것을 제공한다. 이러한 검정의 예는 시험 분자의 존재 또는 부재 하에 인자 Bb의 일정량을 함유하는

용액 중에 유리 항체의 양을 검출하는 것을 수반할 것이다. 유리 항체(즉, 인자 Bb에 결합되지 않은 항체)의 양의 증가는 시험 분자가 인자 Bb 결합에 대해 항체와 경쟁할 수 있다는 것을 나타낼 것이다. 일 실시형태에서, 항체는 라벨링 그룹에 의해 표지된다. 대안적으로, 시험 분자는 표지되고, 유리 시험 분자의 양은 항체의 존재 및 부재 하에 모니터링된다.

[0251] 적응증

[0252] 보체 시스템은 죽상동맥경화증, 급성 심근경색 이후 허혈-재관류, 헤노흐-쑤라인 자색반 신장염, 면역 복합 혈관염, 류마티스 관절염, 혈관염, 동맥류, 뇌졸중, 심근병증, 출혈성 쇼크, 충돌 손상, 다발성 장기 부전, 저혈량성 쇼크 및 장관 허혈, 이식 거부, 심장 수술, PTCA, 자연 유산, 뉴런 손상, 척수 손상, 중증 근무력증, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 갈랑 바레 증후군, 파킨슨병, 알츠하이머병, 급성 호흡 곤란 증후군, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 수혈 관련 급성 폐 손상, 급성 폐 손상, 굿패스처병, 심근경색, 심폐 우회술 후 염증, 심폐 우회술, 폐혈성 쇼크, 이식 거부, 이종 이식, 화상 손상, 전신 홍반성 낭창, 막성 신장염, 베게너 질환, 건선, 유사천포창, 피부근염, 항인지질 증후군, 염증성 장 질환, 혈액투석, 류코포레시스, 혈장교환술, 헤파린 유도 체외 막 산소화장치 LDL 침전, 체외 막 산소화장치 및 항반변성을 포함하는 여러 급성 및 만성 병태에 기여하는 것에 연루된다.

[0253] 황반 퇴행성 질환, 예컨대 모든 병기의 연령 관련 황반변성(AMD), 예컨대 건성 및 습성(비삼출성 및 삼출성) 형태, 맥락막 신생혈관화(CNV), 포도막염, 당뇨병 및 다른 허혈 관련 망막병증, 및 다른 눈내 신생혈관 질환, 예컨대 당뇨병 황반 부종, 병리학적인 근시, 폰 히펠-윈다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 중앙 망막 정맥 폐색(CRVO), 분지 망막 정맥 폐색(BRVO), 각막 신생혈관화, 및 망막 신생혈관화. 보체 관련 눈 병태의 바람직한 그룹은 연령 관련 황반변성(AMD), 예컨대 비삼출성(습성) 및 삼출성(건성 또는 위축성) AMD, 맥락막 신생혈관화(CNV), 당뇨병 망막병증(DR) 및 내안구염을 포함한다.

[0254] 현재 개시된 항-인자 Bb 항체는 하나 이상의 사이토카인, 림포카인, 조혈 인자(들) 및/또는 소염제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0255] 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료는 본 명세서에 제공된 하나 이상의 항체에 의한 치료제와 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 통증 및 염증의 제어를 위한 제1선 약물의 용도를 포함할 수 있다. 이 약물은 비스테로이드성, 소염 약물(non-steroidal, anti-inflammatory drug: NSAID)로 분류된다. 2차 치료제는 코티코스테로이드, 서방 작용 항류마티스 약물(slow acting antirheumatic drug: SAARD), 또는 질환 변형(DM) 약물을 포함한다. 하기 화합물에 관한 정보는 문헌[The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (1992) 및 Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.]에서 발견될 수 있다.

[0256] 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료를 위한 항체 및 임의의 하나 이상의 NSAID의 용도에 관한 것이다. NSAID는 적어도 부분적으로 프로스타글란딘 합성의 저해에 이의 소염 작용을 가진다(Goodman and Gilman in "The Pharmacological Basis of Therapeutics," MacMillan 7th Edition (1985)). NSAID는 (1) 살리실산 유도체; (2) 프로피온산 유도체; (3) 아세트산 유도체; (4) 페남산 유도체; (5) 카복실산 유도체; (6) 뷰티르산 유도체; (7) 옥시카ם; (8) 피라졸 및 (9) 피라졸론의 9개의 그룹으로 분류될 수 있다.

[0257] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 살리실산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 이러한 살리실산 유도체, 프로드럭 에스터 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 아세트아미노살롤, 알록시프린, 아스피린, 베노릴레이트, 브로모살리게닌, 칼슘 아세틸살리실레이트, 콜린 마그네슘 트라이살리실레이트, 마그네슘 살리실레이트, 콜린 살리실레이트, 디플루시날, 에테르살레이트, 펜도살, 겐티신산, 글리콜 살리실레이트, 이미다졸 살리실레이트, 라이신 아세틸살리실레이트, 메살라민, 모르몰린 살리실레이트, 1-나프틸 살리실레이트, 올살라진, 파르살마이드, 페닐 아세틸살리실레이트, 페닐 살리실레이트, 살라세트아마이드, 살리실아마이드 0-아세트산, 살살레이트, 나트륨 살리실레이트 및 설파살라진을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 살리실산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0258] 추가적인 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 프로피온산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 프로피온산 유도체, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 알미노프로펜, 페녹사프로펜, 부클록산,

카르프로펜, 텍신도프로펜, 페노프로펜, 플루녹사프로펜, 플루프로펜, 플루르비프로펜, 푸르클로프로펜, 이부프로펜, 이부프로펜 알루미늄, 이부프록삼, 인도프로펜, 이소프로펜, 케토프로펜, 록소프로펜, 미로프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, 옥사프로진, 피케토프로펜, 피메프로펜, 피르프로펜, 프라노프로펜, 프로티진산, 피리독시프로펜, 수프로펜, 티아프로펜산 및 티옥사프로펜을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 프로피온산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0259] 훨씬 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 아세트산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 아세트산 유도체, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 아세메타신, 알클로페낙, 암페낙, 부펙사막, 신메타신, 클로피락, 텔메타신, 디클로페낙 칼륨, 디클로페낙 나트륨, 에토돌락, 펠비낙, 펜클로페낙, 펜클로락, 펜클로르산, 펜티아작, 푸로페낙, 글루카메타신, 이부페낙, 인도메타신, 이소페졸락, 이속세팍, 이나조락, 메티아진산, 옥사메타신, 옥스피낙, 피메타신, 프로글루메타신, 숄린탁, 탈메타신, 티아라마이드, 티오피낙, 툴메틴, 툴메틴 나트륨, 지도메타신 및 조메피락을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 아세트산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0260] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 페남산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 페남산 유도체, 프로드럭 에스터 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 엔페남산, 에토펜아메이트, 플루페남산, 이소닉신, 메클로페남산, 메클로페나메이트 나트륨, 메도페남산, 메페남산, 니플롬산, 탈니플루메이트, 테로페나메이트, 툴페남산 및 우페나메이트를 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 페남산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0261] 추가적인 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 카복실산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 사용될 수 있는 카복실산 유도체, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 클리다낙, 디플루니살, 플루페니살, 이노리딘, 케토롤락 및 티노리딘을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 카복실산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0262] 훨씬 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 뷰티르산 유도체, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 뷰티르산 유도체, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 부마디존, 부티부펜, 펜부펜 및 젠부신을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 뷰티르산 유도체는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0263] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 옥시캄, 프로드럭 에스터, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 옥시캄, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 드록시캄, 예놀리캄, 이속시캄, 피록시캄, 수독시캄, 테독시캄 및 4-하이드록실-1,2-벤조티아진 1,1-디옥사이드 4-(N-페닐)-카복스아마이드를 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 옥시캄은 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0264] 훨씬 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 피라졸, 프로드럭 에스터, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 사용될 수 있는 피라졸, 프로드럭 에스터, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 디페나미졸 및 에피리졸을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 피라졸은 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0265] 추가적인 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 피라졸론, 프로드럭 에스터, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 사용될 수 있는 피라졸론, 프로드럭 에스터 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 아파존, 아자프로파존, 벤즈피페릴론, 페프라존, 모페부타존, 모라존, 옥시펜부타존, 페닐부타존, 피페부존, 프로필펜아존, 라미페나존, 숙시부존 및 티아졸리노부타존을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 피라졸론은 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0266] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 임의의 하나 이상의 하기 NSAID와 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다: ε-아세트아미도카프로산, S-아테노실-메티오닌, 3-아미노-4-하이드록시뷰티르산, 아미세트리온, 안트라자펜, 안트라페닌, 벤다작, 벤다작 리시네이트, 벤지다민, 베프로진, 브로

페라몰, 부콜롬, 부페졸락, 시프로퀴아존, 클록시메이트, 다지다민, 테복사메트, 데토미딘, 디펜피라마이드, 디펜피라마이드, 디피살라민, 디타졸, 에모르파존, 파네티아졸 메실레이트, 펜플루미졸, 플록타페닌, 플루미졸, 플루닉신, 플루프로퀴아존, 포피르톨린, 포스포살, 구아니메살, 구아니아졸론, 이소닉시론, 레페타민 HCl, 레플루모나이드, 로페미졸, 로티파졸, 라이신 클로닉시네이트, 메세클라존, 나부메톤, 닉틴돌, 니메술라이드 오르그테인, 오르파녹신, 옥사세프롤, 옥사파돌, 파라닐린, 페리속살, 페리속살 시트레이트, 피폭심, 피프록센, 피라졸락, 피르페니돈, 프로퀴아존, 프록사졸, 티엘라빈 B, 티플라미졸, 티메가딘, 토렉틴, 톨파돌, 트립타미드 및 회사 코드 번호, 예컨대 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTE16090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901(4-벤조일-1-인단카복실산), TVX2706, U60257, UR2301 및 WY41770으로 지칭되는 것. NSAID와 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 NSAID는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0267] 훨씬 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 급성 및 만성 염증, 예컨대 류마티스 질환, 이식편 대 숙주 질환 및 다발성 경화증을 포함하는 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료를 위한 임의의 하나 이상의 코티코스테로이드, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 코티코스테로이드, 프로드럭 에스터 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 하이드로코티손 및 하이드로코티손, 예컨대 21-아세트옥시프레그네놀론, 알칼로메라손, 알게스톤, 암시노나이드, 베클로메타손, 베타메타손, 베타메타손 발러레이트, 부테소나이드, 클로로프레드니손, 클로베타솔, 클로베타솔 프로피오네이트, 클로베타손, 클로베타손 뷰티레이트, 클로코르톨론, 클로프레드놀, 코르티코스테론, 코티손, 코르티바졸, 데플라자론, 데소나이드, 데속시메라손, 텍사메타손, 디플로라손, 디플루코르톨론, 디플루프레드네이트, 에녹솔론, 플루아자코르트, 플루클로로나이드, 플루메타손, 플루메타손피발레이트, 플루시놀론 아세토나이드, 플루니소라이드, 플루오시노나이드, 플루오로시놀론 아세토나이드, 플루오코르틴 뷰틸, 플루오코르톨론, 플루오코르톨론, 헥사노에이트, 디플루코르톨론 발러레이트, 플루오로메톨론, 플루페롤론 아세테이트, 플루프레드니텐 아세테이트, 플루프레드니솔론, 플루란데놀라이드, 포르모코르탈, 할시노나이드, 할로메타손, 할로프레돈 아세테이트, 하이드로-코르타메이트, 하이드로코티손, 하이드로코티손 아세테이트, 하이드로-코티손 뷰티레이트, 하이드로코티손 포스페이트, 하이드로코티손 21-나트륨 숙시네이트, 하이드로코티손 테부테이트, 마지프레돈, 메드리손, 메프레드니손, 메틸프레드니솔론, 모메타손 푸로에이트, 파라메타손, 프레드니카르베이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 21-디에드리아미노아세테이트, 프레드니솔론 인산나트륨, 프레드니솔론 나트륨 숙시네이트, 프레드니솔론 나트륨 21-*m*-설포벤조에이트, 프레드니솔론 나트륨 21-스테아로글리콜레이트, 프레드니솔론 테부테이트, 프레드니솔론 21-트라이메틸아세테이트, 프레드니손, 프레드니발, 프레드닐리텐, 프레드닐리텐 21-다이에틸아미노아세테이트, 텍소코르톨, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토나이드, 트리암시놀론 베네토나이드 및 트리암시놀론 헥사세토나이드로부터 유래한 화합물을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 코티코스테로이드는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0268] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 급성 및 만성 염증, 예컨대 류마티스 질환, 이식편 대 숙주 질환 및 다발성 경화증을 포함하는 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료를 위한 임의의 하나 이상의 서방 작용 항류마티스 약물(slow-acting antirheumatic drug: SAARD) 또는 질환 변경 항류마티스 약물(disease modifying antirheumatic drug: DMARD), 프로드럭 에스터, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. SAARD 또는 DMARD, 프로드럭 에스터 및 이의 약제학적으로 허용되는 염은 알로쿠프레이드 나트륨, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아우로티오글리카나이드, 아자티오프린, 브레쿠이나르 나트륨, 부실라민, 칼슘 3-아우로티오-2-프로판올-1-설포네이트, 클로르암부실, 클로로퀸, 클로부자리트, 쿠프록솔린, 사이클로-포스파마이드, 사이클로스포린, 답손, 15-데옥시스페르구알린, 디아세레인, 글루코사민, 금 염(예를 들어, 사이클로퀸 금 염, 금 나트륨 티오말레이트, 금 나트륨 티오설페이트), 하이드록시클로로퀸, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 하이드록시우레아, 케부존, 레바미솔, 로벤자리트, 멜리틴, 6-머캅토프린, 메토크세이트, 미조리빈, 마이코페놀레이트 모페틸, 미오랄, 질소 머스타드, D-페니실라민, 피리딘올 이미다졸, 예컨대 SKNF86002 및 SB203580, 라파마이신, 티올, 티모포이에틴 및 빈크리스틴을 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 SAARD 또는 DMARD는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다.

[0269] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 급성 및 만성 염증을 포함하는 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료를 위한 임의의 하나 이상의 COX2 저해제, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. COX2 저해제, 프로드럭 에스터 또는 이의

약제학적으로 허용되는 염의 예는 예를 들어 셀레콕시브를 포함한다. 유사한 진통 및 소염 특성을 가지는 구조적으로 관련된 COX2 저해제는 또한 이 그룹에 포함되는 것으로 의도된다. COX-2 선택적 저해제의 예는 에토리콕시브, 발데콕시브, 셀레콕시브, 리코셀론, 루미라콕시브, 로페콕시브 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0270] 훨씬 또 다른 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용은 급성 및 만성 염증을 포함하는 본 명세서에 언급된 질환 및 장애의 치료를 위한 임의의 하나 이상의 항미생물제, 프로드럭 에스터 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염과 조합(예비치료, 후치료, 또는 공존 치료)된 항체의 용도에 관한 것이다. 항미생물제는 예를 들어 광범위한 종류의 페니실린, 세팔로스포린 및 다른 베타-락탐, 아미노글라이코사이드, 아졸, 퀴놀론, 마크롤라이드, 리파마이신, 테트라사이클린, 설프아마이드, 린코사마이드 및 폴리믹신을 포함한다. 페니실린은 페니실린 G, 페니실린 V, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플록사실린, 암피실린, 암피실린/술바탐, 아목시실린, 아목시실린/클라불라네이트, 헵타실린, 사이클라실린, 바캄피실린, 카르베니실린, 카르베니실린 인다닐, 티카르실린, 티카르실린/클라불라네이트, 아즐로실린, 메즐로실린, 페페라실린 및 메실리남을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 세팔로스포린 및 다른 베타-락탐은 세팔로틴, 세파피린, 세팔렉신, 세프라딘, 세파졸린, 세파드록실, 세파클러, 세파만돌, 세포테탄, 세폭시틴, 세루록심, 세포니시드, 세포라딘, 세픽심, 세포탁심, 목사락탐, 세프티죽심, 세트리아손, 세포페라존, 세프타지딤, 이미페넴 및 아스트레오남을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 아미노글라이코사이드는 스트렙토마이신, 겐타미신, 토브라마이신, 아미카신, 네틸미신, 카나마이신 및 네오마이신을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 아졸은 플루코나졸을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 퀴놀론은 날리딕신산, 노르플록사신, 에녹사신, 시프로플록사신, 오픈록신, 스파플록신 및 테마플록사신을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 마크롤라이드는 에리쓰로마이신, 스피라마이신 및 아지쓰로마이신을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 리파마이신은 리팜핀을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 테트라사이클린은 스피사이클린, 클로르테트라사이클린, 클로모사이클린, 데메클로사이클린, 데옥시사이클린, 구아메사이클린, 라이메사이클린, 메클로사이클린, 메타사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 페니메피사이클린, 피파사이클린, 롤리테트라사이클린, 산사이클린, 세노시클린 및 테트라사이클린을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 설프아마이드는 숄파닐라마이드, 숄파메톡사졸, 숄파세트아마이드, 숄파디아진, 숄피속사졸 및 코-트리목사졸(트라이메토프림/숄파메톡사졸)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 린코사마이드는 클린다마이신 및 린코마이신을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 폴리믹신(폴리펩타이드)은 폴리믹신 B 및 콜리스틴을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0271] 치료 방법: 약제학적 제제, 투여 경로

[0272] 치료학적 유효량의 하나 또는 복수의 본 개시내용의 항체를 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 보존제 및/또는 아췌벤트와 함께 포함하는 조성물이 개시되어 있다. 또한, 본 개시내용은 이러한 약제학적 조성물을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 환자는 인간 대상체 또는 동물 대상체일 수 있다.

[0273] 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 인자 Bb 활성을 감소시키도록 사용될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 인자 Bb 활성과 연관된 결과, 증상 및/또는 병리학을 치료하는 데 사용될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 보체 경로 및/또는 다른 보체 단백질에 대한 인자 Bb 결합을 저해하는 방법에서 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 항체는 인자 Bb의 프로테아제 활성을 저해한다. 추가적인 실시형태에서, 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 인자 Bb 프로테아제 활성을 저해하는 방법에서 사용될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 인자 Bb 활성과 연관된 결과, 증상 및/또는 병리학을 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 MAC의 생성을 저해하는 방법에서 사용될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 황반변성을 저해하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0274] 바람직하게는, 허용되는 제제 재료는 사용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이다. 구체적인 실시형태에서, 치료학적 유효량의 인자 Bb 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0275] 소정의 실시형태에서, 허용되는 제제 재료는 바람직하게는 사용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이다. 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 예를 들어 pH, 삼투도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 조성물의 흡수 또는 침투를 변경시키거나, 유지시키거나 보존시키는 제제 재료를 함유할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적합한 제제 재료는 아미노산(예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신); 항미생물제; 항산화제(예컨대, 아스코르브산, 황산나트륨 또는 나트륨 수소-설파이트); 완충제(예컨대, 보레이트, 중탄산염, 트리스-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 다른 유기산);

벌크화제(예컨대, 만니톨 또는 글리신); 킬레이트화제(예컨대, 에틸렌다이아민 테트라아세트산(EDTA)); 복합체 화제(예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제; 모노사카라이드; 다이사카라이드; 및 다른 탄수화물(예컨대, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린); 단백질(예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 향료 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예컨대, 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩타이드; 염 형성 반대이온(예컨대, 나트륨); 보존제(예컨대, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 펜에틸 알콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 수소 퍼옥사이드); 용매(예컨대, 글라이세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알콜(예컨대, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(예컨대, 플루로닉, PEG, 소르비탄 에스터, 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사팔); 안정성 증대물질(예컨대, 수크로스 또는 소르비톨); 등장성 증대물질(예컨대, 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨 클로라이드, 만니톨 소르비톨); 전달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 약제학적 아췌버트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company] 을 참조한다.

[0276] 소정의 실시형태에서, 최적 약제학적 조성물은 예를 들어 의도되는 투여 경로, 전달 포맷 및 원하는 투약량에 따라 당해 분야의 당업자에 의해 결정될 것이다. 예를 들어 상기 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 문헌을 참조한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 조성물은 본 개시내용의 항체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 청소율에 영향을 미칠 수 있다. 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물 내의 1차 비히클 또는 담체는 사실상 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 적합한 비히클 또는 담체는 가능하게는 비경구 투여를 위해 조성물에 혼한 다른 재료가 보충된 주사용수, 생리학적 식염수 용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 구체적인 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 트리스 완충제, 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 완충제를 포함하고, 소르비톨 또는 이에 대한 적합한 치환체를 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 소정의 실시형태에서, 인자 Bb 항체 조성물은 원하는 정도의 순도를 가지는 선택된 조성물을 동결건조 케이크 또는 수용액 형태의 임의의 제제 물질과 혼합함으로써 저장에 준비될 수 있다(상기 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES). 추가로, 소정의 실시형태에서, 인자 Bb 항체 생성물은 적절한 부형제, 예컨대 수크로스를 사용하여 동결건조물로서 제제화될 수 있다.

[0277] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 비경구 전달에 선택될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 흡입을 위해 또는 소화관을 통한 전달을 위해, 예컨대 경구로 선택될 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 조성물의 제법은 당해 분야의 기술 내에 있다.

[0278] 제제 성분은 바람직하게는 투여 부위에 허용되는 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 완충제는 생리학적 pH 에서 또는 약간 더 낮은 pH에서, 통상적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에 조성물을 유지시키도록 사용될 수 있다.

[0279] 비경구 투여가 고려될 때, 본 개시내용에서 사용하기 위한 치료학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 비히클 중 에 원하는 인자 Bb 항체를 포함하는 발열원 비함유의, 비경구로 허용되는 수용액의 형태로 제공될 수 있다. 비경구 주사에 특히 적합한 비히클은 인자 Bb 항체가 적절히 보존된 무균, 등장성 용액으로서 제제화되는 무균 증류수이다. 소정의 실시형태에서, 제제는 물질에 의한 원하는 분자의 제제, 예컨대 주사용 마이크로구, 생분해성 입자, 중합체 화합물(예컨대, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜을 포함할 수 있고, 이들은 데포 주사를 통해 전달될 수 있는 생성물의 제어 또는 지속 방출을 제공할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 순환 시 지속된 기간을 촉진하는 효과를 가지는 히알루론산을 또한 사용할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이식 가능한 약물 전달 장치는 원하는 항체를 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0280] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 흡입을 위해 제제화될 수 있다. 이 실시형태에서, 인자 Bb 항체는 유리하게는 건조, 흡입 가능한 분말로 제제화된다. 구체적인 실시형태에서, 인자 Bb 항체 흡입 용액은 에어로졸 전달을 위한 추진제와 또한 제제화될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 용액은 분무화될 수 있다. 폐 투여 및 제제 방법은 따라서 화학적으로 변형된 단백질의 폐 전달을 기술하는 국제 특허 출원 제PCT/US94/001875호(참조문헌으로 인용됨)에 추가로 기재되어 있다. 제제가 투여된 경구로 투여될 수 있는 것으로 또한 고려된다. 이러한 방식으로 투여되는 인자 Bb 항체는 고체 제형, 예컨대 정제 및 캡슐의 제제화에서 습관적으로 사용되는 담체와 함께 또는 담체 없이 제제화될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 캡슐은 생체이용률이 최대화되고 예비 전신 분해가 최소화

될 때 위장관에서의 지점에서 제제의 활성 부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 추가적인 물질은 인자 Bb 항체의 흡수가 수월하도록 포함될 수 있다. 희석제, 향료, 저융점 왁스, 식물성 오일, 활택제, 현탁제, 정제 봉해제 및 결합제를 또한 사용할 수 있다.

[0281] 유효 분량의 하나 또는 복수의 인자 Bb 항체를 정제의 제조에 적합한 비독성 부형제와의 혼합물로 포함하는 본 개시내용의 약제학적 조성물이 바람직하게 제공된다. 정제를 무균 물, 또는 또 다른 적절한 비허클 중에 용해함으로써, 용액은 단위 용량 형태로 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 불활성 희석제, 예컨대 탄산칼슘, 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨, 락토스, 또는 인산칼슘; 또는 결합제, 예컨대 전분, 젤라틴, 또는 아카시아; 또는 활택제, 예컨대 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 또는 활석을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0282] 지속 또는 제어 전달 제제에서 인자 Bb 항체를 포함하는 제제를 포함하는 추가적인 약제학적 조성물이 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 다양한 다른 지속 또는 제어 전달 수단, 예컨대 리포솜 담체, 생분해성 마이크로입자 또는 다공성 비드 및 데포 주사를 제제화하기 위한 기법은 당해 분야의 당업자에게 또한 공지되어 있다. 예를 들어 약제학적 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체 마이크로입자의 제어 방출을 기술하는 국제 특허 출원 제PCT/US93/00829호(참조문헌으로 인용됨)를 참조한다. 지속 방출 제제는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스터, 하이드로겔, 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호 및 유럽 특허 출원 공보 제EP 058481호(이들 각각은 참조문헌으로 인용됨)에 개시된 바대로), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 2:547-556), 폴리(2-하이드록시에틸-이네타크릴레이트)(Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 및 Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), 에틸렌 비닐 아세테이트(상기 Langer 등의 문헌(1981)) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산(유럽 특허 출원 공보 EP 제133,988호)을 포함할 수 있다. 지속 방출 조성물은 당해 분야에 공지된 임의의 여러 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692]; 유럽 특허 출원 공보 EP 제036,676호; EP 제088,046호 및 EP 제143,949호(참조문헌으로 인용됨)를 참조한다.

[0283] 생체내 투여에 사용되는 약제학적 조성물은 통상적으로 무균 제제로서 제공된다. 살균은 무균 여과 막을 통해 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조될 때, 이 방법을 이용한 살균은 동결건조 및 재구성 전에 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여를 위한 조성물은 동결건조 형태 또는 용액 중에 저장될 수 있다. 비경구 조성물은 일반적으로 무균 접근 포트를 가지는 용기, 예를 들어 정맥내 용액 백 또는 피하 주사침이 관통할 수 있는 스톱퍼를 가지는 바이알에 위치한다.

[0284] 약제학적 조성물이 제제화되면, 이것은 용액, 현탁액, 겔, 에멀션, 고체, 결정, 또는 탈수 또는 동결건조 분말로서 무균 바이알 내에 저장될 수 있다. 이러한 제제는 사용 준비(ready-to-use) 형태 또는 투여 전에 재구성되는 형태(예를 들어, 동결건조 형태)로 저장될 수 있다. 본 개시내용은 또한 단일-용량 투여 단위를 생성하기 위한 키트를 제공한다. 본 개시내용의 키트는 각각 건조된 단백질을 가지는 제1 용기 및 수성 제제를 가지는 제2 용기 둘 다를 함유할 수 있다. 본 개시내용의 소정의 실시형태에서, 단일 및 다중 챔버 프리필드 주사기(예를 들어, 액체 주사기 및 동결주사기)를 함유하는 키트가 제공된다.

[0285] 사용되는 인자 Bb 항체 함유 약제학적 조성물의 치료학적 유효량은 예를 들어 치료학적 상황 및 목적에 따라 달라질 것이다. 당해 분야의 당업자는 치료에 대한 적절한 투약량 수준이 부분적으로 전달되는 분자, 인자 Bb 항체가 사용되는 적응증, 투여 경로, 및 환자의 몸집(체중, 신체 표면 또는 장기 크기) 및/또는 상태(연령 및 일반 건강)에 따라 달라질 것이라는 것을 이해할 것이다. 소정의 실시형태에서, 임상적 투약량을 적정하고 최적 치료학적 효과를 얻기 위한 투여 경로를 변형시킬 수 있다. 통상적인 투약량은 상기 언급된 인자에 따라 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 30mg/kg까지 또는 이것 초과 범위일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 투약량은 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 30mg/kg, 임의로 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 30mg/kg 또는 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 5mg/kg의 범위일 수 있다.

[0286] 투약 빈도는 사용되는 제제에서 특정한 인자 Bb 항체의 약동학적 매개변수에 따라 달라질 것이다. 통상적으로, 임상적 원하는 효과를 달성하는 투약량이 도달될 때까지 조성물을 투여한다. 조성물은 따라서 시간에 걸쳐 단일 용량으로서, 또는 2개 이상 용량으로서(동일한 양의 원하는 분자를 함유하거나 함유하지 않을 수 있음), 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 점적주사로서 투여될 수 있다. 적절한 투약량의 추가 개선은 당해 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이루어지고, 이들에 의해 통상적으로 수행되는 업무 영역 내에 있다. 적절한 투약량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통해 확신될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 연장된 기간에 걸쳐 환자에게 투여될 수 있다. 본 개시내용의 항체의 만성 투여는 완전 인간이 아닌 항체, 예를 들어 비인간 동물에서 인간 항원에 대해 키워진 항체, 예를 들어 비완전 인간 항체 또는 비인간 종에서 생성된

비인간 항체와 보통 연관된 불리한 면역 또는 알레르기 반응을 최소화한다.

- [0287] 약제학적 조성물의 투여 경로는 공지된 방법에 의해, 예를 들어 경구로, 정맥내, 복강내, 대뇌내(뇌실질내), 뇌실내, 근육내, 눈에, 유리체내, 망막하, 동맥내, 문맥내 또는 병변내 경로에 의해 주사를 통해; 지속 방출 시스템에 의해 또는 이식 장치에 의해 따를 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 볼루스 주사에 의해 또는 점적 주사에 의해 연속적으로, 또는 이식 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0288] 조성물은 막, 스펀지 또는 원하는 분자가 흡수되거나 캡슐화되는 또 다른 적절한 재료의 이식을 통해 국소로 또한 투여될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이식 장치가 사용될 때, 장치는 임의의 적절한 조직 또는 장기로 이식될 수 있고, 원하는 분자의 전달은 확산, 정기 방출 볼루스, 또는 연속 투여를 통해서일 수 있다. 눈 임플란트의 경우, 임플란트는 눈에 주사, 유리체내 주사, 망막하 주사, 맥락막위 주사, 안와 뒤 주사 또는 건주하 주사를 통해 이식될 수 있다.
- [0289] 본 개시내용에 따른 인자 Bb 항체 약제학적 조성물을 생체의 사용하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 환자로부터 제거된 세포, 조직 또는 장기는 세포, 조직 및/또는 장기가 환자에게 후속하여 다시 이식된 후 인자 Bb 항체 약제학적 조성물에 노출된다.
- [0290] 특히, 인자 Bb 항체는 인자 Bb 항체를 발현시키고 분비시키기 위해 본 명세서에 기재된 것과 같은 방법을 이용하여 유전적으로 조작된 소정의 세포를 이식함으로써 전달될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이러한 세포는 동물 또는 인간 세포일 수 있고, 자가, 비상동성 또는 이종일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포는 불활화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역학적 반응의 기회를 감소시키기 위해, 세포는 둘러싼 조직의 침윤을 피하기 위해 캡슐화될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 캡슐화 재료는 통상적으로 단백질 생성물(들)의 방출을 허용하지만, 환자의 면역계에 의한 또는 둘러싼 조직으로부터의 다른 해로운 인자에 의한 세포의 파괴를 막는, 생체적합성, 반투과성 중합체 인클로저 또는 막이다.
- [0291] 본 명세서의 본문 내에 인용된 모든 참조문헌은 그 전문이 참조문헌으로 명확히 본 명세서에 인용된다.
- [0292] 실시예
- [0293] 수행된 실험 및 달성된 결과를 포함하는 하기 실시예는 오직 예시 목적을 위해 제공되고 본 개시내용을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0294] 실시예 1 - 항-인자 B 항체와 비교된 항-인자 Bb 항체의 결합 검정
- [0295] 바이오센싱 검정법(BLI), 라벨 비함유 기술은 항-인자 Bb 단일클론 항체에 의한 인자 Bb(콤테크(CompTech)(등록상표)) 및 인간 인자 B 항원(CompTech(등록상표))의 결합 동력학을 측정하기 위해 사용된다. 친화도 측정은 항-인자 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서 팀(ForteBio(등록상표))(미국 캘리포니아주 멘로 파크)이 구비된 옥테트(Octet) QK^c에 의해 수행하였다. 검정을 1x PBS 완충제(깁코(Gibco)(등록상표), PBS pH7.2) 중에 30°C에서 수행하였다. 샘플을 1000rpm에서 교반하였다. 분석 전에, 센서를 15분 동안 습윤시켰다.
- [0296] 정제된 항-인자 Bb 항체를 AHC 센서 팀에 의해 이의 결합 능력에 대해 시험하였다. 20µg/ml의 항-인자 Bb 항체를 사용하여 팀을 로딩하였다. 로딩이 300초 동안 진행되어서 1.8nm 내지 2nm의 포획 수준을 생성시켰다. 인자 Bb 또는 인자 B 항원을 1x PBS 중에 50nM의 농도로 희석함으로써 결합 분석에 대해 준비하였다. 희석을 개시시키고 200초 동안 모니터링하고, 이후 팀을 분해를 모니터링하기 위해 인자 단백질(Gibco, PBS(pH 7.2)) 없이 1xPBS 완충제로 옮겼다. 센서 데이터를 실험을 통해 수집하고 진행시키고 옥테트 데이터 분석 소프트웨어 7(Forte Bio)을 사용하여 분석하였다.
- [0297] 인자 Bb 및 인자 B 단백질에 대한 결합 상수를 비교함으로써 항-인자 Bb 항체의 민감도를 처음에 시험하였다. 이 분석을 포르테 바이오(등록상표)로부터의 옥테트 QK^c 시스템을 사용하여 수행하였다. 50nM의 단백질 제제 중에 200초에 걸쳐 측정된 결합은 항-인자 Bb 항체가 인자 Bb에 특이적으로 결합하지만, 인자 B에 대한 결합이 상당히 더 낮다는 것을 나타낸다(도 1).
- [0298] 실시예 2 - 항-인자 Bb 단일클론 항체의 기능적 검정
- [0299] 용혈 평가 -- (AP)의 대안적인 경로의 활성화는 전통적인 경로보다 더 높은 농도의 혈청을 요한다. 일반적으로, 5mM EGTA의 존재 하의 5mM Mg⁺⁺의 최종 농도는 EGTA가 Ca⁺⁺를 우선적으로 킬레이트화하는 검정에서 사용된다. 대부분의 포유동물 종의 AP는 토끼 적혈구에 의해 동시에 활성화되어서, 이들은 편리한 표적이다. GVBO(콤프테

크 프로덕츠)에 의해 3회 세척하고 5×10^8 /ml로 재현탁시킴으로써 토끼 적혈구(Complement Technology, Inc.)를 준비한다. 상이한 양의 항-인자 Bb 항체를 GVB0에 의해 희석한다. 연속 희석된 항-B 인자b 항체, 0.1M MgEGTA (콤프테크 프로덕츠), 1/2NHS(GVB0에 의해 1/2 희석된 정상 인간 혈청), 및 토끼 Er의 순서로 얼음에서 100 μ l의 반응물을 혼합한다. 이후, 진탕기에서 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응물을 항온처리한다. 1.0ml의 차가운 GVBE를 첨가한다. 대략 1000xg 이상에서 3분 동안 혼합하고 원심분리하여 세포를 펠렛화한다. 100 μ l의 상청액을 96웰 플레이트로 옮기고, 412nm에서 판독한다(SoftMax Pro 4.7.1). 그래프패드 프리즘 4를 사용하여 데이터를 분석한다.

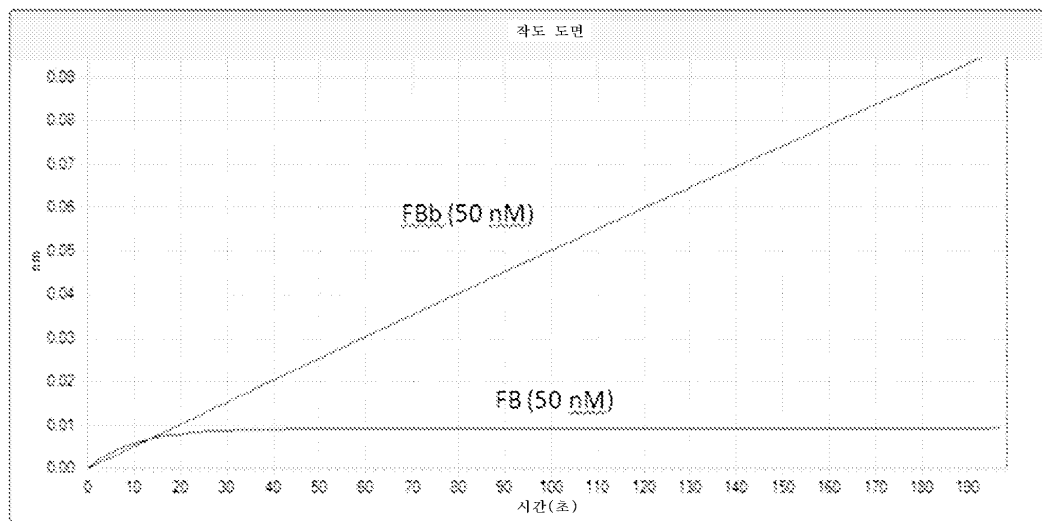
[0300] 결과 -- 항-인자 Bb 항체의 효력을 결정하기 위해, AP 용혈 검정을 수행하고, IC50nM은 용혈 반응의 50%를 저해하는 데 필요한 항체의 양이다. 데이터는 현재 개시된 항-인자 Bb 항체의 IC50이 약 40nM인 반면, 항-인자 B 항체의 IC50이 약 100nM이라는 것을 나타낸다(도 2). 따라서, 항-인자 Bb 항체는 AP 용혈 검정에서 항-인자 B 항체보다 약 10배 더 강력하다.

[0301] 실시예 3 - 생체내 효율 모델

[0302] 인간화된 H4L4 99A12 항체(각각 서열 번호 15 및 11)를 비인간 영장류 가벼운 손상 모델에서 시험하였다. H4L4 99A12 항체의 유리체내 투약은 음성 대조군에 비해 망막에서의 보체 침착을 차단하는 데 있어서 효율을 제공하였다. 이 데이터는 H4L4 99A12 항체의 국소 전달이 황반변성 및 다른 눈 병태의 인간에서의 치료와 관련된 생체내 모델에서 효율적이라는 것을 나타낸다.

도면

도면1



<130> 19371US (NTB)
<140> 14/631,057
<141> 2015-02-25
<150> 61/945,613
<151> 2014-02-27
<150> 61/947,880
<151> 2014-03-04
<160> 38
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 1
Gly Asp Ile Phe Ser Ser His Trp

1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 2
Glu Ile Leu Pro Arg Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Glu Asn Phe Asn
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 3

Ala Ile Asn Trp Glu Asp Ser

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 4

His Ala Ser Gln Asn Val Asn Val Trp Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 5

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu

1 5 10 15

Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu

65 70 75 80

Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr

 85 90 95

Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp

 100 105 110

Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met

 115 120 125

Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp

 130 135 140

Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg

145 150 155 160

Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn

 165 170 175

Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His

 180 185 190

Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln

 195 200 205

Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu

 210 215 220

His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile

Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys
 485 490 495

Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
 500 505

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 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 Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Lys Ala Ser Asn Leu Gln Ser 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 Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Val Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Lys Ala Gly Asn Leu Gln Ser 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 Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ile Asn Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
 210 215 220
 <210> 13
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Ile Phe Ser Ser His

20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Arg Ser Gly Ile Thr His Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ile Asn Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu

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

210 215 220
 <210> 14
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Asp Gly Asp Ile Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Arg Ser Gly Ile Thr His Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ile Asn Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
 210 215 220
 <210> 15
 <211> 222
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Asp Gly Asp Ile Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ile Asn Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

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

115 120 125

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

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu

210 215 220
 <210> 16
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu
 1 5 10 15

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

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

 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn
 145 150 155 160
 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys
 165 170 175
 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser
 180 185 190
 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly

195 200 205
 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr
 210 215 220
 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu
 225 230 235 240
 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln
 245 250 255
 Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr
 260 265 270

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

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

 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys
 405 410 415
 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro
 420 425 430
 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn
 435 440 445

Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val
 450 455 460

 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met
 465 470 475 480
 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln
 485 490 495
 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met
 500 505 510
 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe
 515 520 525

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

 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg
 595 600 605
 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro
 610 615 620
 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu
 625 630 635 640
 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys
 645 650 655

 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile
 660 665 670
 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro
 675 680 685
 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile

690 695 700
 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly
 705 710 715 720

 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala
 725 730 735
 His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu
 740 745 750
 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
 755 760

 <210> 17
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu
 1 5 10 15

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

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

130 135 140

Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn

145 150 155 160

Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys

165 170 175

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

180 185 190

Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly

195 200 205

Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr

210 215 220

Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu

225 230 235 240

Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln

245 250 255

Gln Lys Arg

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 18

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 19

Phe Ser Arg His Arg Val Tyr Gly Tyr Thr Pro Glu Tyr Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 20

Asp Asn Pro Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23

Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 24

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 25

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

 85 90 95

Ala Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

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

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

<210> 26
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 26
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Gly Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Ala Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 27

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

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

 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 28

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 28

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

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

Gly Phe Ser Arg His Arg Val Tyr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Pro Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Leu
 225

<210> 29

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 29

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

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

 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Leu
 225

<210> 30

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Thr Thr Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Phe Ser Arg His Arg Val Tyr Gly Tyr Thr Pro Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Pro Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Leu
 225
 <210> 31
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Pro Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Leu

225

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
 substitutions and preferred embodiments

<400> 32

Gly Asp Ile Phe Ser Ser His Trp

1 5

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
 substitutions and preferred embodiments

<400> 33

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

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 34

Ala Ile Asn Trp Glu Asp Ser

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 35

His Ala Ser Gln Asn Val Asn Val Trp Leu

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 36

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 37

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 38

His His His His His His

1 5