



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월19일
(11) 등록번호 10-2626877
(24) 등록일자 2024년01월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 49/0002 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7015260
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월05일
심사청구일자 2020년11월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년06월02일
- (65) 공개번호 10-2017-0082575
- (43) 공개일자 2017년07월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/059185
- (87) 국제공개번호 WO 2016/073685
국제공개일자 2016년05월12일
- (30) 우선권주장
62/075,793 2014년11월05일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2005002513 A2
J Immunol., 164(4):1925-1933(2000)

- (73) 특허권자
애넥슨, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 94005 브리즈번 시에라 포인트
파크웨이 1400, 빌딩 씨 2엔디 플로워
- (72) 발명자
로젠탈, 아르논
미국 캘리포니아주 94062 우드사이드 노르망디 레
인 150
레비탈, 마이클
미국 캘리포니아주 94306 팔로 알토 브라이언트
스트리트 3166
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 41 항

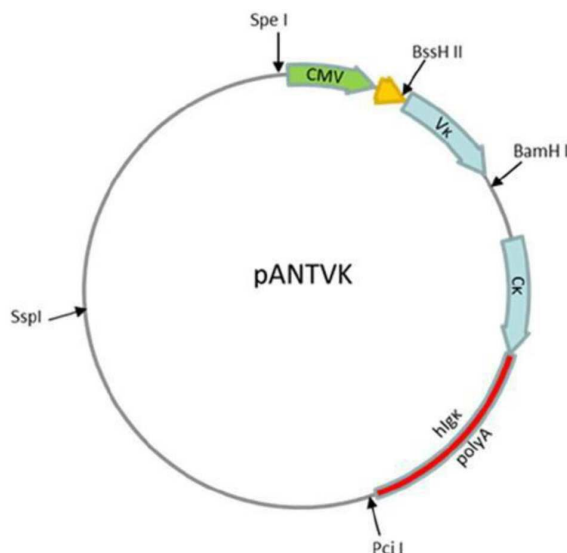
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 인간화 항-보체 인자 C1q 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본원은 인간화 항-C1q 항체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/4716 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 23의 아미노산 서열의 초가변 영역-H1(hypervariable region-H1: HVR-H1), 서열 24의 아미노산 서열의 HVR-H2, 및 서열 25의 아미노산 서열의 HVR-H3를 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및

b) 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 30의 아미노산 서열의 HVR-L1, 서열 31의 아미노산 서열의 HVR-L2, 및 서열 32의 아미노산 서열의 HVR-L3를 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 상기 중쇄 가변 도메인이 서열 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인이 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 상기 중쇄 가변 도메인이 서열 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인이 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는, 항-C1q 항체.

청구항 4

중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 상기 중쇄 가변 도메인이 서열 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 도메인이 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는, 항-C1q 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서,

항-C1q 결합 단편이 Fab 단편인, 항-C1q 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 래트(rat) C1q에, 인간 C1q와 마우스 C1q 둘 다에, 또는 인간 C1q, 마우스 C1q, 및 래트 C1q에 특이적으로 결합되는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 이의 항원-결합 단편이 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체 M1 또는 이의 항-C1q 결합 단편과 동일한 C1q 에피토프에 결합되는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 이의 항원-결합 단편이 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체 M1이 인간 C1q 또는 마우스 C1q에 결합하는 것을 억제하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
항체가 IgG 클래스(class)인, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서,
항체가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소타입(isotype)을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 11

제9항에 있어서,
항체가 IgG4 이소타입을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서,
항체가 인간 IgG4 불변 영역을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서,
인간 IgG4 중쇄 불변 영역이 서열 37의 아미노산 서열, 또는 서열 37의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 14

제12항에 있어서,
인간 IgG4 불변 영역이 Fc 영역을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서,
Fc 영역이 C1q 단백질을 결합시킬 수 없거나, 보체 활성을 유도할 수 없거나, 또는 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 유도할 수 없는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 16

제14항에 있어서,
Fc 영역이 하나 이상의 변형을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서,
Fc 영역이 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 18

제17항에 있어서,
Fc 영역이 카바트 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 19

제18항에 있어서,

Fc 영역이 카밧 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 류신으로부터 글루타메이트로의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 20

제18항에 있어서,

카밧 번호표기 규칙에 따른 248번 위치의 아미노산 치환이 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호작용 하는 것을 억제하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 21

제17항에 있어서,

Fc 영역이 카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서,

Fc 영역이 카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 23

제21항에 있어서,

카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치의 아미노산 치환이 항체의 암 스위칭을 방지하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 24

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항원-결합 단편이 Fab, F(ab')₂ 또는 Fab' 단편인, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 25

제24항에 있어서,

항체 단편이 그의 상응하는 전장 항체에 비해 반감기가 더 짧은, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 26

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 10pM 미만 내지 5pM 미만 범위의 인간 C1q에 대한 해리상수(K_D)를 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 27

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 125nM 미만 내지 5pM 미만 범위의 마우스 C1q에 대한 해리상수(K_D)를 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 28

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 C1q에 특이적으로 결합되고 C1q의 생물학적 활성을 중화시키는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 29

제28항에 있어서,

생물학적 활성이 (1) 자가항체에 대한 C1q 결합, (2) C1r에 대한 C1q 결합, (3) C1s에 대한 C1q 결합, (4) 포스파티딜세린에 대한 C1q 결합, (5) 펜트락신-3에 대한 C1q 결합, (6) C-반응성 단백질(CRP)에 대한 C1q 결합, (7) 구형 C1q 수용체(gC1qR)에 대한 C1q 결합, (8) 보체 수용체 1(CR1)에 대한 C1q 결합, (9) 베타-아밀로이드에 대한 C1q 결합, 또는 (10) 칼레티쿨린에 대한 C1q 결합인, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 30

제28항에 있어서,

생물학적 활성이 (1) 고전적인 보체 활성화 경로의 활성화, (2) 항체 및 보체 의존적 세포독성의 활성화, (3) CH50 용혈, (4) 시냅스 소실, (5) B-세포 항체 생산, (6) 수지상 세포 성숙, (7) T-세포 증식, (8) 사이토카인 생산, (9) 미세아교세포 활성화, (10) 아르투스(Arthus) 반응, (11) 시냅스 또는 신경말단의 식작용, 또는 (12) 보체 수용체 3(CR3/C3) 발현 세포의 활성화인, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 31

제30항에 있어서,

CH50 용혈이 인간, 마우스 및/또는 래트 CH50 용혈을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 32

제30항에 있어서,

항체가 CH50 용혈의 적어도 50%에서, 적어도 90%까지 중화시킬 수 있는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 33

제30항에 있어서,

항체가 150ng 미만, 100ng 미만, 50ng 미만 또는 20ng 미만의 용량으로 CH50 용혈의 적어도 50%를 중화시킬 수 있는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 34

제30항에 있어서,

항체가 20:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 35

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 36

제35항의 핵산 서열을 포함하는 분리된 숙주 세포.

청구항 37

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는, 신경퇴행성 장애를 치료하거나 예방하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 신경퇴행성 장애는 알츠하이머병, 근위축측삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 길랭-바레 증후군(GBS), 중증 근무력증, 수포성 유사천포창, 척수성 근위축, 다운증후군, 파킨슨병 및 헌팅턴병으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는, 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애를 치료하거나 예방하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애는 당뇨병, 백반증, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 애디슨병(Addison's disease), 셀리악병

(Coeliac disease), 크론병, 악성빈혈, 중증근육무력증, 비만, 자가면역 용혈빈혈, 부종양증후군, 저보체혈성 두드러기성 혈관염(hypocomplementemic urticarial vasculitis)(HUV), 류마티스성 다발성근육통, 베게너 육아종(Wegener's Granulomatosis), 류마티스성 관절염(RA), 급성 호흡곤란증후군(ARDS), 허혈 및 재관류 후 원격 조직 손상, 피부근염, 천포창(pemphigus), 루푸스신염 및 이로 인한 사구체신염과 혈관염, 심장마비-유도된 심장 내피 부전, 타입 II 막증식 사구체신염, IgA 신장병, 급성 신부전, 저온글로불린혈증, 항인지질증후군, 만성 개방각 녹내장, 급성 폐쇄각 녹내장, 황반변성질환, 연령 관련 황반변성(AMD), 습성-AMD, 지도형위축 맥락막혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨망막병증, 허혈 관련 망막병증, 안구내염, 안구내 혈관신생질환, 당뇨황반부종, 병리학적 근시, 폰히펠-린다우병(von Hippel-Lindau disease), 눈의 히스토플라스마증, 시신경 척수염(NMO), 망막중심정맥폐쇄(CRVO), 각막혈관신생, 망막혈관신생, 레베르 유전 시신경증, 시신경염, 베체트 망막병증, 허혈성 시신경병증, 망막혈관염, 항-중성구 세포질 자가항체 혈관염, 푸르처 망막병증, 쇼그렌 안구 건조증, AMD 건성증, 유육종증, 일시적인 동맥염, 결절성 다발동맥염, 다발성 경화증, 초급성 거부반응, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 천식 및 흡인폐렴으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 39

신경퇴행성 장애의 치료가 필요한 개체에서 신경퇴행성 장애를 치료 또는 예방하기 위해, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편과, 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하기 위한 지시를 포함하는 패키지 인서트(package insert)를 포함하는 키트로서, 상기 신경퇴행성 장애는 알츠하이머병, 근위축삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 길랭-바레 증후군(GBS), 중증 근무력증, 수포성 유사천포창, 척수성 근위축, 다운증후군, 파킨슨병 및 헌팅톤병으로부터 선택되는, 키트.

청구항 40

염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애의 치료가 필요한 개체에서 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애를 치료 또는 예방하기 위해, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편과, 상기 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하기 위한 지시를 포함하는 패키지 인서트(package insert)를 포함하는 키트로서, 상기 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애는 당뇨병, 백반증, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 애디슨병(Addison's disease), 셀리악병(Coeliac disease), 크론병, 악성빈혈, 중증근육무력증, 비만, 자가면역 용혈빈혈, 부종양증후군, 저보체혈성 두드러기성 혈관염(hypocomplementemic urticarial vasculitis)(HUV), 류마티스성 다발성근육통, 베게너 육아종(Wegener's Granulomatosis), 류마티스성 관절염(RA), 급성 호흡곤란증후군(ARDS), 허혈 및 재관류 후 원격 조직 손상, 피부근염, 천포창(pemphigus), 루푸스신염 및 이로 인한 사구체신염과 혈관염, 심장마비-유도된 심장 내피 부전, 타입 II 막증식 사구체신염, IgA 신장병, 급성 신부전, 저온글로불린혈증, 항인지질증후군, 만성 개방각 녹내장, 급성 폐쇄각 녹내장, 황반변성질환, 연령 관련 황반변성(AMD), 습성-AMD, 지도형위축 맥락막혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨망막병증, 허혈 관련 망막병증, 안구내염, 안구내 혈관신생질환, 당뇨황반부종, 병리학적 근시, 폰히펠-린다우병(von Hippel-Lindau disease), 눈의 히스토플라스마증, 시신경 척수염(NMO), 망막중심정맥폐쇄(CRVO), 각막혈관신생, 망막혈관신생, 레베르 유전 시신경증, 시신경염, 베체트 망막병증, 허혈성 시신경병증, 망막혈관염, 항-중성구 세포질 자가항체 혈관염, 푸르처 망막병증, 쇼그렌 안구 건조증, AMD 건성증, 유육종증, 일시적인 동맥염, 결절성 다발동맥염, 다발성 경화증, 초급성 거부반응, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 천식 및 흡인폐렴으로부터 선택되는, 키트.

청구항 41

- a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 생물학적 샘플과 접촉시키고;
- b) 시냅스에 결합된 항체 또는 항원-결합 단편을 검출함으로써 상기 생물학적 샘플에서의 시냅스를 검출함을 포함하는, 생물학적 샘플에서의 시냅스의 검출 방법.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

- 청구항 60
삭제
- 청구항 61
삭제
- 청구항 62
삭제
- 청구항 63
삭제
- 청구항 64
삭제
- 청구항 65
삭제
- 청구항 66
삭제
- 청구항 67
삭제
- 청구항 68
삭제
- 청구항 69
삭제
- 청구항 70
삭제
- 청구항 71
삭제
- 청구항 72
삭제
- 청구항 73
삭제
- 청구항 74
삭제
- 청구항 75
삭제

- 청구항 76
삭제
- 청구항 77
삭제
- 청구항 78
삭제
- 청구항 79
삭제
- 청구항 80
삭제
- 청구항 81
삭제
- 청구항 82
삭제
- 청구항 83
삭제
- 청구항 84
삭제
- 청구항 85
삭제
- 청구항 86
삭제
- 청구항 87
삭제
- 청구항 88
삭제
- 청구항 89
삭제
- 청구항 90
삭제
- 청구항 91
삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **연관 출원**

[0002] 본 발명은 2014년 11월 5일에 출원된 미국 특허출원 제62/075,793호의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 내용 전체가 본 명세서에 참고로서 포함된다.

배경 기술

[0003] **배경**

[0004] 1. 분야

[0005] 본원은 항-C1q 항체 및 이의 사용방법에 관한 것이다.

[0006] 2. 관련 기술의 설명

[0007] 과도한 보체 활성화(complement activation)는 다수의 염증성 및 자가면역 질환을 포함한 다양한 질환 상태와 관련되어 왔다. 보다 최근에는, 보체 시스템이 또한 신경퇴행성 질환 병리학에 기여하는 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, C1q와 같은 보체 인자는 신경 시냅스에서 발현되고 제거를 위해 이러한 시냅스를 마킹하는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, 미국 특허출원공개 제2012/0195880호 및 제2012/328601호 참조). 선택적 시냅스 소실이 정상 뇌 발달("시냅스 가지치기(synaptic pruning)")의 필수 측면인 반면, 특히 성숙 또는 노화 뇌에서의 과도한 시냅스 소실은 신경퇴행 및 인지 저하를 야기한다. 상승된 시냅스 보체 발현은 정상 노화 및 신경퇴행성 질환 진행에서의 시냅스 소실에 기여하는 것으로 밝혀졌다. 반대로, 신경 보체 발현의 저하는 신경보호작용인 것으로 밝혀졌다. 이러한 발견을 기초로, C1q와 같은 보체 인자의 활성의 증화는 시냅스 소실을 방지하고 신경퇴행성 질환의 진행 뿐만 아니라 정상 노화에서의 인지 저하를 느리게 하는 유망한 치료 전략으로서 간주된다.

[0008] 시냅스 소실과 관련되고 C1q와 같은 보체 인자의 증화를 겨냥한 치료에 순응할 것으로 간주되는 신경퇴행성 질환

환은 알츠하이머병, 근위축측삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 다운증후군, 파킨슨병, 헌팅톤병 등을 포함한다.

[0009] 제한된 수의 보체 중화 항체만이 지금까지 공지되어 있다(예를 들어, Klos A. et al., *Mol Immunol.* 2009, 46(14), 2753-2766; Carroll S. & Georgiou G., *Immunobiology* 2013, 218(8), 1041-1048; Tuzun et al., *J. Neuroimmunol.* 2007, 182, 167-176; Nelson et al., *J. Clin. Invest.* 2006, 116:2892-2900; Heinz et al., *J. Immunol.* 1984, 133, 400-404; Jiang et al., *J. Immunol.* 1991, 146, 2324-2330; Trinder et al., *Scand. J. Immunol.* 1999, 50, 635-641; Hwang et al., *Mol. Immunol.* 2008, 45, 2570-2580 참조). 말단 보체 활성화 경로의 억제제인 C5 중화 항체 에쿨리주맙(Eculizumab) 만이 지금까지 규제 당국의 승인을 받았다; 에쿨리주맙은 발작성 야간 혈색소뇨증의 치료를 위해 시판중이다(PNH; Hillmen et al., *N Engl J Med.* 2006, 355(12):1233-43).

[0010] 따라서, C1q와 같은 보체 인자에 특이적으로 결합되고 이의 생물학적 활성을 중화시키는 추가의 항체를 개발할 필요성이 있다.

[0011] 특허출원 및 공보를 포함한 본원에 언급된 모든 참조문헌들은 그 전문이 참조로 본원에 포함된다.

발명의 내용

[0012] 간단한 개요

[0013] 본원은 인간화 항-C1q 항체 및 인간화 항-C1q 항체의 사용방법을 제공한다.

[0014] 특정 측면에서, 본원은 C1q 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체를 제공하는데, 여기서 상기 항체는 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region) 및 인간 중쇄 불변 영역(human heavy chain constant region)을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 Fab 영역을 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함하며, 상기 Fab 영역은 C1q 단백질에 특이적으로 결합하고, 상기 Fc 영역은 C1q 단백질을 결합시킬 수 없다.

[0015] 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 보체 활성화(complement activity)을 유도할 수 없다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 항체-의존적 세포의 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity)(ADCC)을 유도할 수 없다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 인간 중쇄 불변 영역은 인간 IgG4 중쇄 불변 영역이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 인간 IgG4 중쇄 불변 영역은 서열(SEQ ID No;) 37의 아미노산 서열, 또는 서열 37의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 인간 IgG4 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함하고, 상기 Fc 영역은 하나 이상의 변형(modification)을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카밧(Kabat) 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카밧 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 류신으로부터 글루타메이트로의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 카밧 번호표기 규칙에 따른 248번 위치의 아미노산 치환은 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호작용하는 것을 억제한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 카밧 번호표기 규칙에 따른 241번 위치의 아미노산 치환은 항체의 암 스위칭(arm switching)을 예방한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 서열 37의 아미노산 서열, 또는 서열 37의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 도메인(heavy chain variable domain) 및 경쇄 가변 도메인(light chain variable domain)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 도메인은 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 경쇄 가변 도메인은 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미

는 중쇄 가변 도메인; 및 b) 서열 6의 아미노산 서열, 또는 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 측면에서, 본원은 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체는 a) 서열 4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 b) 서열 7의 아미노산 서열, 또는 서열 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 측면에서, 본원은 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체는 a) 서열 4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 b) 서열 8의 아미노산 서열, 또는 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0025]

상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 C1q와 마우스 C1q 둘 다에 특이적으로 결합된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 래트(rat) C1q에 특이적으로 결합된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 C1q, 마우스 C1q 및 래트 C1q에 특이적으로 결합된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 필수적으로 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체 M1 또는 이의 항-C1q 결합 단편과 동일한 C1q 에피토프(epitope)와 결합한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체 M1이 인간 C1q 또는 마우스 C1q에 대해 결합하는 것을 억제한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IgG 클래스(class)이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소타입(isotype)을 갖는다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IgG4 이소타입을 갖는다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 IgG4 불변 영역을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 인간 IgG4 중쇄 불변 영역은 서열 37의 아미노산 서열, 또는 서열 37의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 인간 IgG4 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 C1q 단백질을 결합시킬 수 없다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 보체 활성을 유도할 수 없다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 유도할 수 없다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 하나 이상의 변형을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 류신으로부터 글루타메이트로의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 카뎀 번호표기 규칙에 따른 248번 위치의 아미노산 치환은 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호작용 하는 것을 억제한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 카뎀 번호표기 규칙에 따른 241번 위치의 아미노산 치환은 항체의 암 스위칭을 예방한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 이중특이(bispecific) 항체이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 뇌 투과를 증가시키도록 조작되었다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 제 1 항원 및 제 2 항원을 인지하는 이중특이 항체이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 제 1 항원은 C1q 단백질이고 제 2 항원은 혈액-뇌-장벽을 통과하는 수송을 용이하게 하는 항원이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 제 2 항원은 트랜스페린 수용체(TR), 인슐린 수용체(HIR), 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGFR), 저밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2(LPR-1 및 2), 디프테리아 독소 수용체, CRM197, 라마 단일 도메인 항체, TMEM 30(A), 단백질 도입 도메인, TAT, Syn-B, 페너트라틴(penetratin), 폴리-아르기닌 펩티드, 안지오펙(angiopep) 펩티드 및 ANG1005로부터 선택된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수

있는 일부 실시양태에서, 상기 항원-결합 단편은 Fab, F(ab')₂ 또는 Fab' 단편이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체 단편은 이의 상응하는 전장(full-length) 항체에 비해 뇌 투과가 더 우수하다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체 단편은 이의 상응하는 전장 항체에 비해 반감기가 더 짧다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 C1q에 대해 해리상수(KD)가 약 10pM 미만에서 약 5pM 미만의 범위이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 마우스 C1q에 대해 해리상수(KD)가 약 125nM 미만에서 약 5pM 미만의 범위이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 C1q에 특이적으로 결합되고 C1q의 생물학적 활성을 중화시킨다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 생물학적 활성은 (1) 자가항체에 대한 C1q 결합, (2) C1r에 대한 C1q 결합, (3) C1s에 대한 C1q 결합, (4) 포스파티딜세린에 대한 C1q 결합, (5) 펜트락신-3에 대한 C1q 결합, (6) C-반응성 단백질(CRP)에 대한 C1q 결합, (7) 구형 C1q 수용체(gC1qR)에 대한 C1q 결합, (8) 보체 수용체 1(CR1)에 대한 C1q 결합, (9) 베타-아밀로이드에 대한 C1q 결합, 또는 (10) 칼레티쿨린에 대한 C1q 결합이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 생물학적 활성은 (1) 고전적인 보체 활성화 경로의 활성화, (2) 항체 및 보체 의존적 세포독성의 활성화, (3) CH50 용혈, (4) 시냅스 소실, (5) B-세포 항체 생산, (6) 수지상 세포 성숙, (7) T-세포 증식, (8) 사이토카인 생산, (9) 미세아교세포 활성화, (10) 아르투스 반응, (11) 시냅스 또는 신경종말의 포식작용, 또는 (12) 보체 수용체 3(CR3/C3) 발현 세포의 활성화이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 CH50 용혈은 인간, 마우스 및/또는 래트 CH50 용혈을 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 CH50 용혈의 적어도 약 50%에서, 적어도 약 95%까지 중화시킬 수 있다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 150ng 미만, 100ng 미만, 50ng, 미만 또는 20ng 미만의 용량으로 CH50 용혈의 적어도 50%를 중화시킬 수 있다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 20:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만의 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합한다.

[0026] 특정 측면에서, 본원은 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 특정 측면에서, 본원은 상기 실시양태들 중 임의의 것의 핵산 서열을 포함하는 분리된 숙주 세포를 제공한다. 특정 측면에서, 본원은 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0027] 특정 측면에서, 본원은 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체의 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 개체에서의 보체 활성화와 관련된 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 다른 측면에서, 본원은 치료가 필요한 개체에서의 보체 활성화와 관련된 질환을 치료하거나 예방하는데 사용하기 위한 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본원은 치료가 필요한 개체에서의 보체 활성화와 관련된 질환을 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에서 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체의 용도를 제공한다.

[0028] 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환은 신경퇴행성 장애이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 시냅스 소실 또는 신경 연결 소실과 관련된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 보체 수용체 3(CR3)/C3 또는 보체 수용체 CR1에 의존적인 시냅스 소실과 관련된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 병리학적 활성-의존적 시냅스 가지치기(synaptic pruning)와 관련된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 미세아교세포에 의한 시냅스 포식작용과 관련된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 알츠하이머병, 근위축삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 길랭-바레 증후군(GBS), 중증 근무력증, 수포성 유사천포창, 척수성 근위축, 다운증후군, 파킨슨병 및 헌팅턴병으로부터 선택된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환은 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애이다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애는 당뇨병, 비만, 류마티스성 관절염(RA), 급성 호흡관중후군(ARDS), 허혈 및 재관류 후 원격 조직 손상, 심폐우회술 동안의 보체 활성화, 피부근염, 천포창(pemphigus), 루푸스신염 및 이로 인한 사구체신염과 혈관염, 심폐우회술, 심장마비-유도된 심장 내피 부전, 타입 II 막증식 사구체신염, IgA 신장병, 급성 신부전, 저온글로불린증, 항인지질증후군, 만성 개방각 녹내장, 급성 폐쇄각 녹내장, 황반변성질환, 연령 관련 황반변성(AMD), (습성-AMD), 지도모양 위축성 맥락막혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨망막병증, 허혈 관련 망막병증, 안구

내염, 안구내 혈관신생질환, 당뇨황반부종, 병리학적 근시, 폰히펠-린다우병(von Hippel-Lindau disease), 눈의 히스토플라스마증, 시신경 척수염(NMO), 망막중심정맥폐쇄(CRVO), 각막혈관신생, 망막혈관신생, 레베르 유전 시신경증, 시신경염, 베체트 망막증, 허혈성 시신경병증, 망막혈관염, ANCA 혈관염, 푸르처 망막병증, 쇼그렌 안구 건조증, AMD 건성증, 유육종증, 일시적인 동맥염, 결절성 다발동맥염, 다발성 경화증, 동종이식, 초급성 거부반응, 혈액투석, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 천식 및 흡인폐렴으로부터 선택된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환은 중증근무력증, 당뇨병 타입 1, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 애디슨병(Addison's disease), 셀리악병(coeliac disease), 크론병, 악성빈혈, 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 백반증, 자가면역 용혈빈혈, 부종양증후군, 혈관염, 저보체혈성 두드러기성 혈관염(hypocomplementemic urticarial vasculitis)(HUV), 류마티스성 다발성근육통, 관자동맥염(temporal arteritis) 및 베게너 육아종(Wegener's granulomatosis)으로부터 선택된 자가면역 질환이다.

[0029] 특정 측면에서, 본원은 보체 활성화와 관련된 질환의 치료가 필요한 개체에서 보체 활성화와 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위해, 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체와, 상기 항체를 사용하기 위한 지시를 포함하는 패키지 인서트(package insert)를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환은 신경퇴행성 장애이다. 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 시냅스 소실 또는 신경 연결 소실과 관련된다. 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 보체 수용체 3(CR3)/C3 또는 보체 수용체 CR1에 의존적인 시냅스 소실과 관련된다. 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 병리학적 활성-의존적 시냅스 가지치기와 관련된다. 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 미세아교세포에 의한 시냅스 포식작용과 관련된다. 일부 실시양태에서, 상기 신경퇴행성 장애는 알츠하이머병, 근위축측삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 다운증후군, 파킨슨병 및 헌팅톤병으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환은 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애이다. 일부 실시양태에서, 상기 염증성 질환, 자가면역 질환 또는 대사 장애가 당뇨병, 비만, 류마티스성 관절염(RA), 급성 호흡곤란증후군(ARDS), 허혈 및 재관류 후 원격 조직 손상, 심폐우회술 동안의 보체 활성화, 피부근염, 천포창, 루푸스신염 및 이로 인한 사구체신염과 혈관염, 심폐우회술, 심장마비-유도된 심장 내피 부전, 타입 II 막증식 사구체신염, IgA 신장병, 급성 신부전, 저온글로불린증, 항인지질증후군, 만성 개방각 녹내장, 급성 폐쇄각 녹내장, 황반변성질환, 연령 관련 황반변성(AMD), (습성-AMD), 지도모양 위축성 맥막혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨망막병증, 허혈 관련 망막병증, 안구내염, 안구내 혈관신생질환, 당뇨황반부종, 병리학적 근시, 폰히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 시신경 척수염(NMO), 망막중심정맥폐쇄(CRVO), 각막혈관신생, 망막혈관신생, 레베르 유전 시신경증, 시신경염, 베체트 망막증, 허혈성 시신경병증, 망막혈관염, ANCA 혈관염, 푸르처 망막병증, 쇼그렌 안구 건조증, AMD 건성증, 유육종증, 일시적인 동맥염, 결절성 다발동맥염, 다발성 경화증, 동종이식, 초급성 거부반응, 혈액투석, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 천식 및 흡인폐렴으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 보체 활성화와 관련된 질환이 중증근무력증, 당뇨병 타입 1, 하시모토 갑상선염, 애디슨병, 셀리악병, 크론병, 악성빈혈, 심상성 천포창, 백반증, 자가면역 용혈빈혈, 부종양증후군, 혈관염, 저보체혈성 두드러기성 혈관염(HUV), 류마티스성 다발성근육통, 관자동맥염 및 베게너 육아종으로부터 선택된 자가면역 질환이다.

[0030] 특정 측면에서, 본원은 상기 실시양태들 중 임의의 것의 인간화 항-C1q 항체를 포함하는 진단 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 진단용 또는 치료용 키트가 본원에 기재된 대로 사용된다.

[0031] 특정 측면에서, 본원은 a) 상기 실시양태 중 임의의 인간화 항-C1q 항체를 개체에게 투여하고; b) 시냅스에 결합된 항체를 검출함으로써 상기 개체에서의 시냅스를 검출함을 포함하는, 개체에서의 시냅스의 검출방법을 제공한다. 다른 측면에서, 본원은 개체에서의 시냅스를 검출하는데 사용하기 위한 상기 실시양태 중 임의의 인간화 항-C1q 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본원은 개체에서의 시냅스를 검출하는데 사용하기 위한 약제의 제조에 있어 상기 실시양태 중 임의의 인간화 항-C1q 항체의 용도를 제공한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 시냅스에 결합된 항체를 양전자방출단층촬영(PET), X-선 컴퓨터 단층촬영, 단일광자방출단층촬영(SPECT), 컴퓨터 단층촬영(CT) 및 컴퓨터 축 단층촬영(CAT)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 영상 기술을 사용하여 검출한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 시냅스에 결합된 항체의 검출이 개체에서의 시냅스의 수의 정량적 척도를 제공한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 개체는 신경퇴행성 질환 또는 자가면역 질환을 갖는다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 개체에서의 시냅스의 수는 일정 기간에 걸쳐 반복적으로 측정되고 시간이 지남에 따라 상기 개체에서의 시냅스의 소실이 검출된다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 시간이 지남에 따른 시냅스의 소실은 신경퇴행성 질환 또는 자가면역 질환을 위한 치료 효능에 대한 척도이다.

[0032] 특정 측면에서, 본원은 a) 상기 실시양태 중 임의의 인간화 항-C1q 항체를 생물학적 샘플과 접촉시키고; b) 시냅스에 결합된 항체를 검출함으로써 상기 생물학적 샘플에서의 시냅스를 검출함을 포함하는, 생물학적 샘플에서의 시냅스의 검출방법을 제공한다.

[0033] 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 a)전에 개체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 생물학적 샘플은 생검 시료, 조직 또는 세포를 포함한다. 상기 실시양태들 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 상기 항체는 면역형광 현미경검사, 면역세포화학, 면역조직화학, ELISA, FACS 분석, 면역침전반응, 또는 미세-양전자방출 단층촬영에 의해 검출된다.

[0034] 본원에 기재된 다양한 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합되어 본원에 제공된 조성물 및 방법의 다른 실시양태를 형성할 수 있다. 본원에 제공된 조성물 및 방법의 이러한 측면 및 다른 측면은 당해 분야의 숙련자에게는 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] **도면의 간단한 설명**

도 1은 경쇄 및 중쇄 발현 벡터용 플라스미드 맵(plasmid map)을 도시한 것이다. 도 1a는 경쇄 발현 벡터 pANTVk용 플라스미드 맵을 도시한 것이다. 도 1b는 중쇄 발현 벡터 pANTVhG4(S241P L248E)용 플라스미드 맵을 도시한 것이다. VH 및 Vκ 벡터 둘 다는 인트론 및 폴리A 서열을 포함하는 게놈 DNA 단편을 함유한다. 양쪽 쇠의 발현은 CMV 프로모터에 의해 유발되며, (중쇄 벡터에 대한) 선택은 DHFR 미니 유전자(mini gene)를 통해 이루어진다.

도 2a는 M1 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열 및 인간화 VH 변이체 VH1-VH2의 아미노산 서열의 정렬(alignment)을 도시한 것이다. 도 2b는 M1 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열 및 인간화 VH 변이체 VH3-VH4의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다. 도 2c는 M1 항체의 카파 경쇄 가변 영역(Vκ)의 아미노산 서열 및 인간화 Vκ 변이체 Vκ1-Vκ2의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다. 도 2d는 M1 항체의 카파 경쇄 가변 영역(Vκ)의 아미노산 서열 및 인간화 Vκ 변이체 Vκ3-Vκ4의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다.

도 3은 단백질 A-정제된 항체의 쿠마시블루 염색된 SDS-PAGE 겔을 도시한 것이다. 각 샘플의 2 μg이 NuPage 4-12% Bis-Tris 겔 상에 로딩되었으며, 200V에서 35분 동안 이동(run)되었다. 크기 마커(marker)는 사전-염색된 단백질 표준 퍼멘타스 페이지룰러 플러스(Fermentas PageRuler Plus)이다.

도 4는 인간 C1q에 대한 경쟁 ELISA 에세이를 도시한 것이다. 정제된 인간화 항-C1q 항체의 희석액 시리즈가 인간 C1q에 결합하기 위해 비오틴화 단일클론 항체 M1의 고정된 농도에 대해 경쟁하였다. 결합된 비오틴화 M1 항체가 스트렙타비딘-퍼옥시다아제 접합 및 TMB 기질을 사용해 검출되었다. 도 4a는 인간화 항체 VH1/Vκ1, VH1/Vκ2, 및 VH1/Vκ3을 이용한 결과를 도시한 것이다. 도 4b는 인간화 항체 VH1/Vκ4, VH2/Vκ1, VH2/Vκ2, VH2/Vκ3, 및 VH2/Vκ4를 이용한 결과를 도시한 것이다. 도 4c는 인간화 항체 VH3/Vκ1, VH3/Vκ2, VH3/Vκ3, 및 VH3/Vκ4를 이용한 결과를 도시한 것이다. 도 4d는 인간화 항체 VH4/Vκ1, VH4/Vκ2, VH4/Vκ3, 및 VH4/Vκ4를 이용한 결과를 도시한 것이다.

도 5는 마우스 C1q에 대한 경쟁 ELISA 에세이를 도시한 것이다. 정제된 인간화 항-C1q 항체의 희석액 시리즈가 마우스 C1q에 결합하기 위해 비오틴화 단일클론 항체 M1의 고정된 농도에 대해 경쟁하였다. 결합된 비오틴화 키메라(chimeric) M1은 스트렙타비딘-퍼옥시다아제 접합 및 TMB 기질을 사용해 검출되었다.

도 6은 겔 여과-정제된 항체의 쿠마시블루 염색된 SDS-PAGE 겔을 도시한 것이다. 각 샘플의 1 μg이 NuPage 4-12% Bis-Tris 겔 상에 로딩되었으며, 200V에서 35분 동안 이동되었다. 크기 마커는 사전-염색된 단백질 표준 퍼멘타스 페이지룰러 플러스이다. 레인 1은 Fab VH3/Vκ3이 감소된 것을 도시한 것이고; 레인 2는 Fab VH3/Vκ3이 감소되지 않은 것을 도시한 것이며; 레인 3은 IgG V VH3/Vκ3이 감소된 것을 도시한 것이고; 레인 4는 IgG VH3/Vκ3이 감소하지 않은 것을 도시한 것이다.

도 7은 단일 용량 포맷의 인간, 및 래트 CH50 용혈 측정에서의 항-C1q 항체의 C1q-중화 활성을 도시한 것이다. 도 7a는 인간 CH50 용혈 측정으로부터의 결과를 도시한 것이다. 도 7b는 래트 CH50 용혈 측정으로부터의 결과를 도시한 것이다. "ANN-005"는 단일클론 항체 M1에 상응하고, "3E2"는 키메라 M1 항체에 상응하며, "2B12"는 항체 VH1/Vκ1에 상응하고, "5H7"은 항체 VH3/Vκ3에 상응하며, "3F1"은 항체 VH3/Vκ4에 상응하고, "1D3"은 항체

VH4/V_K3에 상응한다.

도 8은 15 및 100 mg/Kg의 단일 100 mg/Kg 용량에 대한 원숭이의 혈청 5H7 수준의 시간 경과를 도시한 것이다.

도 9는 15 및 100 mg/Kg의 단일 IV 용량에 대한 원숭이의 혈청 C1q 수준의 시간 경과를 도시한 것이다. 도 9a는 JL1-M1 에세이를 사용해 원숭이의 혈청 C1q 수준의 시간 경과를 도시한 것이다. 도 9b는 JL1-JL1 에세이를 사용해 원숭이의 혈청 C1q 수준의 시간 경과를 도시한 것이다.

도 10은 15 및 100 mg/Kg의 단일 IV 용량에 대한 원숭이의 혈청 용혈의 지속된 감소를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036]

상세한 설명

[0037]

일반적 기술

[0038]

본원에 기재되거나 언급된 기술 및 방법은 당해 분야의 숙련가에 의해 일반적으로 잘 이해되고 통상적으로 종래 방법을 사용하여 이용되는데, 예를 들면, 다음 문헌들에 기재된 널리 이용되는 방법들이다: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

[0039]

정의

[0040]

본원에 사용된 용어 "예방"은 개체에서의 특정 질환, 장애 또는 병태의 발생 또는 재발에 대한 예방의 제공을 포함한다. 개체는 특정 질환, 장애 또는 병태의 경향이 있을 수 있거나 걸리기 쉬울 수 있거나 이러한 질환, 장애 또는 병태가 전개될 위험에 있을 수 있으나 아직 그 질환, 장애 또는 병태로 진단받지는 않은 상태이다.

[0041]

본원에 사용된 바와 같이, 특정 질환, 장애 또는 병태의 "위험이 있는" 개체는 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 갖거나 갖지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법 이전에 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다. "위험이 있는"은 개체가 당해 분야에 공지된 바와 같은, 특정 질환, 장애 또는 병태의 전개와 관련된 측정가능한 매개변수인 하나 이상의 위험 요인을 갖고 있음을 나타낸다. 이러한 하나 이상의 위험 요인을 갖는 개체는 이러한 하나 이상의 위험 요인을 갖지 않는 개체에 비해 특정 질환, 장애 또는 병태가 전개될 가능성이 더 높다.

[0042]

본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리 과정 동안 치료되는 개체의 자연적 과정을 바꾸도록 계획된 임상적 중재를 지칭한다. 치료의 목적인 효과는 진행의 감속, 병리 상태의 개선 또는 완화, 및 특정 질환, 장애 또는 병태의 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 특정 질환, 장애 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상이 완화되거나 없어지면 개체는 성공적으로 "치료된" 것이다.

[0043]

"유효량"은 필요한 기간 동안 투여량으로 치료적 또는 예방적 결과를 얻기에 효과적인 양 이상을 말한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공된다.

- [0044] "치료학적 유효량"은 특정 질환, 장애 또는 병태의 측정가능한 개선에 영향을 주는데 필요한 최소 농도 이상이다. 본원의 치료학적 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에 있어 목적인 반응을 끌어내기 위한 항-C1q 항체의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 항-C1q 항체의 치료학적으로 유리한 효과가 어떠한 독성 또는 유해 효과를 증가하는 양이다.
- [0045] "만성" 투여는 연장된 기간 동안 초기 치료학적 효과(활성)가 유지되도록 급성 형태와는 반대로 연속적으로 약제(들)를 투여하는 것을 지칭한다. "간헐적(*intermittent*)" 투여는 중단없이 연속적으로 수행되는 것은 아닌, 사실상 주기적인 치료를 말한다.
- [0046] 본원에 사용된 다른 화합물 또는 조성물과의 "공동" 투여는 동시 투여 및/또는 다른 시점에서의 투여를 포함한다. 공동 투여는 또한 상이한 투여 빈도 또는 간격으로 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 사용한, 공동-제형으로서의 투여 또는 분리된 조성물로서의 투여도 포함한다.
- [0047] 위험의 치료, 예방 또는 경감을 위한 "개체"는 인간, 가축, 농경용 가축, 및 동물원, 스포츠 및 애완 동물을 포함한 포유동물로 분류되는 임의의 동물, 예를 들어, 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 게르빌루스쥐, 마우스, 흰담비, 래트, 고양이 등을 말한다. 일부 실시양태에서, 상기 개체는 인간이다.
- [0048] 본원에 사용된 "자가항체"는 숙주 항원을 인지하는 임의의 항체를 의미한다.
- [0049] 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본원에서는 "항체"와 교환적으로 사용된다. 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 범위로 사용되고, 목적인 생물학적 활성을 나타내는 한, 구체적으로 2개 이상의 무손상 항체로부터 생성된 단일클론 항체, 다클론 항체, 다중특이 항체(예를 들어, 이중특이(*bispecific*) 항체) 및 항체 단편을 커버한다.
- [0050] 기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경(L)쇄와 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 헤테로테트라머(*heterotetrameric*) 당단백이다. VH 와 VL 쌍은 함께 단일 항원-결합 위치를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어, "*Basic and Clinical Immunology*, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6"을 참조한다.
- [0051] 임의의 척추동물로부터의 L쇄는 이들의 불변 도메인(*constant domain*)의 아미노산 서열을 기초로 카파("κ") 및 람다("λ")로 불리는 2개의 명백히 뚜렷한 타입 중 하나로 정해질 수 있다. 이들의 중쇄(CH)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린이 상이한 클래스 또는 이소타입으로 정해질 수 있다. 면역글로불린에는 각각 알파("α"), 델타("δ"), 엡실론("ε"), 감마("γ") 및 뮤("μ")로 지정된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 클래스가 있다. γ 및 α 클래스는 추가로 CH 서열 및 기능의 비교적 소수의 상이점을 기초로 서브클래스(이소타입)로 나뉘는데, 예를 들어, 인간은 다음 서브클래스를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2. 면역글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 널리 공지되어 있고, 일반적으로, 예를 들어, "*Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000)"에 기재되어 있다.
- [0052] "자연(*native*) 항체"는 보통 2개의 동일한 경(L)쇄와 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 150,000달톤의 헤테로테트라머 당단백이다. 각각의 경쇄는 하나의 다이설파이드 공유결합에 의해 하나의 중쇄에 연결되어 있는 반면, 다이설파이드 결합의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄들 중에서 변한다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 다이설파이드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_H)을 갖고 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_L)을 갖고 다른 말단에 불변 도메인을 갖는데, 상기 경쇄의 불변 도메인은 상기 중쇄의 첫 번째 불변 도메인에 맞춰 조정되고, 상기 경쇄의 가변 도메인은 상기 중쇄의 가변 도메인에 맞춰 조정된다. 특정한 아미노산 잔기가 상기 경쇄 가변 도메인과 상기 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.
- [0053] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 "분리된" 항체는 이의 생산 환경의 성분으로부터 (예를 들어, 자연적으로 또는 재조합적으로) 동정, 분리 및/또는 회수된 항체이다. 일부 실시양태에서, 분리된 폴리펩티드는 이의 생산 환경으로부터의 모든 기타 오염 성분들과 무관하다. 이의 생산 환경으로부터의 오염 성분들, 예를 들어, 재조합 감염된 세포로부터의 것들은 통상 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료를 방해할 수 있는 물질로서 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 (1) 예를 들어, 로우리법(Lowry method)으로 측정된 바 항체 95중량% 이상, 일부 실시양태에서는 99중량% 이상으로, (2) 회전 컵 서열분석장치(*spinning cup sequenator*)의 사용에 의한 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의

잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 비환원 또는 환원 조건하에 쿠마시블루 또는 실버 염색을 사용한 SDS-PAGE에 의한 균질성으로 정제될 것이다. 분리된 항체는 상기 항체의 자연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 T-세포내에 동일 반응계 항체를 포함한다. 그러나, 대개는 하나 이상의 정제 단계에 의해 분리된 폴리펩티드 또는 항체가 제조될 것이다.

[0054] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 "V_H" 및 "V_L"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 (동일 부류의 다른 항체에 비해) 상기 항체의 가장 가변적 부분이며 항원 결합 위치를 함유한다.

[0055] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 세그먼트가 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체 중에서 서열상 광범위하게 상이한 사실을 말한다. V 도메인은 항원 결합을 중재하고 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 한정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 스펠(span)에 걸쳐 골고루 분포되지 않는다. 대신, 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역(hypervariable region: HVR)이라 불리는 3개의 세그먼트에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임 영역(frame region: FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이들은 주로 베타-시트(beta-sheet) 구조를 취하고 3개의 HVR에 연결되어 있으며 루프 결합(loops connecting)을 형성하고, 일부 경우에는 상기 베타-시트 구조의 일부를 형성한다. 각 쇠에서의 HVR은 FR 영역 옆에 서로 근접하게 붙어 있고, 다른 쇠로부터의 HVR과는 항체의 항원 결합 위치를 형성하는 데 기여한다(Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991) 참조). 불변 도메인은 항원으로의 항체의 결합에 직접 관여하지 않으나, 항체-의존적 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능(effector function)을 나타낸다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "단일클론 항체"는 사실상 균질 항체 집락으로부터 수득된, 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체를 말하는데, 즉 상기 집락에 포함된 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형(예를 들어, 이성체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 매우 특이적이고, 단일 항원 위치에 대한 것이다. 상이한 결정인자(에피토프)에 대한 상이한 항체를 통상 포함하는 다클론 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일 결정인자에 대한 것이다. 단일클론 항체는 그의 특이성 이외에도, 하이브리도마 배지에 의해 합성되고 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "단일클론"은 사실상 균질 항체 집락으로부터 수득된 바와 같은 항체의 특징을 가리키고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산이 필요한 것으로 이해되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론 항체는, 예를 들어, 하이브리도마법(예를 들어, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA법(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호), 파지-디스플레이(phage-display) 기술(참조: Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004), 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004) 참조), 및 인간 면역글로불린 유전자좌(locus)의 일부 또는 전체를 갖거나 인간 면역글로불린 서열을 코딩하는 유전자를 갖는 동물에서의 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술(예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 미국 특허 제5,545,807호; 제 5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995) 참조)을 포함한 다수의 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

[0057] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 또는 "전항체(whole antibody)"는 항체 단편과는 반대의 의미로 실제로 무손상 형태의 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체를 지칭하는데 교환적으로 사용된다. 구체적으로 전항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체를 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변종을 가질 수 있다. 일부 경우, 무손상 항체는 하나 이상의

이펙터 기능을 가질 수 있다.

- [0058] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 항원 결합 및/또는 무손상 항체의 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 FV 단편; 이중체(diabody); 선형 항체(미국 특허 제5,641,870호, 실시예 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995) 참조); 단쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 생성된 다중특이(multispecific) 항체를 포함한다.
- [0059] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체의 파파인 소화는 쉽게 결정체를 이룰 수 있는 능력을 반영한 명칭인, "Fab" 단편 또는 영역, 및 잔여 "Fc" 단편 또는 영역으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편 또는 영역을 생산한다. Fab 단편 또는 영역은 H쇄의 가변 영역 도메인(V_H)과 함께 전체 L쇄 및 하나의 중쇄의 첫 번째 불변 도메인(C_{H1})으로 이루어진다. 각각의 Fab 단편 또는 영역은 항원 결합에 대해 1가인데, 즉 단일 항원 결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 상이한 항원-결합 활성을 갖는 2개의 다이설파이드 결합된 Fab 단편에 대략 상응하고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 단일 대형 F(ab')₂ 단편 또는 영역을 제공한다. Fab' 단편 또는 영역은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_{H1} 도메인의 카복시 말단에 일부 추가 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 함유하는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편쌍으로 생산되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.
- [0060] Fc 단편 또는 영역은 다이설파이드에 의해 함께 붙어있는 양 H쇄의 카복시 말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 특정 종류의 세포에서 발견되는 Fc 수용체(FcR)에 의해서도 인지되는 Fc 영역에서의 서열에 의해 결정된다.
- [0061] "Fv"는 완전한 항원 인지 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 하나의 중쇄 가변 영역 도메인과 하나의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단한 비공유 결합으로 연결된 다이머로 이루어져 있다. 이들 2개의 도메인의 폴딩(folding)으로부터 항원 결합을 위한 아미노산 서열을 제공하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 수여하는 6개의 추가변 루프(H쇄와 L쇄로부터 각각 3개의 루프가 생성됨)가 나온다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 HVR을 포함하는 Fv의 절반)조차도 전체 결합 부위보다는 낮은 친화도로도 항원을 인지하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0062] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드쇄에 연결된 VH 및 VL 항체를 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, sFv 폴리펩티드는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함함으로써 sFv가 항원 결합을 위해 목적인 구조를 형성할 수 있게 한다. sFv의 검토를 위해 "Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)"을 참조한다.
- [0063] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체의 "기능성 단편"은 무손상 항체의 일부를 포함하는데, 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역이나 변형된 FcR 결합능을 갖거나 유지하는 항체의 F 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 생성된 다중특이 항체를 포함한다.
- [0064] 용어 "이중체"는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 짧은 링커(약 5 내지 10개의 잔기)를 갖는 sFv 단편을 작제함으로써 제조되어, V 도메인의 쇄내(intra-chain)가 아닌 쇄간(inter-chain) 쌍이 수득되고 이에 의해 2가 단편, 즉 2개의 항원 결합 위치를 갖는 단편이 제공되는, 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이 이중체는 2개의 "교차형(crossover)" sFv 단편의 헤테로다이머로서, 2개의 항체의 V_H 도메인과 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드쇄 상에 존재한다. 이중체는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; "Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993)"에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0065] 본원에 사용된 "키메라 항체"는 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체(면역글로불린)를 지칭하는 것으로, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유도된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동인 반면, 상기 쇄(들)의 잔여부는 다른 종으로부터 유도된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 뿐만 아니라, 목적인 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동이다(미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984)). 본원에서 관심있는 키메라 항체는 항체의 항원-결합 영역이, 예를 들어, 짧은 꼬리 원숭이를 관심 항원으로 면역시킴으로써 생산된 항체로부터 유도된 PRIMATIZED® 항체를 포함

한다. 본원에 사용된 "인간화 항체"는 "키메라 항체"의 하위 부류로 사용된다.

[0066] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 비-인간(예를 들어, 뮤린(murine)) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로부린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR로부터의 잔기가 목적인 특이성, 친화도 및/또는 수용 능력을 갖는 비-인간종, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 HVR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 경우, 인간 면역글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화도와 같은 항체 성능을 추가로 개선시키기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 사실상 1개 이상, 통상적으로 2개가 전부인 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 모든 또는 사실상 전부의 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린 서열의 루프에 상응하고, FR 영역이 결합 친화도, 이성체화, 면역원성 등과 같은 항체 성능을 개선시키는 하나 이상의 개별 FR 잔기를 포함할 수 있어도, 모든 또는 사실상 전부의 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 영역이다. FR 내의 이러한 아미노산 치환의 수는 통상 H쇄에서는 6 이하이고 L쇄에서는 3 이하이다. 인간화 항체는 임의로 또한 통상적으로 인간 면역글로불린의 것인 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 보다 상세한 것은, 예를 들어, "Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)"을 참조한다. 또한, 예를 들어, "Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)", 및 미국 특허 제6,982,321호 및 제7,087,409호도 참조한다.

[0067] "인간 항체"는 인간에 의해 제조된, 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/갖거나 본원에 기재된 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 사용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함한, 당해 분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산할 수 있다(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). 또한, 인간 단일클론 항체의 제조에 유용한 것은 "Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)"에 기재된 방법이다. 또한, "van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001)"을 참조한다. 인간 항체는, 항원 시험(antigenic challenge)에 대한 반응으로 이러한 항체를 생산하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌에 손상을 입은 트랜스제닉(transgenic) 동물, 예를 들어, 면역력을 갖게 된 제노마우스(xenomouse)에게 항원을 투여함으로써 제조할 수 있다(예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 대한 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 참조). 또한, 예를 들어, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 "Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)"도 참조한다.

[0068] 본원에 사용된 경우, 용어 "추가변 영역", "HVR" 또는 "HV"는 서열면에서 추가변적이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 생성하는, 본원에 기재된 항-C1q 항체의 것과 같은 항체-가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함하는데, VH에 3개(H1, H2 H3), VL에 3개(L1, L2, L3)를 포함한다. 자연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중 최고의 다양성을 나타내고, H3은 특히 항체에 미세한 특이성을 부여하는데 독특한 역할을 하는 것으로 여겨진다(예를 들어, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) 참조). 사실, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타과 항체는 경쇄의 부재하에 기능적이고 안정하다(예를 들어, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) 및 Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996) 참조).

[0069] 다수의 HVR 설명이 본원에 사용되고 포함된다. 카밧(Kabat) 상보성 결정 영역(CDR)인 HVR은 서열 가변성을 기초로 하고 가장 통상적으로 사용된다(Kabat et al., *supra*). 코티아(Chothia)는 대신에 구조적 루프의 위치를 언급한다(Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카밧 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘러 AbM 항체-모델링 소프트웨어(Oxford Molecular's AbM antibody-modeling software)에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용할 수 있는 복합체 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이들 HVR 각각으로부터의 잔기는 다음에 기재한다.

루프(Loop)	카밧(Kabat)	AbM	코티아(Chothia)	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카밧 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

- [0070]
- [0071] HVR은 "연장된 HVR"을 포함할 수 있고, 이는 다음과 같다: VL에 24-36 또는 24-34(L1), 46-56 또는 50-56(L2), 및 89-97 또는 89-96(L3), 및 VH에 26-35(H1), 50-65 또는 49-65(H2), 및 93-102, 94-102 또는 95-102(H3). 가변 도메인 잔기는 이들 연장된 HVR 정의 각각에 대해 카밧(Kabat et al., *supra*)에 따라 번호표기된다.
- [0072] "프레임 영역(*framework*)" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 HVR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0073] 표현 "카밧에서와 같은 가변 도메인 잔기 번호표기" 또는 "카밧에서와 같은 아미노산 위치 번호표기" 및 이의 변형 표현은 문헌(Kabat et al., *supra*)에서 항체의 컴필레이션(*compilation*)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 번호표기 시스템을 지칭한다. 이러한 번호표기 시스템을 사용하여, 실제 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축화, 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 소수의 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 이후에 단일 아미노산 삽입물(카밧에 따른 잔기 52a)을, 중쇄 FR 잔기 82 이후에 삽입된 잔기(예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카밧 번호표기는 항체 서열의 상동성의 영역에서 "표준" 카밧 번호표기된 서열을 맞추으로써 제시된 항체에 대해 결정될 수 있다.
- [0074] 일반적으로 카밧 번호표기 시스템은 가변 영역에서의 잔기(대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 지칭하는 경우 사용된다(예를 들어, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "EU 번호표기 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 보통 면역글로불린 중쇄 불변 영역에서의 잔기를 지칭하는 경우 사용된다(예를 들어, Kabat et al., *supra*에 보고된 EU 인덱스). "카밧에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호표기를 지칭한다. 본원에 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 영역에서의 잔기 번호의 언급은 카밧 번호표기 시스템에 의한 잔기 번호표기를 의미한다. 본원에 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 영역에서의 잔기 번호의 언급은 EU 번호표기 시스템에 의한 잔기 번호표기를 의미한다(예를 들어, 미국 특허공보 제2010-280227호 참조).
- [0075] 본원에 사용된 "수용체 인간 프레임워크(*acceptor human framework*)"는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스(*consensus*) 프레임워크로부터 유도된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유도된 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 또는 기존의(*pre-existing*) 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기존의 아미노산 서열 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하 또는 2 이하이다. 일부 실시양태에서, 기존의 아미노산 서열 변화가 VH에 존재하면, 이러한 변화는 71H, 73H 및 78H 위치에서만, 또는 이들 중 2개 또는 하나에서만 일어날 수 있는데, 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 서열은 71A, 73T 및/또는 78A에 의할 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열상 동일하다.
- [0076] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 통상적으로 존재하는 아미노산 서열을 나타낸다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 서브그룹으로부터 한다. 일반적으로, 상기 서열의 서브그룹은 "Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)"에서와 같은 서브그룹이다. VL의 경우, 서브그룹은 문헌(Kabat et al., *supra*)에서와 같은 서브그룹 카파 I, 카파 II, 카파 III 또는 카파 IV일 수 있다. 추가로, VH의 경우, 서브그룹은 문헌(Kabat et al., *supr*

a)에서와 같은 서브그룹 I, 서브그룹 II 또는 서브그룹 III일 수 있다.

- [0077] 예를 들어 본원에 기재된 항-C1q 항체의 특정 위치에서의 "아미노산 변형"은 특정 잔기의 치환 또는 제거, 또는 특정 잔기에 인접한 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 말한다. 특정 잔기에 "인접한" 삽입은 이의 1개 내지 2개의 잔기 내의 삽입을 의미한다. 상기 삽입은 특정 잔기에 대해 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 아미노산 변환은 치환이다.
- [0078] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 "친화도-성숙된(affinity-matured)" 항체는 이의 하나 이상의 HVR이 하나 이상 변경된 것으로 이렇게 변경되지 않은 모 항체에 비해 항원에 대한 항체 친화도가 개선된다. 한 실시양태에서, 친화도-성숙된 항체는 표준 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도-성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 방법으로 생산된다. 예를 들어, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)은 VH- 및 VL-도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 랜덤 돌연변이는, 예를 들어, "Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)"에 기재되어 있다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 인지되는" 또는 "특이적으로 결합되는"은 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체와 표적간의 끌어 당김 또는 결합과 같은 측정가능하고 재생가능한 상호작용을 말하고, 생물학적 분자를 포함한 분자의 이중 집락의 존재하에서의 표적의 존재의 결정적 요인이다. 예를 들어, 표적 또는 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체는 다른 표적이나 이러한 표적의 다른 에피토프에 결합하는 것 보다 큰 친화도, 결합력으로 보다 쉽게 및/또는 긴 기간으로 상기 표적 또는 에피토프에 결합하는 항체이다. 또한 이러한 정의에 의해, 예를 들어, 첫 번째 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체(또는 부분)는 두 번째 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 하지 않을 수 있다. 이와 같이 "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 (포함할 수는 있으나) 독점적 결합을 반드시 필요로 하지는 않는다. 표적에 특이적 결합하는 항체의 결합상수는 적어도 약 $10^3 M^{-1}$ 또는 $10^4 M^{-1}$ 일 수 있고, 종종 약 $10^5 M^{-1}$ 또는 $10^6 M^{-1}$ 일 수 있고, 기타의 경우 약 $10^6 M^{-1}$ 또는 $10^7 M^{-1}$, 약 $10^8 M^{-1}$ 내지 $10^9 M^{-1}$, 또는 약 $10^{10} M^{-1}$ 내지 $10^{11} M^{-1}$, 또는 그 이상일 수 있다. 다양한 면역측정법(immunoassay) 포맷이 특정 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 고품상 ELISA 면역측정법은 통상적으로 단백질과 특별히 면역반응성인 단일클론 항체를 선택하는 데 사용된다. 예를 들어, 특정 면역반응성을 측정하는 데 사용할 수 있는 면역측정법 포맷 및 조건의 기재에 대해 "Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York"을 참조한다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같이, 보체 인자 C1q와 같은 보체 단백질과 두 번째 단백질간의 "상호작용"은 단백질-단백질 상호작용, 물리적 상호작용, 화학적 상호작용, 결합, 공유결합 및 이온결합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 항체는 상기 항체가 두 단백질간의 상호작용을 방해하거나 감소시키거나 완전히 제거할 때, 두 단백질간의 "상호작용을 방해"한다. 본원에 기재된 항체 또는 이의 단편은 상기 항체 또는 이의 단편이 하나 이상의 단백질에 결합할 때 두 단백질간의 "상호작용을 방해"한다.
- [0081] "차단" 항체, "길항" 항체, "억제" 항체 또는 "중화" 항체는 이들 항체가 결합하는 항원의 하나 이상의 생물학적 활성, 예를 들어, 하나 이상의 단백질과의 상호작용을 억제하거나 감소시키는 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체이다. 일부 실시양태에서, 차단 항체, 길항 항체, 억제 항체 또는 "중화" 항체는 항원의 하나 이상의 생물학적 활성 또는 상호작용을 거의 또는 완전히 억제한다.
- [0082] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하며, 항체 이소타입에 따라 변한다.
- [0083] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 변할 수 있으나, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산에서 이의 카복실 말단까지 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신(EU 번호표기 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 K447 잔기가 제거된 항체 집락, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집락, 및 K447 잔기가 제거되지 않은 항체와 K447 잔기가 제거된 항체의 혼합물을 갖는 항체 집락 모두를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체로 사용하기에 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

- [0084] "천연 서열 Fc 영역"은 자연 발생 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 알로타입(allotype)), 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역, 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이의 자연 발생 변이체를 포함한다.
- [0085] "가변 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형때문에 천연 서열 Fc 영역과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 가변 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 치환에서 상이하다. 일부 실시양태에서, 가변 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교해 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드에서의 약 1 내지 약 10의 아미노산 치환, 및 일부 실시양태에서는 약 1 내지 약 5의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 가변 Fc 영역은 일부 실시양태에서 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 약 80% 이상의 상동성을 가질 것이고, 일부 실시양태에서는 상기한 영역과 약 90% 이상, 일부 실시양태에서는 상기한 영역과 약 95% 이상의 상동성을 가질 것이다.
- [0086] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 말한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하고 이들 수용체의 대립유전자 변이체(allelic variant) 및 다르게는 이들 수용체의 스플라이싱된(spliced) 형태를 포함한다, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스 수용체를 포함하는 것이고, Fc γ RII는 주로 그의 세포질 도메인이 상이한, 유사한 아미노산 서열을 갖는 Fc γ RIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")을 포함한다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기초한 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기초한 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM)를 함유한다(예를 들어, M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) 참조). FcR은 "Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)"에 검토되어 있다. 추후 확인될 것들을 포함한 기타 FcR은 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. FcR은 또한 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.
- [0087] 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 생체내 FcRn으로의 결합 및 혈청 반감기는, 예를 들어, 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염 인간 세포주, 또는 가변 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 측정될 수 있다. WO 2004/42072(Presta)는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 약해진 항체 변이체를 기재한다. 또한, 예를 들어, "Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)"을 참조한다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 " k_{on} "은 항원에 대한 항체의 결합에 대한 속도 상수를 지칭하기 위함이다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 " k_{off} "는 항체/항원 복합체로부터의 항체의 해리에 대한 속도 상수를 지칭하기 위함이다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 " k_D "는 항체-항원 상호작용의 평형 해리상수를 지칭하기 위함이다.
- [0091] 본원에 사용된 바와 같이, 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)" 및 "상동성"은 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열을 정렬하고, 필요한 경우 갭을 도입하여 최대%의 서열 동일성을 성취하고 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환(conservative substitution)도 고려하지 않은 후의 상기 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열상의 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 퍼센트를 말한다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트의 측정을 위한 정렬은 당해 분야의 기술내에서 다양한 방법으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™ (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 비교할 서열의 진장에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 당해 분야에 공지된 임의의 알루프즘을 포함한, 정렬 측정을 위한 적합한 매개변수를 결정할 수 있다.
- [0092] "분리된" 분자 또는 세포는 보통 생성되었던 환경과 관련된 하나 이상의 오염 분자 또는 세포로부터 확인되고 분리된 분자 또는 세포이다. 일부 실시양태에서, 분리된 분자 또는 세포는 생성 환경과 관련된 모든 성분들과 관련이 없다. 분리된 분자 또는 세포는 자연 발생 형태나 환경 이외의 형태이다. 따라서, 분리된 분자는 세포에 천연으로 존재하는 분자와 구별되고, 분리된 세포는 조직, 기관 또는 개체에 천연으로 존재하는 세포와 구별된다. 일부 실시양태에서, 분리된 분자는 본원에 기재된 항-C1q 항체이다. 다른 실시양태에서, 분리된 세포는 본원에 기재된 항-C1q 항체를 생산하는 숙주 세포 또는 하이브리도마 세포이다.
- [0093] 본원에 기재된 항-C1q 항체와 같은 항체를 코딩하는 "분리된" 핵산 분자는 보통 생성되었던 환경과 관련된 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 분리된 핵산 분자는 생성 환

경과 관련된 모든 성분들과 관련이 없다. 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 분리된 핵산 분자는 자연 발생 형태나 환경 이외의 형태이다. 따라서, 분리된 핵산 분자는 세포에 천연으로 존재하는 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과 구별된다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 결합된 다른 핵산 분자를 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위함이다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드(plasmid)"로서, 이는 원형 이중가닥 DNA를 말하고 그 안에 추가의 DNA 절편이 결합될 수 있다. 벡터의 다른 유형은 파지 벡터(phage vector)이다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스 벡터로서, 바이러스 게놈 내에 추가의 DNA 절편이 결합될 수 있다. 특정 벡터들은 이들이 도입된 숙주 세포내에서 자율 증식할 수 있다(예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 또는 에피솜(episomal) 포유동물 벡터). 기타 벡터들(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)은 숙주 세포에 도입될 때 숙주 세포의 게놈 안으로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터들은 이들이 기능적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터를 본원에서는 "재조합 발현 벡터" 또는 간단히 "발현 벡터"로 일컫는다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에 교환적으로 사용될 수 있다.

[0095] 본원에서 교환적으로 사용되는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 임의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체로 도입될 수 있는 임의의 기질을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 상기 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 표지(label)로의 접합과 같은 합성 후의 변형을 포함할 수 있다. 다른 유형의 변형은, 예를 들어, "캡(cap)", 하나 이상의 천연으로 존재하는 뉴클레오타이드의 유사체로의 치환, 인터뉴클레오타이드 변형, 예를 들어, 비하전된 결합(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 및 하전된 결합(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것, 펜던트 부분, 예를 들어, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입제(intercalator)(예: 아크리딘, 소랄렌 등)를 갖는 것, 킬레이터(예: 금속, 방사능 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 갖는 것, 알킬화제를 갖는 것, 변형된 결합(예: 알파 아노머 핵산 등)을 갖는 것 뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드의 비변형된 형태를 포함한다. 추가로, 당에 흔히 존재하는 임의의 하이드록실 그룹이, 예를 들어, 포스포네이트 그룹, 포스페이트 그룹에 의해 대체되거나, 표준 보호 기에 의해 보호되거나, 활성화되어 추가의 뉴클레오타이드로의 추가 결합을 제조하거나, 고히 또는 반고형 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 포스포릴화되거나 아민 또는 탄소수 1 내지 20의 유기 캡핑 기 부분으로 치환될 수 있다. 기타 하이드록실은 또한 표준 보호 기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 당해 분야에 일반적으로 알려져 있는, 예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-알릴, 2'-O-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카보사이클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당(예: 아라비노스, 자일로스 또는 릭소오스), 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스 당, 비사이클릭 유사체 및 염기성 뉴클레오사이드 유사체(예: 메틸 리보사이드)를 포함한, 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사 형태를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합이 선택적 결합 기에 의해 대체될 수 있다. 이들 선택적 결합 기는 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), (O)NR₂("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈)에 의해 대체된 양태(여기서, R 및 R'는 각각 독립적으로 H, 또는 에테르(-O-) 결합, 알릴, 알케닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 또는 아르알릴을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환 알킬(C₁₋₂₀)이다)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 결합이 동일해야 하는 것은 아니다. 상기 기재는 DNA 및 RNA를 포함한, 본원에 언급된 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0096] "숙주 세포"는 폴리뉴클레오타이드 삽입물의 도입을 위한 벡터(들)의 수용체일 수 있거나 수용체였던 개별 세포 또는 세포 배지를 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 상기 자손은 자연, 돌발 또는 의도적 돌연변이로 인해 원래의 모 세포와 (형태 또는 게놈 DNA 보체면에서) 반드시 완전히 동일하지는 않을 수 있다. 숙주 세포는 본원의 폴리뉴클레오타이드(들)로 생체내 형질감염된 세포를 포함한다.

[0097] 본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에 노출되는 세포 또는 포유동물에 비독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 첨가제 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리학적으로 허용되는 담체는 pH 완충된 수용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예는 완충제(예: 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산), 아스코르브산을 포함하는 항산화제, 저분자량(약 10개의 잔기 미만) 폴리펩티드, 단백질(예: 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불

린), 친수성 중합체(예: 폴리비닐피롤리돈), 아미노산(예: 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신), 단당류, 이당류, 및 포도당, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물, 킬레이트화제(예: EDTA), 당 알콜(예: 만니톨 또는 소르비톨), 염-형성 카운터이온(예: 나트륨) 및/또는 비이온성 계면활성제(예: TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS™)를 포함한다.

- [0098] 본원에 사용된 용어 "약"은 당해 기술분야의 숙련자에게 익히 알려진 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 말한다. 본원의 "약" 어떤 값 또는 매개변수에 대한 언급은 그 값 또는 매개변수 자체에 대한 양태를 포함(하고 개시)한다.
- [0099] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수형은 달리 명확히 지시되지 않는 한 복수도 포함한다. 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 몰(molar) 양과 같은 하나 내지 다수의 항체를 말하는 것이고, 당해 분야의 숙련자에게 알려진 등가물 등을 포함한다.
- [0100] 본원에 기재된 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태를 "포함"하고, 측면 및 실시양태로 "이루어지고", 측면 및 실시양태로 "필수적으로 이루어짐"을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0101] **개요**
- [0102] 본원은 인간화 항-C1q 항체 및 이의 사용방법을 제공한다. 본원의 인간화 항-C1q 항체는 본원의 C1q 단백질에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q 중화 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1 복합체에 결합할 수 있다.
- [0103] 특정 측면에서, 본원은 C1q 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체를 제공하며, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 인간 중쇄 불변 영역을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 Fab 영역을 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함하며, 상기 Fab 영역은 C1q 단백질에 특이적으로 결합하고, 상기 Fc 영역은 C1q 단백질을 결합시킬 수 없다.
- [0104] 특정 측면에서, 본원은 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 있고, 상기 중쇄 가변 도메인은 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0105] 특정 측면에서, 본원은 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고 있고, 상기 경쇄 가변 도메인은 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0106] 특정 측면에서, 본원은 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및/또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1q의 생물학적 활성을 중화시킨다. 인간화 항-C1q 항체에 대한 용도는, 예를 들어, 보체 인자 1(CF1)-의존적 병리학적 시냅스 소실과 관련된 신경퇴행성 장애를 갖는 개체에서의 보체 인자 C1q의 검출을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가의 비제한적 용도는, 자가항체에 의해 고전적인 보체 경로가 활성화되는 경우와 같은, 보체 활성화의 고전적 경로의 억제체를 포함한다. 인간화 항-C1q 항체에 대한 추가의 비제한적 용도는 C1q와 같은 보체 인자의 개선된 발현과 관련되거나 보체 경로의 활성화와 관련된 장애의 진단 및 치료를 포함한다. 이러한 장애는 자가면역 장애, 염증성 장애, 및 시냅스 소실과 관련된 신경퇴행성 장애를 포함한 신경퇴행성 장애를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0108] 다른 측면에서, 본원은 본원의 항체를 코딩하는 분리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0109] 본원은 또한 본원의 항체를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 분리된 숙주 세포를 제공한다. 추가로, 본원의 인간화 C1q 중화 항체와 같은 항-C1q 항체를 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 함유하는 약제학적 조성물이 제공된다. 본원은 또한 본원에 기재된 임의의 방법에 사용하기 위한 인간화 항-C1q 항체를 함유하는 키트를 제공한다.
- [0110] 본원은 추가로 치료가 필요한 개체에서의 신경퇴행성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하거나 예방하고, 신경퇴행성 질환 또는 자가면역 질환을 갖는 개체에서 시냅스를 검출하고, 생물학적 샘플에서 시냅스를 검출하기 위한

본원의 인간화 항-C1q 항체(예를 들어, 본원의 인간화 C1q 중화 항체)의 사용방법을 제공한다. 본원은 또한 본원의 인간화 항-C1q 항체(예를 들어, 본원의 인간화 C1q 중화 항체)를 함유하는 키트를 제공한다.

[0111] **보체 단백질**

[0112] 본원의 항체는 보체 인자 C1q 및/또는 고전적인 보체 활성화 경로의 C1 복합체 중의 C1q를 특이적으로 인지한다. 인지된 보체 인자는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 암소, 말, 낙타, 양, 염소 또는 돼지와 같은 임의의 포유류 생물을 포함한, 보체 시스템을 갖는 임의 생물로부터 유도될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다,

[0113] 본원에 사용된 "C1 복합체"는 하나의 C1q 단백질, 2개의 C1r 단백질 및 2개의 C1s 단백질(예를 들어, C1qr²s²)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 단백질 복합체를 지칭한다.

[0114] 본원에 사용된 "보체 인자 C1q"는 야생형 서열 및 자연 발생 변이체 서열 둘 다를 지칭한다.

[0115] 본 발명의 항체에 의해 인지되는 보체 인자 C1q의 비제한적 예는 다음의 3개의 폴리펩티드 A, B 및 C쇄를 포함하는, 인간 C1q이다:

[0116] C1q, A쇄(호모 사피엔스(homo sapiens)): 수탁번호 단백질 데이터베이스: NP_057075.1; GenBank No.: NM_015991:

[0117] >gi|7705753|ref|NP_057075.1| 보체 C1q 서브성분 서브유닛 A 전구체 [호모 사피엔스]

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRGRPGLKGEQGEPEP
APGIRGTGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGSPGLGARGIPGIKGTGKSPGNIKDQ
PRPAFSAIRRNPPMGGNVVIFDVTITNQEOPYQNHSGRFVCTVPGYYFTFQVLSQ
WEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSAGMVLQLQQGDQVWVEKDPKK
GHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA (서열 9)

[0118]

[0119] C1q, B쇄(호모 사피엔스): 수탁번호 단백질 데이터베이스: NP_000482.3; GenBank No.: NM_000491.3:

[0120] >gi|87298828|ref|NP_000482.3| 보체 C1q 서브성분 서브유닛 B 전구체 [호모 사피엔스]

MMMIPWGSIPVLMMLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGTPGPDGQPGTPGIK
GEKGLPGLAGDHGEFGEKGDPPGPNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESG
DYKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPLGYFT
YHASSRGNLVCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLKLEQGENVFLQ
ATDKNSLLGMEGANSIFSGFLLFPDMEA (서열 10)

[0121]

[0122] C1q, C쇄(호모 사피엔스): 수탁번호 단백질 데이터베이스: NP_001107573.1; GenBank No.: NM_001114101.1:

[0123] >gi|166235903|ref|NP_001107573.1| 보체 C1q 서브성분 서브유닛 C 전구체 [호모 사피엔스]

MDVGPSSPLHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGPMPGLPGAPGKDGYPGLPGP
KGEPGIPAIPGIRGPKGQKGEPLPGHPGKNGPMGPPGMPGVPMPGIPGEPGEEGR
YKQKQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPLGYFV
YHASHTANLVCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLA VND
YYDMVGIQGSDFVSGFLLFPD (서열 11)

[0124]

[0125] 따라서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1q 단백질의 폴리펩티드 A쇄, 폴리펩티드 B쇄 및/또는 폴리펩티드 C쇄에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 인간 C1q 또는 이의 동족체, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 암소, 말, 낙타, 양, 염소 또는 돼지 C1q의 폴리펩티드 A쇄, 폴리펩티드 B쇄 및/또는 폴리펩티드 C쇄에 결합될 수 있다.

[0126] **인간화 항-C1q 항체**

[0127] 본원의 인간화 항체는 특이적으로 보체 인자 C1q 및/또는 고전적인 보체 경로의 C1 복합체 중의 C1q 단백질에

결합된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 인간 C1q에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 인간 및 마우스 C1q에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 래트 C1q에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 인간 C1q, 마우스 C1q 및 래트 C1q에 특이적으로 결합된다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 Fab 영역을 함유한 중쇄 가변 영역 및 Fc 영역을 함유한 중쇄 불변 영역을 포함하며, 상기 Fab 영역은 본원의 C1q 단백질에 특이적으로 결합하지만, 상기 Fc 영역은 C1q 단백질을 결합시킬 수 없다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소타입으로부터 얻는다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 보체 활성을 유도할 수 없고/없거나 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 유도할 수 없다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 비제한적으로, 아미노산 치환을 포함한 하나 이상의 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체의 Fc 영역은 카뎃 번호표기 규칙에 따른 248번 위치 또는 카뎃 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에 상응하는 위치, 및/또는 카뎃 번호표기 규칙에 따른 241번 위치 또는 카뎃 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 248번 위치 또는 248번 위치에 상응하는 위치의 아미노산 치환은 Fc 영역이 Fc 수용체와 상호작용 하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 248번 위치 또는 248번 위치에 상응하는 위치의 아미노산 치환은 류신으로부터 글루타메이트로의 아미노산 치환이다. 일부 실시양태에서, 241번 위치 또는 241번 위치에 상응하는 위치의 아미노산 치환은 항체의 암 스위칭을 예방한다. 일부 실시양태에서, 241번 위치 또는 241번 위치에 상응하는 위치의 아미노산 치환은 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환이다. 특정 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체의 Fc 영역은 서열 37의 아미노산 서열, 또는 서열 37의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 보체 인자 C1q의 생물학적 활성을 중화시킨다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 보체 인자 C1q와, C1r 또는 C1s와 같은 기타 보체 인자간의, 또는 C1q와 자가항체와 같은 항체간의 상호작용을 억제한다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원의 자가항체는 숙주 항원을 인지하고 보체 활성화의 고전적 경로를 활성화하는 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이 활성화 과정의 첫 번째 단계에서, 보체 인자 C1q는 자가항체-자가항원-면역 복합체에 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 보체 인자 C1q와 비-보체 인자간의 상호작용을 억제한다. 비-보체 인자는 포스파티딜세린, 펜트락신-3, C-반응성 단백질(CRP), 구형 C1q 수용체(gC1qR), 보체 수용체 1(CR1), β -아밀로이드 및 칼레티쿨린을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 고전적인 보체 활성화 경로를 억제한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체는 대안적 경로를 추가로 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 자가항체- 및 보체-의존적 세포 독성(complement-dependent cytotoxicity: CDC)을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 보체-의존적 세포-중재된 세포 독성(complement-dependent cell-mediated cytotoxicity: CDCC)을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 B-세포 항체 생산, 수지상 세포 성숙, T-세포 증식, 사이토카인 생산 또는 미세아교세포 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 아르투스(Arthus) 반응을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 시냅스 또는 신경말단의 식작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 보체 수용체 3(CR3)/C3 발현 세포의 활성화를 억제한다.

[0130] 본 발명 항체의 기능적 특성, 예를 들어, 항원에 대한 해리상수, 단백질-단백질 상호작용(예를 들어, C1q-자가항체 상호작용), 자가항체-의존적 및 보체-의존적 세포 독성(CDC)의 억제, 보체-의존적 세포-중재된 세포 독성(CDCC)의 억제 또는 병변 생성은 시험관내, 생체외 또는 생체내 실험으로 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0131] C1q에 대한 항-C1q 항체의 해리상수(K_D)는 125nM 미만, 120nM 미만, 115nM 미만, 110nM 미만, 100nM 미만, 90nM 미만, 80nM 미만, 70nM 미만, 60nM 미만, 50nM 미만, 40nM 미만, 30nM 미만, 20nM 미만, 10nM 미만, 9nM 미만, 8nM 미만, 7nM 미만, 6nM 미만, 5nM 미만, 4nM 미만, 3nM 미만, 2nM 미만, 1nM 미만, 0.5nM 미만, 0.1nM 미만, 0.05nM 미만, 0.01nM 미만 또는 0.005nM 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 해리상수는 약 125nM 미만 내지 약 5pM 미만의 범위이다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체의 해리상수는 인간 C1q에 대해 약 10pM 미만 내지 약 5pM 미만이다. 일부 실시양태에서, 해리상수는 인간 C1q에 대해 약 10 pM 미만, 약 9.9 pM 미만, 약 9.8 pM 미만, 약 9.7 pM 미만, 약 9.6 pM 미만, 약 9.5 pM 미만, 약 9.4 pM 미만, 약 9.3 pM 미만, 약 9.2 pM 미만, 약 9.1 pM 미만, 약 9 pM 미만, 약 8.9 pM 미만, 약 8.8 pM 미만, 약 8.7 pM 미만, 약 8.6 pM 미만, 약 8.5 pM 미만, 약

8.4 pM 미만, 약 8.3 pM 미만, 약 8.2 pM 미만, 약 8.1 pM 미만, 약 8 pM 미만, 약 7.9 pM 미만, 약 7.8 pM 미만, 약 7.7 pM 미만, 약 7.6 pM 미만, 약 7.5 pM 미만, 약 7.4 pM 미만, 약 7.3 pM 미만, 약 7.2 pM 미만, 약 7.1 pM 미만, 약 7 pM 미만, 약 6.9 pM 미만, 약 6.8 pM 미만, 약 6.7 pM 미만, 약 6.6 pM 미만, 약 6.5 pM 미만, 약 6.4 pM 미만, 약 6.3 pM 미만, 약 6.2 pM 미만, 약 6.1 pM 미만, 약 6 pM 미만, 약 5.9 pM 미만, 약 5.8 pM 미만, 약 5.7 pM 미만, 약 5.6 pM 미만, 약 5.5 pM 미만, 약 5.4 pM 미만, 약 5.3 pM 미만, 약 5.2 pM 미만, 약 5.1 pM 미만, 또는 약 5 pM 미만이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체의 해리상수는 마우스 C1q에 대해 125 nM 미만, 120 nM 미만, 115 nM 미만, 110 nM 미만, 100 nM 미만, 90 nM 미만, 80 nM 미만, 70 nM 미만, 60 nM 미만, 50 nM 미만, 40 nM 미만, 30 nM 미만, 20 nM 미만, 10 nM 미만, 9 nM 미만, 8 nM 미만, 7 nM 미만, 6 nM 미만, 5 nM 미만, 4 nM 미만, 3 nM 미만, 2 nM 미만, 1 nM 미만, 0.5 nM 미만, 0.1 nM 미만, 또는 0.05 nM 미만이다.

[0134] C1q 이외의 항원에 대한 항체 해리상수는 C1q에 대한 해리상수보다 5배 이상, 10배 이상, 100배 이상, 1,000배 이상, 10,000 이상 또는 100,000배 이상 높을 수 있다. 예를 들어, 본원의 인간화 항-C1q 항체의 해리상수는 C1q에 대해서보다 C1s에 대해 1,000배 이상 높을 수 있다. 해리상수는 ELISA, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance: SPR), 바이오-층 간섭법(bio-layer interferometry)(예를 들어, ForteBio의 Octet System 참조), 등은 적정 열량측정법(isothermal titration calorimetry: ITC), 시차주사열량측정법(differential scanning calorimetry: DSC), 원편광 이색성 분광분석(circular dichroism: CD), 스톱-플로우 분석(stopped-flow analysis), 및 열량측정 또는 형광 단백질 용융 분석과 같은 임의의 생화학적 또는 생물물리학적 기술을 포함한 임의의 분석적 기술을 통해 측정할 수 있다. C1q에 대한 항-C1q 항체의 해리상수(K_D)는, 예를 들어, 전장 항체 또는 Fab 단편과 같은 항체 단편을 사용하여 측정할 수 있다.

[0135] C1q에 대한 인간화 항체의 결합 친화도를 측정하는 방법의 한 예는 상기 항체의 단일기능적 Fab 단편의 결합 친화도를 측정하는 것이다. 단일기능적 Fab 단편을 수득하기 위해, 항체(예를 들어, IgG)를 과파인으로 분리하거나 재조합적으로 발현시킬 수 있다. 항체의 Fab 단편의 친화도는 HBS-EP 러닝 버퍼(0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20)를 사용하여 예비-부동화 스트렙타비딘 센서 칩(SA)이 장착된 표면 플라즈몬 공명(Biacore3000™ 표면 플라즈몬 공명(SPR) 시스템, Biacore.TM., INC, Piscataway N.J.)으로 측정할 수 있다. 비오틴화 인간 C1q(또는 기타 임의의 C1q)를 HBS-EP 버퍼에 0.5 μg/mL의 농도로 희석하고 다양한 접촉 시간을 사용하여 개별 칩 채널을 가로질러 주입하여 상세한 키네틱 연구용의 50-200 반응 유닛(RU) 및 선별 측정용의 800-1,000RU의 2개 범위의 항원 밀도를 수득할 수 있다. 재생 연구로 25%v/v 에탄올 중의 25mM NaOH가 200회 이상의 주입 동안 상기 칩에 대해 C1q의 활성을 유지한 채, 결합된 Fab를 효과적으로 제거하는 것으로 밝혀졌다. 전형적으로, 정제된 Fab 샘플의 연속 희석액(0.1 내지 10배의 스페닝 농도. 예상 K_D)을 100 μL/분으로 1분 동안 주입하고 2시간 이하의 해리 시간이 허용된다. Fab 단백질의 농도를 표준으로서 공지된 농도(아미노산 분석으로 측정)의 Fab를 사용하여 ELISA 및/또는 SDS-PAGE 전기영동으로 측정한다. 키네틱 결합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})가, 데이터를 BIA 평가 프로그램을 사용한 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110)에 국제적으로 맞추으로써 동시에 수득된다. 평형 해리 상수(K_D) 값은 k_{off}/k_{on} 으로서 계산된다. 이 프로토콜은 인간 C1q, 기타 포유동물의 C1q(예를 들어, 마우스 C1q, 래트 C1q, 영장류 C1q) 뿐만 아니라 상이한 형태의 C1q를 포함한, 임의의 C1q에 대한 항체의 결합 친화도를 측정하는 데 사용하기에 적합하다. 항체의 결합 친화도는 일반적으로 25°C에서 측정하나, 37°C에서도 측정할 수 있다.

[0136] 본원의 인간화 항체는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 암소, 말, 낙타, 양, 염소 또는 돼지와 같은 임의의 포유류 생물을 포함한, 보체 시스템을 갖는 임의의 생물로부터 유도된 C1q 항원에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항-C1q 항체는 인간 C1q 상의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 항-C1q 항체는 인간 및 마우스 C1q 상의 에피토프에 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 항-C1q 항체는 인간, 마우스 및 래트 C1q 상의 에피토프에 특이적으로 결합된다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본원은 본원의 다른 항체에 의해 결합된 C1q 에피토프와 동일하거나 겹치는 C1q의 에피토프에 결합되는 인간화 항-C1q 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항-C1q 항체 M1에 의해 결합된 C1q 에피토프와 동일하거나 겹치는 C1q의 에피토프에 결합되는 인간화 항-C1q 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q로의 결합에 대해 본원의 다른 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 상기 항-C1q 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도

마 세포주에 의해 생산된 항-C1q 항체 M1 또는 이의 항-C1q 결합 단편과 경쟁한다.

- [0138] 동일하거나 겹치는 에피토프에 인간화 항-C1q 항체의 어느 C1q 에피토프가 결합되는지를 측정하거나 2개의 항체가 상기 에피토프에 결합하는지의 여부를 측정하는데 사용될 수 있는 방법은 X-선 결정학, NMR 분광학, 알라닌 스캐닝 돌연변이, 겹치는 C1q 서열을 갖는 C1q-유도된 펩티드를 포함하는 펩티드 라이브러리의 선별, 및 경쟁 측정을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 경쟁 측정은 2개의 항체가 동일하거나 입체적으로 겹치는 에피토프를 인지함으로써 동일한 에피토프에 결합하는지의 여부 또는 하나의 항체가 항원으로의 다른 항체의 결합을 완전히 억제하는지의 여부를 측정하는데 특히 유용하다. 이러한 측정은 당해 분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 항원 또는 항원 발현 세포는 다중-웰 플레이트 상에서 부동화되고 표지된(labeled) 항체의 결합을 차단하는 비표지된 항체의 능력이 측정된다. 이러한 경쟁 측정을 위한 통상의 표지는 방사능표지이거나 효소 표지이다.
- [0139] 본원에 포함된 경쟁 항체는 1 μ M 이하에서 본원의 임의의 항-C1q 항체(예를 들어, M1 또는 M1의 항원-결합 단편)의 C1q로의 결합을 억제(즉, 대조군과 비교해 예방하거나 방해)하거나 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 및 95% 이상 감소시키는 인간화 항체이다. 예를 들어, 경쟁 측정에서 경쟁 항체의 농도는 항체 M1 또는 M1의 항원-결합 단편의 K_D 이하일 수 있다. 결합원들간의 경쟁은, 예를 들어, ELISA를 사용하여 및/또는 용액 중 C1q와 항체와의 상호작용을 모니터링함으로써 생체내에서 쉽게 측정할 수 있다. 상기 분석을 수행하기 위한 정확한 수단은 중요하지 않다. C1q는 96-웰에 고정시키거나 균질 용액에 넣을 수 있다. 특정 실시양태에서, 표지된 항-C1q 항체(예를 들어, M1)의 결합을 차단하는 비표지된 후보 항체(들)의 능력은 방사능, 효소 또는 기타 표지를 사용하여 측정할 수 있다. 역측정에서, 표지된 항-C1q 항체와 C1q(여기서, 상기 표지된 항-C1q 항체, 예를 들어, M1과 C1q는 이미 결합되어 있다)와의 상호작용을 방해하는 비표지된 항체의 능력이 측정된다. 결합 표지의 측정 내내 판독한다. C1q 및 후보 항체(들)는 임의의 순서로 또는 동일한 시간에 첨가할 수 있다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 자가항체간의 상호작용을 억제한다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 필수적으로 ATCC 수탁번호 PTA-120399의 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체 M1 또는 이의 항-C1q 결합 단편과 동일한 C1q 에피토프와 결합한다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 1-4에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및/또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 5-8에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 1의 아미노산 서열, 또는 서열 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 5의 아미노산 서열, 또는 서열 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 1의 아미노산 서열, 또는 서열 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 6의 아미노산 서열, 또는 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 1의 아미노산 서열, 또는 서열 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는

어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 5의 아미노산 서열, 또는 서열 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 4의 아미노산 서열, 또는 서열 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 6의 아미노산 서열, 또는 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 4의 아미노산 서열, 또는 서열 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 7의 아미노산 서열, 또는 서열 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항-C1q 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 4의 아미노산 서열, 또는 서열 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 서열 8의 아미노산 서열, 또는 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-120399를 가진 하이브리도마 세포주, 또는 이의 자손에 의해 생산된 단일클론 항체 M1의 경쇄 가변 도메인의 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-120399를 가진 하이브리도마 세포주 또는 이의 자손에 의해 생산된 단일클론 항체 M1의 중쇄 가변 도메인의 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 ATCC 수탁번호 PTA-120399를 가진 하이브리도마 세포주 또는 이의 자손에 의해 생산된 단일클론 항체 M1의 경쇄 가변 도메인의 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR과 중쇄 가변 도메인의 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR을 포함할 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1q 단백질에 결합되고 (a) 서열 9의 아미노산 잔기 196-226(서열 12), 또는 서열 9의 아미노산 잔기 196-226(GLFQVVSGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHI)(서열 12)에 상응하는 C1q 단백질 A 쇄(C1qA)의 아미노산 잔기; (b) 서열 9의 아미노산 잔기 196-221(서열 13), 또는 서열 9의 아미노산 잔기 196-221(GLFQVVSGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(서열 13)에 상응하는 C1qA의 아미노산 잔기; (c) 서열 9의 아미노산 잔기 202-221(서열 14), 또는 서열 9의 아미노산 잔기 202-221(SGGMVLQLQQGDQVWVEKDP)(서열 14)에 상응하는 C1qA의 아미노산 잔기; (d) 서열 9의 아미노산 잔기 202-219(서열 15), 또는 서열 9의 아미노산 잔기 202-219(SGGMVLQLQQGDQVWVEK)(서열 15)에 상응하는 C1qA의 아미노산 잔기; 및 (e) 서열 9의 아미노산 잔기 Lys 219 및/또는 Ser 202, 또는 서열 9의 아미노산 잔기 Lys 219 및/또는 Ser 202에 상응하는 C1qA의 아미노산 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기 내의 상기 C1q 단백질의 아미노산 중 하나 이상에 결합될 수 있다.

[0149] 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 추가로 (a) 서열 11의 아미노산 잔기 218-240(서열 16), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 218-240(WLAVNDYDMVGI QGSDSVFSGF)(서열 16)에 상응하는 C1q 단백질 C 쇄(C1qC)의 아미노산 잔기; (b) 서열 11의 아미노산 잔기 225-240(서열 17), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 225-240(YDMVGI QGSDSVFSGF)(서열 17)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (c) 서열 11의 아미노산 잔기 225-232(서열 18), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 225-232(YDMVGIQG)(서열 18)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (d) 서열 11의 아미노산 잔기 Tyr 225, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 Tyr 225에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (e) 서열 11의 아미노산 잔기 174-196(서열 19), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 174-196(HTANLCVLLYRSGVKVVFCTGHT)(서열 19)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (f) 서열 11의 아미노산 잔기 184-192(서열 20), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 184-192(RSGVKVVTTF)(서열 20)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (g) 서열 11의 아미노산 잔기 185-187, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 185-187(SGV)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; 및 (h) 서열 11의 아미노산 잔기 Ser 185, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 Ser 185에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기 내의 상기 C1q 단백질의 아미노산 중 하나 이상에 결합될 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 서열 9에 나타낸 인간 C1qA의 아미노산 잔기 Lys 219 및 Ser 202, 또는 서열 9에 나타낸 Lys 219 및 Ser 202에 상응하는 인간 C1qA의 아미노산 잔기, 및 서열 11에 나타낸

인간 C1qC의 아미노산 잔기 Tyr 225, 또는 서열 11에 나타낸 Tyr 225에 상응하는 인간 C1qC의 아미노산 잔기에 결합된다. 특정 실시양태에서, 항-C1q 항체는 서열 9에 나타낸 인간 C1qA의 아미노산 잔기 Lys 219, 또는 서열 9에 나타낸 Lys 219에 상응하는 인간 C1qA의 아미노산 잔기, 및 서열 11에 나타낸 인간 C1qC의 아미노산 잔기 Ser 185, 또는 서열 11에 나타낸 Ser 185에 상응하는 인간 C1qC의 아미노산 잔기에 결합될 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1q 단백질에 결합되고 (a) 서열 11의 아미노산 잔기 218-240(서열 16), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 218-240(WLAVNDYYDMVGI QGSDSVFSGF)(서열 16)에 상응하는 C1q 단백질 C 쇠(C1qC)의 아미노산 잔기; (b) 서열 11의 아미노산 잔기 225-240(서열 17), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 225-240(YDMVGI QGSDSVFSGF)(서열 17)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (c) 서열 11의 아미노산 잔기 225-232(서열 18), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 225-232(YDMVGIQG)(서열 18)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (d) 서열 11의 아미노산 잔기 Tyr 225, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 Tyr 225에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (e) 서열 11의 아미노산 잔기 174-196(서열 19), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 174-196(HTANLCLVLLYRSGVKVVTFCGHT)(서열 19)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (f) 서열 11의 아미노산 잔기 184-192(서열 20), 또는 서열 11의 아미노산 잔기 184-192(RSGVKVVT)(서열 20)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; (g) 서열 11의 아미노산 잔기 185-187, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 185-187(SGV)에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기; 및 (h) 서열 11의 아미노산 잔기 Ser 185, 또는 서열 11의 아미노산 잔기 Ser 185에 상응하는 C1qC의 아미노산 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기 내의 상기 C1q 단백질의 아미노산 중 하나 이상에 결합될 수 있다.

[0152] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 C1s간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 C1r간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 C1s간의 상호작용 및 C1q와 C1r간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 다른 항체, 예를 들어, 자가항체간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 2.5:1 미만, 2.0:1 미만, 1.5:1 미만 또는 1.0:1 미만의 화학량론으로 각각의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 C1q 항체는 C1q와 항-C1q 항체의 대략 등몰 농도에서 C1q-C1s 상호작용과 같은 상호작용을 억제한다. 다른 실시양태에서, 상기 항-C1q 항체는 20:1 미만, 19.5:1 미만, 19:1 미만, 18.5:1 미만, 18:1 미만, 17.5:1 미만, 17:1 미만, 16.5:1 미만, 16:1 미만, 15.5:1 미만, 15:1 미만, 14.5:1 미만, 14:1 미만, 13.5:1 미만, 13:1 미만, 12.5:1 미만, 12:1 미만, 11.5:1 미만, 11:1 미만, 10.5:1 미만, 10:1 미만, 9.5:1 미만, 9:1 미만, 8.5:1 미만, 8:1 미만, 7.5:1 미만, 7:1 미만, 6.5:1 미만, 6:1 미만, 5.5:1 미만, 5:1 미만, 4.5:1 미만, 4:1 미만, 3.5:1 미만, 3:1 미만, 2.5:1 미만, 2.0:1 미만, 1.5:1 미만, 또는 1.0:1 미만의 화학량론으로 C1q에 결합된다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 C1q 항체는 20:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만의 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합된다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 6:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만의 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합된다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 2.5:1 내지 1.0:1 또는 1.0:1 미만의 범위의 결합 화학량론으로 C1q에 결합된다. 일부 실시양태에서, 1.0:1의 C1q에 대한 결합 화학량론을 가진 상기 본원의 항-C1q 항체는, 예를 들어 본원의 CH50 에세이에 의해 확인된 C1F 용혈의 대략 50% 억제를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 C1r간의 상호작용, 또는 C1q와 C1s간의 상호작용, 또는 C1q와 C1r 및 C1s 둘 다간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1q와 C1r간의 상호작용, C1q와 C1s간의 상호작용, 및/또는 C1q와 C1r 및 C1s 둘 다간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qA-쇄에 결합된다. 다른 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qB-쇄에 결합된다. 다른 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qC-쇄에 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qA-쇄, C1qB-쇄 및/또는 C1qC-쇄에 결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qA-쇄, C1qB-쇄 및/또는 C1qC-쇄의 구상 도메인에 결합된다. 다른 실시양태에서, 상기 인간화 항-C1q 항체는 C1qA-쇄, C1qB-쇄 및/또는 C1qC-쇄의 콜라겐-유사 도메인에 결합된다.

[0153] 본원의 인간화 항체가 2개 이상의 보체 인자간의 상호작용, 예를 들어, C1q와 C1s간의 상호작용 또는 C1q와 C1r간의 상호작용을 억제하는 경우, 상기 항체의 존재하에 일어나는 상호작용은 본원의 항체가 부재하는 대조군에 비해 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상 감소될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 인간화 항체의 존재하에 일어나는 상호작용은 본원의 인간화 항체가 부재하는 대조군에 비해 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양이 감소된다.

[0154] 특정 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C4-분열(cleavage)을 본원의 항체가 부재하는 대조군에 비해 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상, 또는 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양을 억제한다. C4-분열 측정방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. C4-분

열에 대한 본원의 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 항체는 C4-분열을 C1q와 항-C1q 항체의 대략 등몰 농도에서 억제한다.

[0155] 특정 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 자가항체-의존적 및 보체-의존적 세포독성(CDC)을 본원의 항체가 부재하는 대조군에 비해 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상, 또는 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양을 억제한다. 자가항체-의존적 및 보체-의존적 세포독성에 대한 본원의 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 보체-의존적 세포-중재된 세포독성(CDCC)을 본원의 항체가 부재하는 대조군에 비해 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상, 또는 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양을 억제한다. CDCC 측정방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. CDCC 억제에 대한 본원의 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원의 항체는 CDCC는 억제하나 항체-의존적 세포의 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)은 억제하지 않는다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 C1F 용혈(CH50 용혈로도 지칭됨)을 본원의 항체가 부재하거나, 보체 인자 또는 자가항체와 같은 기타 항체에 결합하지 않는 대조용 항체가 사용되는 대조군에 비해 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상, 또는 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양으로 억제한다(예를 들어, 하기 실시예 부분 참조). C1F 용혈의 측정방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 하기 실시예 부분 참조). C1F 용혈에 대한 본원의 인간화 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 200ng/ml 미만, 100ng/ml 미만, 50ng/ml 미만 또는 20 ng/ml 미만의 용량으로 C1F 용혈을 50% 이상 중화시킨다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항체는 C1q와 항-C1q 항체의 대략 등몰 농도에서 C1F 용혈을 억제한다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 인간 C1F 용혈 측정에서 용혈을 중화시킨다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항체는 인간 및 래트 C1F 용혈 측정에서 용혈을 중화시킨다(예를 들어, 하기 실시예 부분 참조).

[0158] 일부 실시양태에서, 대안적 경로는 C1q 결합 및 후속적인 C1s 활성화에 의해 CDC를 증폭시킬 수 있고, 이들 실시양태 중 적어도 일부 실시양태에서는 본원의 항체가 대안적 경로를 본원의 항체가 부재하는 대조군에 비해 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상, 또는 30% 이상 내지 99% 이상의 범위의 양을 억제한다.

[0159] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 시냅스 소실의 세포 시험관내 모델, 또는 생체내 마우스 모델과 같은 생체내 모델에서의 시냅스 소실을 예방한다. 생체내 마우스 모델은 알츠하이머 질환의 마우스 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein: APP) 트랜스제닉 모델인 Tg2576, 헌팅턴병에 대한 트랜스제닉 모델인 R6/2 NT-CAG150, 척수성근위축에 대한 마우스 모델인 SMA Δ7, 또는 녹내장의 유전자 마우스 모델인 DBA/2J를 포함할 수 있다. 일반적으로, 시냅스 소실을 나타내는 임의의 신경퇴행성 질환 모델을 사용할 수 있다.

[0160] 시험관내 또는 생체내 시냅스 소실의 측정방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 시험관내 병변 생성이 본원의 항체가 부재하는 대조군 실험에 비해 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상, 또는 30% 이상 내지 95% 이상의 범위의 양만큼 저하될 수 있다. 시험관내 병변 생성 예방에 대한 본원의 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다. 시험관내 시냅스 소실이 본원의 항체가 부재하는 대조군 실험에 비해 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 35% 이상, 40% 이상 또는 50% 이상, 또는 5% 이상 내지 50% 이상의 범위의 양만큼 저하될 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 NMO의 생체의 척수 슬라이스 모델 또는 NMO의 생체내 마우스 모델에서의 병변 생성을 예방한다. 생체의 또는 생체내 병변 생성의 측정방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 생체의 병변 생성은 적어도 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 또는 4.0의 상대적 스코어만큼 감소될 수

있다. 생체의 병변 생성의 예방에 대한 본원의 항체의 EC₅₀ 값은 3 µg/ml 미만, 2.5 µg/ml 미만, 2.0 µg/ml 미만, 1.5 µg/ml 미만, 1.0 µg/ml 미만, 0.5 µg/ml 미만, 0.25 µg/ml 미만, 0.1 µg/ml 미만, 0.05 µg/ml 미만일 수 있다. 생체내 병변 생성이 착색(staining) 소실(면적%) 면에서 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 35% 이상, 40% 이상 또는 50% 이상, 또는 5% 이상 내지 50% 이상의 범위의 양만큼 감소될 수 있다. 착색은 APQ4 착색, GFAP 착색 또는 MBP 착색으로 평가할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0162] 본원은 인간화 항-C1q 항체를 제공한다. 본원의 상기 인간화 항체는 다음 특징 중 하나 이상을 가질 수 있다. 본원의 상기 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 항체 단편, 이중특이 및 다중특이 항체, 다가 항체 또는 헤테로결합(heteroconjugate) 항체일 수 있다. 본원의 항체 단편은 본원의 임의의 인간화 항-C1q 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 기능적 단편일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 상기 항체 단편은 C1q에 특이적으로 결합되고 C1q의 생물학적 활성을 증화시킨다. 일부 실시양태에서, 본원의 상기 항체 단편은 상기 인간화 항-C1q 항체의 축소판이거나 상응하는 전장 항체의 동일한 에피토프를 가지나 분자량이 훨씬 작은 본원의 항체 단편이다. 이러한 축소된 항-C1q 항체 단편은 보다 우수한 뇌 투과능과 보다 짧은 반감기를 갖는데, 이는 조영 및 진단 용도에서 유리하다(예를 들어, Lutje S et al., *Bioconjug Chem.* 2014 Feb 19;25(2):335-41; Tavaré R et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 21;111(3):1108-13; 및 Wiehr S et al., *Prostate.* 2014 May;74(7):743-55 참조). 따라서, 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체 단편은 그의 상응하는 전장 항체에 비해 우수한 뇌 투과능을 갖고/거나 그의 상응하는 전장 항체에 비해 짧은 반감기를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 제 1 항원과 제 2 항원을 인지하는 이중특이 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 제 1 항원은 C1q 항원이다. 일부 실시양태에서, 상기 제 2 항원은 혈액-뇌-장벽을 통과하는 수용을 용이하게 하는 항원으로, 트랜스페린 수용체(TR), 인슐린 수용체(HIR), 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGFR), 저밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2(LPR-1 및 2), 디프테리아 독소 수용체, CRM197, 라마 단일 도메인 항체, TMEM 30(A), 단백질 도입 도메인, TAT, Syn-B, 페너트라틴(penetratin), 폴리-아르기닌 펩티드, 안지오펩(angiopep) 펩티드 및 ANG1005를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0163] 본원의 인간화 항-C1q 항체는 조작된 이펙터 기능, 아미노산 서열 변형 또는 당해 분야에 공지된 기타 항체 변형을 추가로 함유할 수 있고; 예를 들어, 본원에 기재된 항-C1q 항체의 불변 영역은 변형되어 보체 활성화를 억제시킬 수 있다. 예를 들어, 이론에 구애됨 없이, 인간 IgG1, IgG2, 및 IgG3과 달리, 인간 IgG4의 Fc 영역은 C1q에 결합하지 않는다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 인간 IgG4의 Fc 영역을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 상기 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 예를 들어 암 스위칭을 예방하고/하거나 세포 상에서 발현된 Fc 수용체와 상호작용 하는 Fc 영역의 능력을 감소 또는 억제한다(Angal S et al., *Mol Immunol.* 1993 Jan;30(1):105-8; and Morgan A et al., *Immunology* 1995 86 319-324 참조). 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 카뎀 번호표기 규칙에 따른 241번 또는 248번 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 암 스위칭을 예방하는 241번 위치에서의 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 241번 위치에서 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 Fc 수용체와 상호작용 하는 Fc 영역의 능력을 감소 또는 억제하는 248번 위치에서의 세린으로부터 프롤린으로의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 카뎀 번호표기 규칙에 따른 248번 위치에서 류신으로부터 글루타메이트로의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0164] 추가의 인간화 항-C1q 항체, 예를 들어, 본원의 C1q 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 측정 방법에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 특성에 대해 동정되고/되거나 선별되고/되거나 특정화될 수 있다.

[0165] 항체 제조

[0166] 본 발명의 항-C1q 항체는 본 명세서에 기술되거나 또는 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 본 발명의 단일클론 항체 (예컨대, 인간화 항체)는 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975)]에 기술된 표준 체세포 혼성화 기술과 같은 다양한 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 바람직하지만, 원칙적으로 인간 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 B 림프구의 바이러스성 또는 발암성 형질전환 및 파지 디스플레이 수법과 같은 단일클론 항체를 생성하기 위한 다른 기술도 사용될 수 있다.

[0167] 본 발명의 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 생산하는 한 가지 방법은 뮤린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 면역화 프로토콜 및 면역화된 비장 세포를 단리 및 융합하는 기술을 포함하여 당 업계에

널리 공지되어있다.

- [0168] 다클론 항체는 적합한 대상체를 폴리펩티드 면역원(immunogen)으로 면역화시킴으로써 제조될 수 있다. 면역화된 대상체의 폴리펩티드 항체 역가는 고정된 폴리펩티드를 사용하는 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)과 같은 표준 기술에 의해 시간 경과에 따라 모니터링될 수 있다. 원하는 경우, 항원에 대한 항체가 포유동물로부터 (예를 들어, 혈액으로부터) 단리될 수 있으며, IgG 분획을 얻기 위해, 단백질 A 크로마토그래피와 같은 널리 공지된 기술에 의해 추가로 정제될 수 있다. 면역화 후, 적절한 시기에, 예를 들어 항체 역가가 가장 높을 때, 항체 생성 세포를 대상으로부터 얻을 수 있고, 문헌 [Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497]에 처음 기술된 하이브리도마 수법 (문헌 [Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; 및 Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75] 참조), 최근의 인간 B 세포 하이브리도마 수법 (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), EBV-하이브리도마 수법 (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 또는 트리오마 수법 (trioma technique)과 같은 표준 수법에 의해 단일클론 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 단일클론 항체 하이브리도마를 생성하는 기술은 널리 공지되어 있다 (일반적으로, 문헌 [Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387402; Gefter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:23136] 참조). 요약하면, 전술한 바와 같이 면역원으로 면역화된 포유동물로부터의 림프구 (전형적으로는 비장 세포)에 불멸 세포주 (전형적으로는 골수종)를 융합시키고, 생성된 하이브리도마 세포의 배양 상청액을 스크리닝하여, 바람직하게는 구체적으로, 폴리펩티드 항원에 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 동정한다.
- [0169] 항 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 단일클론 항체의 생산 목적을 위해, 림프구 및 불멸화된 세포주를 융합시키는데 사용되는 널리 공지된 다양한 프로토콜 중 임의의 것이 적용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; Kenneth (1980) *supra*] 참조). 또한, 당업자라면 또한 유용할 수 있는 이들 방법의 많은 변형물이 존재한다는 것을 알 수 있을 것이다. 전형적으로, 불멸 세포주 (예컨대, 골수종 세포주)는 림프구와 동일한 포유동물 종으로부터 유래된다. 예를 들어, 무린 하이브리도마는 본 발명의 면역원성 제제로 면역화된 마우스의 림프구를 불멸화된 마우스 세포주와 융합시킴으로써 제조될 수 있다. 바람직한 불멸 세포주는 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 함유하는 배양 배지 ("HAT 배지")에 민감한 마우스 골수종 세포주이다. 표준 수법에 따른 융합 파트너, 예를 들어, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/0-Ag14 골수종 주로서, 임의의 다수의 골수종 세포주가 사용될 수 있다. 이들 골수종주는 메릴랜드주 로크빌의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 입수할 수 있다. 전형적으로, HAT-민감성 마우스 골수종 세포는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG")을 사용하여 마우스 비장 세포에 융합된다. 그 후, 상기 융합에서 생성된 하이브리도마 세포는 융합되지 않은 골수종 세포 및 비 생성적으로 융합된 골수종 세포 (융합되지 않은 비장 세포는 형질전환되지 않기 때문에 며칠 후에 사멸됨)를 사멸시키는 HAT 배지를 사용하여 선택한다. 본 발명의 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는, 예를 들어 표준 ELISA 분석법을 사용하여 소정의 폴리펩티드에 결합하는 항체에 대해 하이브리도마 배양 상청액을 스크리닝함으로써 검출된다.
- [0170] 단일클론 항체를 분배하는 하이브리도마 제조의 대안으로서, 재조합 조합(recombinant combinatorial) 면역글로불린 라이브러리 (예를 들어, 항체 파지 디스플레이 라이브러리)를 적절한 폴리펩티드로 스크리닝하여, 이에 따라, 상기 폴리펩티드에 결합하는 면역글로불린 라이브러리 멤버를 단리함으로써, 원하는 폴리펩티드에 특이적인 단일클론 (예를 들어, C1q)을 동정하고, 단리할 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리의 생산 및 스크리닝 키트는 상업적으로 입수 가능하다 (예를 들어, Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, 카탈로그 번호. 27-9400-01; 및 Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, 카탈로그 번호. 240612). 또한, 항체 디스플레이 라이브러리의 생산 및 스크리닝에 사용하기에 특히 적합한 방법 및 시약의 예는 예를 들어, 문헌 [Ladner *et al.* 미국 특허 제 5,223,409호; Kang *et al.* 국제 출원 WO 92/18619; Dower *et al.* 국제 출원 WO 91/17271; Winter *et al.* 국제 공보 WO 92/20791; Markland *et al.* 국제 출원 WO 92/15679; Breitling *et al.* 국제 공보 WO 93/01288; McCafferty *et al.* 국제 출원 WO 92/01047; Garrard *et al.* 국제 출원 WO 92/09690; Ladner *et al.* 국제 출원 WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Biotechnology*

(NY) 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; 및 McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554]에서 찾아 볼 수 있다.

[0171] 또한, 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들 수 있는 인간화 및 키메라 단일클론 항체와 같은 재조합 항 C1q 항체를 생산할 수 있다. 이러한 인간화 및 키메라 단일클론 항체는, 예를 들어 문헌 [Robinson *et al.* 국제 특허 공보 PCT/US86/02269; Akira *et al.* 유럽 특허 출원 제 184,187호; Taniguchi, M. 유럽 특허 출원 제 171,496호; Morrison *et al.* 유럽 특허 출원 제 173,494호; Neuberger *et al.* PCT 출원 WO 86/01533; Cabilly *et al.* 미국 특허 제 4,816,567호; Cabilly *et al.* 유럽 특허 출원 제 125,023호; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; 및 Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559); Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:214; Winter 미국 특허 제 5,225,539호; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 및 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060]에 기술된 방법을 사용하여, 당 업계에 공지된 재조합 DNA 수법에 의해 생산될 수 있다.

[0172] 또한, 인간화 항체는 미국 특허 제 5,565,332호에 개시된 것과 같은 표준 프로토콜에 따라 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 사슬 또는 특이적 결합 쌍 멤버는, 예를 들어 미국 특허 제 5,565,332호, 제 5,871,907호 또는 제 5,733,743호에 기재된 바와 같은 당 업계에 공지된 기술을 사용하여, 복제 가능한 일반적 디스플레이 패키지의 성분 및 특이적 결합 쌍 멤버의 폴리펩티드 사슬의 융합물을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터와 단일 결합 쌍 멤버의 제2 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 벡터 사이의 재조합에 의해, 생성될 수 있다. 세포 내 단백질 기능을 저해하기 위한 세포 내 항체의 사용이 또한 당 업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:101-108; Werge, T. M. *et al.* (1990) *FEBS Lett.* 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7427-7428; Marasco, W. A. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) *Biotechnology (NY)* 12:396-399; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Duan, L *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5075-5079; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5932-5936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672; Mhashilkar, A. M. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Richardson, J. H. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3137-3141; Marasco *et al.* 의 PCT 공보 WO 94/02610; 및 Duan *et al.*의 PCT 공보 WO 95/03832] 참조).

[0173] 또 다른 실시양태에서, 인간 단일클론 항 C1q 항체는 마우스 시스템 대신 인간 면역계의 일부를 운반하는 트랜스제닉 또는 트랜스 염색체 마우스 (transchromosomal mice)를 사용하여 생산될 수 있다. 한 실시양태에서, 내인성 μ 및 κ 사슬 유전자좌를 불활성화시키는 표적 돌연변이와 함께, 재배치되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니 유전자좌 (miniloci)를 함유하는 트랜스제닉 마우스는 본 명세서에서 "HuMAb 마우스"로 지칭된다 (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856 859). 따라서, 상기 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 발현의 감소를 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입 트랜스진(transgene)은 종류 변환 및 체세포 돌연변이를 거쳐, 고친화성 인간 IgG κ 단일클론 항체를 생산한다 (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65 93, 및 Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y Acad. Sci.* 764:536 546). HuMAb 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287 6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647 656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720 3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117 123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821 830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912 2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856 859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579 591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65 93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536 546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 851]에 개시되어 있다. 또한 문헌 [미국 특허 제 5,545,806호; 제 5,569,825호; 제 5,625,126호; 제 5,633,425호; 제 5,789,650호; 제 5,877,397호; 제 5,661,016호; 제 5,814,318호; 제 5,874,299호; 및 제 5,770,429호; Lonberg 및 Kay, 및 GenPharm International 전체; Surani *et al.*의 미국 특허

허 제 5,545,807호; 국제 공보 WO 98/24884 (1998년 6월 11일 공개); WO 94/25585 (1994년 11월 10일 공개); WO 93/1227 (1993년 6월 24일 공개); WO 92/22645 (1992년 12월 23일 공개); WO 92/03918 (1992년 3월 19일 공개)]을 참조한다.

[0174] 본 발명의 또 다른 측면은, 각각 면역원성 C1q 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 부분으로 동물을 면역화하는 단계; 및 그 후, 상기 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 동물 항체로부터 단리하는 단계를 포함하는 프로세스에 의해 얻을 수 있는 항-C1q 항체에 관한 것이다.

[0175] 본 발명의 또 다른 측면에서, 일부 또는 공지된 항체 서열을 사용하여, 새로운 항체를 생산 및/또는 발현시킬 수 있다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호 작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개별 항체 사이에 더 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호 작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열에 이식된 특이적 자연 발생 항체의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작함으로써, 특이적 자연 발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다 (예를 들어, Riechmann, L. *et al.*, 1998, Nature 332:323 327; Jones, P. *et al.*, 1986, Nature 321:522 525; 및 Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029 10033] 참조). 이러한 프레임워크 서열은 생식 세포 또는 비-생식 세포 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 이들 생식 세포 서열은, B 세포 성숙 과정에서 V(D)J 결합에 의해 형성된 완전히 조립된 가변 유전자를 포함하지 않을 것이므로, 성숙한 항체 유전자 서열과 상이할 것이다. 생식 세포 유전자 서열은 또한, 가변 영역에 걸쳐 개별적으로 고친화성 2차 레퍼토리 항체의 서열과 균등하게 상이할 것이다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역의 아미노 말단 부분에서 비교적 드물다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단 부분 및 프레임워크 영역 4의 카르복시 말단 부분에서 비교적 드물다. 또한, 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합 특성을 크게 변화시키지 않는다. 이러한 이유로, 원래의 항체와 유사한 결합 특성을 갖는 온전한 재조합 항체를 재생성하기 위해, 특정 항체의 전체 DNA 서열을 얻을 필요는 없다 (1999년 3월 12일자로 출원된 PCT/US99/05535 참조). CDR 영역에 걸친 일부 중쇄 및 경쇄 서열이 일반적으로 이러한 목적에 충분하다. 상기 일부 서열은 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는 생식 세포 및/또는 비-생식 세포 가변 및 결합 유전자 절편을 결정하는데 사용된다. 그 후, 생식 세포 및/또는 비-생식 세포 서열을 사용하여, 가변 영역의 누락 부분을 채운다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙 중에 절단되며, 최종 항체의 특성에 기여하지 않는다. 누락된 서열을 추가하기 위해, 클로닝된 cDNA 서열은 결합 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드와 조합될 수 있다. 대안적으로, 전체 가변 영역은 짧은 중첩 올리고뉴클레오타이드의 세트로서 합성될 수 있고, PCR 증폭에 의해 조합되어, 전체적으로 합성된 가변 영역 클론을 생성할 수 있다. 이러한 과정은 제거 (elimination) 또는 포함 (inclusion) 또는 특정 제한 부위 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 특정 이점을 갖는다. 상기 방법은 또한 한 가지 종 (예를 들어, 인간)에서 특정 면역글로불린 코딩 서열의 라이브러리를 스크리닝하여, 다른 종 (예를 들어, 마우스)에서 공지된 항체 서열로부터 동족 면역글로불린 코딩 서열을 설계하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 하기 실시예 부분 참조).

[0176] 하이브리도마의 중쇄 및 경쇄 전사체의 뉴클레오타이드 서열은 천연 서열과 동일한 아미노산 코딩 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위해, 합성 올리고뉴클레오타이드의 중첩 세트를 설계하는데 사용될 수 있다. 상기 합성 중쇄 및 카파 사슬 서열은 천연 서열과 3가지 방식에서 상이할 수 있다: 반복된 뉴클레오타이드 염기의 스트링을 중단하여 올리고뉴클레오타이드 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 하며; 최적의 번역 개시 부위는 Kozak의 규칙 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870)에 따라 통합되고; HindIII 부위는 번역 개시 부위의 상류에서 조작된다.

[0177] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 양자에서, 최적화된 코딩 및 상응하는 비-코딩 가닥 서열은 상응하는 비-코딩 올리고뉴클레오타이드의 대략적인 중간 지점인 30-50개의 뉴클레오타이드로 분해된다. 따라서, 각 사슬에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 150-400개의 뉴클레오타이드 절편에 걸쳐있는 중첩 이중 가닥 세트로 조립될 수 있다. 그 후, 상기 풀을 150-400개의 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 산물을 생성하기 위한 주형으로 사용한다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오타이드 세트는 2개의 중첩 PCR 산물을 생성하기 위해 개별적으로 증폭되는 2개의 풀로 분해될 것이다. 그 후, 이들 중첩 산물은 PCR 증폭에 의해 조합되어, 완전한 가변 영역을 형성한다. 또한, 발현 벡터 구축물에 쉽게 클로닝될 수 있는 단편을 생산하기 위해 PCR 증폭에 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 중첩 단편이 포함되는 것이 바람직할 수 있다.

[0178] 그 후, 다시 제작된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 클로닝된 프로모터, 리더 서열, 번역 개시, 리더 서열, 불변 영역, 3' 비 번역, 폴리아데닐화 및 전사 종결 서열과 조합되어, 발현 벡터 구축물을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 구축물은 단일 벡터로 조합되거나, 숙주 세포 내로 공동 형질감염되거나, 연속적으로 형질감염되거나 또는

개별적으로 형질감염될 수 있으며, 이후 융합되어 양 사슬을 발현하는 숙주 세포를 형성할 수 있다.

[0179] 이러한 용도의 플라스미드는 당 업계에 공지되어 있으며, 하기 실시예 부분에 제공된 플라스미드를 포함한다. 본 발명의 완전 인간 및 키메라 항체는 또한 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgM 및 IgD 항체, 및 이들의 변이체 및 돌연변이를 포함한다. 유사한 플라스미드가 다른 중쇄 이소타입(isotype)의 발현을 위해 또는 램다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 제작될 수 있다.

[0180] 따라서, 본 발명의 한 가지 측면에서, 공지된 비인간 또는 인간 항체 (예를 들어, ATCC 수탁 번호 PTA-120399를 가지는 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 단일클론 항체 M1과 같은 마우스 항 인간 항 C1q 항체)의 구조적 특성은, C1q 단백질에 대한 결합과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능성 특성을 보유하는 구조적으로 관련된 인간 항 인간 C1q 항체를 생성하는데 사용된다. 또 다른 기능성 특성은 경쟁적 ELISA 분석에서 C1q에 대한 단일클론 항체 M1의 결합을 저해하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적으로 관련된 항-인간 C1q 항체는 하기 실시예 부분에 기재된 바와 같은 IC₅₀ 값에 의해 측정된 바와 같이, 단일클론 항체 M1과 비교하여, 상기 항원과 비슷한 결합 친화성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 구조적으로 관련된 항-인간 C1q 항체는 하기 실시예 부분에 기재된 IC₅₀ 값에 의해 측정된 바와 같이, 단일클론 항체 M1과 비교하여, 상기 항원에 대해 더 높은 친화성을 갖는다. 또한, 항-C1q 항체 (예를 들어, ATCC 수탁 번호 PTA-120399를 갖는 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 단일클론 항체 M1)의 하나 이상의 CDR 또는 가변 영역은 공지된 인간 프레임워크 영역 및 CDR과 재조합적으로 조합되어, 본 발명의 추가의 재조합적으로 조작된 인간 항 C1q 항체를 생성한다.

[0181] 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화성에서 특히 중요한 역할을 한다는 것이 당 업계에 공지되어 있으므로, 전술된 바와 같이 제조된 본 발명의 재조합 항체는 일부 실시양태에서 ATCC 수탁 번호 PTA-120399를 갖는 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 단일클론 항체 M1의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄 CDR3을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 단일클론 항체 M1의 가변 영역의 CDR2를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 단일클론 항체 M1의 가변 영역의 CDR1을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 CDR의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 전술된 조작 항체의 CDR1, 2 및/또는 3 영역은, ATCC 수탁 번호 PTA-120399를 가지는 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 단일클론 항체 M1의 가변 영역과 같은 정확한 아미노산 서열 (들)을 포함할 수 있다. 그러나, C1q에 효과적으로 결합하는 항체의 능력을 여전히 유지하면서, 정확한 CDR 서열로부터 약간의 편차가 가능할 수 있다는 것 (예를 들어, 보존적 서열 변형)을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 또 다른 실시양태에서, 상기 조작 항체는, 단일클론 항체 M1의 하나 이상의 CDR에, 예를 들어, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 동일한 하나 이상의 CDR로 구성될 수 있다.

[0183] 항체 단편

[0184] 특정 실시양태에서, 항-C1q 전항체(whole antibody)를 사용하는 것보다 항-C1q 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 단편 크기는 신속한 제거를 가능하게 한다.

[0185] 항체 단편의 생산을 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편들은 무손상 항체의 단백질 분해를 통해 유도되었다(예를 들어, Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) 참조). 그러나, 이러한 단편들은 이제 재조합 숙주 세포에 의해, 예를 들어, 본원의 항-C1q 항체를 코딩하는 핵산을 사용하여 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 단편들은 모두 대장균(*E. coli*)에서 발현되고 이로부터 분비되어, 이들 단편의 간단한 대량 생산이 가능하다. 항-C1q 항체 단편은 또한 상기한 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 분리할 수 있다. 대안으로, Fab'-SH 단편은 대장균(*E. coli*)으로부터 직접 회수될 수 있고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 생성한다(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배지로부터 직접 분리될 수 있다. 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 항체 단편의 생산은 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단쇄 Fv 단편(scFv)이다(WO 93/16185; 미국 특허 제 5,571,894호 및 제5,587,458호 참조). 항-C1q, 항-C1r 또는 항-C1q 항체 단편이 또한, 예를 들어, 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이성 또는 이중특이성일 수 있다.

[0186] 이중특이 및 다중특이 항체

- [0187] 일부 실시양태에서, 본원의 항체는 이중특이 항체 및 다중특이 항체를 포함한다.
- [0188] 이중특이 항체(BsAb)는 동일하거나 상이한 단백질(예를 들어, 본원의 하나 이상의 C1q 단백질) 상에서의 에피토프를 포함한, 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 그렇지 않으면, BsAb의 한 부분이 표적 C1q 항원에 결합하기 위한 암(arm)일 수 있고, 다른 부분은 두 번째 단백질에 결합하는 암과 조합될 수 있다. 이러한 항체는 전장 항체나 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 이중특이 항체)으로부터 유도될 수 있다.
- [0189] 이중특이 항체의 제조방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 전장 이중특이 항체의 고전적 생산은 2개의 면역글로불린 불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 하며, 여기서 상기 2개의 쇠는 상이한 특이성을 갖는다(Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 집합으로 인해, 이들 하이브리도마(쿼드로마(quadromas))는 10개의 상이한 항체 분자들의 잠재 혼합물을 생성하는데고, 상기 분자 중 하나만 정확한 이중특이 구조를 갖는다. 통상 친화성 크로마토그래피 단계에서 행해지는 상기 정확한 구조의 정제는 상당히 어렵고 생성물 수율이 낮다. 유사한 과정이 WO 93/08829 및 "Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)"에 기재되어 있다.
- [0190] 다른 접근법에 따르면, 목적인 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합체는 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 경쇄 결합에 필수적인 부위를 함유하는 첫 번째 중쇄 불변 영역(C_{H1})은 하나 이상의 융합체에 존재한다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 목적인 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA가 개별 발현 벡터내로 삽입되고, 적합한 숙주 생물내로 공동-형질전환된다. 이는, 구성에 사용된 3개의 폴리펩티드쇄의 부등 비율이 최적 수율을 제공하는 경우, 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호간 비율을 조절하는 데 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동등 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드쇄의 발현이 고수율을 제공하는 경우 또는 상기 비율이 특별한 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터내의 3개의 폴리펩티드쇄 중 2개 또는 3개 모두에 대한 코딩 서열을 삽입할 수 있다.
- [0191] 이 접근법의 일부 실시양태에서, 이중특이 항체는 하나의 암에 첫 번째 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(두 번째 결합 특이성 제공)으로 이루어진다. 이러한 비대칭 구조는 목적인 이중특이 화합물을 원치않는 면역글로불린쇄 조합으로부터 분리하는 것을 용이하게 하는데, 그 이유는 상기 이중특이 분자의 반쪽에만 면역글로불린 경쇄가 존재하여 쉬운 분리 방법을 제공하기 때문이다. 이 접근법은 WO 94/04690에 기재되어 있다. 이중특이 항체의 생성에 대한 추가의 상세한 사항에 대해서는, 예를 들어, "Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986)"을 참조한다.
- [0192] WO 96/27011 또는 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자간의 계면은, 재조합-세포 배지로부터 회수되는 헤테로다имер의 퍼센트를 최대화하기 위해 조작될 수 있다. 상기 계면은 항체 불변 도메인의 C_{H3} 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 이 방법에서는, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 상기 큰 측쇄와 동일하거나 유사한 크기의 보상(compensatory) "공동(cavity)"은, 큰 아미노산 측쇄가 보다 작은 것(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체됨으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생긴다. 이는 호모다имер와 같은 원치않는 최종 생성물에 비해 헤테로다имер의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.
- [0193] 항체 단편으로부터 이중특이 항체를 생성시키는 기술은 문헌에 기재되어 있었다. 예를 들어, 이중특이 항체는 화학 결합을 사용하여 제조할 수 있다. "Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)"은 무순상 항체가 단백질분해적으로 분리되어 F(ab')₂ 단편을 생성시키는 과정을 기재하고 있다. 이들 단편은 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원되어 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 다이설파이드 생성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 하나가 Fab'-TNB 유도체로 재전환되어 이중특이 항체를 형성시킨다. 생성된 이중특이 항체는 효소의 선택적 부동화에 대한 시약으로 사용될 수 있다.
- [0194] Fab' 단편은 *E. coli*로부터 직접 회수할 수 있고 화학적으로 커플링하여 이중특이 항체를 형성한다. "Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)"은 완전히 인간화 이중특이 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기재하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 별도로 *E. coli*로부터 선택되고 시험관내 화학적 커플링시켜 이중특이 항체를 형성시킨다. 이렇게 형성된 이중특이 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T-세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 야기한다.

[0195] 이가 항체 단편을 제조할 세포 배지로부터 직접 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이가 헤테로다이머는 류신 지퍼(leucine zipper)를 사용하여 생산되었다(Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 결합되었다. 항체 호모다이머는 힌지 영역에서 환원되어 모노머를 형성시킨 다음, 재산화되어 항체 헤테로다이머를 생성시켰다. "Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)"에 기재된 "이중체" 기술은 이중특이/이가 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 메커니즘을 제공하였다. 상기 단편은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(V_L)에 결합된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함하고, 상기 링커는 동일한 쇠 상에서 상기 2개의 도메인을 쌍으로 만들기에는 너무 짧다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인을 다른 단편의 상보적 V_H 및 V_L 도메인과 쌍으로 만들어서 2개의 항원-결합 위치를 생성시킨다. 단일쇄 Fv(sFv) 다이머의 사용에 의한 이중특이/이가 항체 단편을 제조하기 위한 다른 전략이 또한 보고되었다(참조: Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)).

[0196] 2개 이상의 원자가를 갖는 항체가 또한 포함된다. 예를 들어, 삼중특이 항체가 제조될 수 있다(Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)).

[0197] 예시된 이중특이 항체는 2개의 상이한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이 항체는 제1 항원 C1q 및 혈액-뇌-장벽을 통한 수송을 용이하게 하는 제2 항원에 결합될 수 있다. 혈액-뇌-장벽을 통한 수송을 용이하게 하는 다수의 항원이 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, "Gabathuler R., Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 48-57" 참조). 이러한 제2 항원은 트랜스페린 수용체(TR), 인슐린 수용체(HIR), 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGFR), 저밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2(LPR-1 및 2), CRM197(디프테리아 독소의 비독성 돌연변이)을 포함하는 디프테리아 독소 수용체, TMEF 30(A)(플립파제)와 같은 라마 단일 도메인 항체, TAT와 같은 단백질 도입 도메인, Syn-B, 페너트라틴, 폴리-아르기닌 또는 일반적으로 양전하를 띤 펩티드, 및 ANG1005와 같은 안지오펙 펩티드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다(예를 들어, "Gabathuler, 2010" 참조).

[0198] 다가 항체

[0199] 일부 실시양태에서, 본원의 항체는 다가 항체를 포함한다. 다가 항체는 이 항체가 결합된 항원을 발현하는 세포에 의해 이가 항체보다 빠르게 흡수(및/또는 이화)될 수 있다. 본원의 항-C1q 항체 또는 이의 항체 단편은 3개 이상의 항원 결합 위치를 갖는 (IgM 클래스 이외의) 다가 항체(예를 들어, 4가 항체)일 수 있고, 이는 상기 항체의 폴리펩티드쇄를 코딩하는 핵산의 제조할 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 상기 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 위치를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다. 이 사나리오에서, 상기 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대한 3개 이상의 항원 결합 위치 아미노 말단을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 및 일부 실시양태에서는 4개의 항원 결합 부위를 함유한다. 다가 항체는 하나 이상의 폴리펩티드쇄 (및 일부 실시양태에서는 2개의 폴리펩티드쇄)를 함유하는데, 여기서 상기 폴리펩티드쇄 또는 쇠들은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 상기 폴리펩티드쇄 또는 쇠들은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ (여기서, $VD1$ 은 첫 번째 가변 도메인이고, $VD2$ 는 두 번째 가변 도메인이고, Fc 는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드쇄이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 유사하게, 상기 폴리펩티드쇄 또는 쇠들은 $V_H-C_H1-가요성 링커-V_H-C_H1-Fc$ 영역쇄 또는 $V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc$ 영역쇄를 포함할 수 있다. 본원의 다가 항체는 2개 이상 (및 일부 실시양태에서는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원의 다가 항체는, 예를 들어, 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려된 상기 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0200] 헤테로결합 항체

[0201] 헤테로결합 항체가 또한 본원의 범위 내에 있다. 헤테로결합 항체는 2개의 공유결합된 항체(예를 들어, 본원의 항-C1q 항체 또는 이의 항체 단편)로 이루어진다. 예를 들어, 헤테로결합된 항체 중 하나는 아비딘에 커플링된 것이고 다른 하나는 바이오틴에 커플링된 것일 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어, 원치않는 세포에 대한 표적 면역 시스템 세포로 제안되었고(미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염 치료에 사용되었다(국제 공보 WO 91/00360 및 WO 92/200373, 및 EP 0308936). 상기 항체는 가교결합제가 관여하는 방법을 포함한, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 제조할 수 있는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 면역독소는 다이설파이드 교반반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 생성시킴으로써 작성될 수 있다. 이를 위해 적합한 시약의 예는 이

미노티올레이트 및 메틸 4-머캅토부티르이미테이트와, 예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호에 기재된 것들이 포함된다. 헤테로결합 항체는 임의의 통상적인 가교결합법을 사용하여 만들 수 있다. 적합한 가교결합체는 당해 분야에 잘 알려져 있고, 다수의 가교결합 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 기재되어 있다.

[0202] 이펙터 기능 조작

[0203] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체를, 이펙터 기능을 개선시키고/시키거나 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 변형시키는 것이 또한 바람직하다. 예를 들어, 불변 영역상의 Fc 수용체 결합 위치를 특정한 Fc 수용체, 예를 들어, Fc γ RI, Fc γ RII 및/또는 Fc γ RIII에 대한 결합 친화도를 없애거나 감소시키기 위해 변형시키거나 돌연변이 처리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc 영역(예를 들어, IgG의 CH2 도메인에서)의 N-글리코실화를 제거함으로써 부여된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 PCT WO 99/58572 및 "Armour et al., *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000)"에 기재된 바와 같이 인간 IgG의 233-236, 297 및/또는 327-331과 같은 영역을 변형시킴으로써 부여된다.

[0204] 본원에 기재된 항-보체 항체의 불변 영역은 또한 변형되어 보체 활성화를 손상시킬 수 있다. 예를 들어, IgG 항체의 보체 활성화에 따른 보체의 C1 성분의 결합이 C1 결합 모티프(예를 들어, C1q 결합 모티프)에서의 불변 영역에서의 아미노산의 돌연변이화에 의해 감소될 수 있다. 인간 IgG1의 D270, K322, P329, P331 각각에 대한 Ala 돌연변이가 C1q에 대한 상기 항체의 결합 능력 및 보체 활성화를 현저히 저하시키는 것으로 보고되었다. 뮤린 IgG2b의 경우, C1q 결합 모티프는 잔기 E318, K320 및 K322를 구성한다(Idsogie et al. (2000) *J. Immunology* 164:4178-4184; Duncan et al. (1988) *Nature* 322: 738-740). 뮤린 IgG2b에 대해 동정된 C1s 결합 모티프 E318, K320 및 K322가 기타 항체 이소타입에 대해 공통인 것으로 여겨지기 때문에(Duncan et al. (1988) *Nature* 322:738-740), IgG2b에 대한 C1q 결합 활성은 3개의 특정화된 잔기 중 임의의 하나가 그 측쇄에 부적합한 관능기를 갖는 잔기로 대체됨으로써 없어질 수 있다. 이온성 잔기들만을 Ala로 대체하여 C1q 결합을 없앨 필요는 없다. 또한, C1s 결합을 없애기 위해, 다른 알킬-치환된 비이온성 잔기들, 예를 들어, Gly, Ile, Leu 또는 Val, 또는 방향족 비극성 잔기, 예를 들어, Phe, Tyr, Trp 및 Pro를 상기 3개의 잔기 중 임의의 하나 대신 사용할 수 있다. 또한, C1q 결합 활성을 없애기 위해, 극성 비이온성 잔기, 예를 들어, Ser, Thr, Cys 및 Met를 잔기 320 및 322 대신(318은 아님) 사용할 수도 있다. 또한, 보체 결합에 필수적인 Fc 영역의 탄수화물 변형의 제거는 보체 활성화를 예방할 수 있다. IgG 중쇄의 CH2 도메인상에서의 보존된 아스파라긴(Asn-297)의 글리코실화는 항체 이펙터 기능에 필수적이다(Jefferis et al. (1998) *Immunol Rev* 163:59-76). Fc 글리칸의 변형은 IgG 형태를 바꾸고, 보체 단백질 C1q와 실행 세포 수용체 FcR의 결합에 대한 Fc 친화도를 저하시킨다(Alhorn et al. (2008) *PLoS ONE* 2008;3:e1413). Fc 글리칸의 완전 제거는 CDC 및 ADCC를 없앤다. 데글리코실화(deglycosylation)는 글리코시다제 효소, 예를 들어, 다른 면역글로불린클래스 또는 기타 당단백에 대한 작용없이 모든 IgG 서브클래스의 중쇄상의 아스파라긴-결합된 글리칸을 선택적으로 분해하는 스트렙토코커스 파이오게네스(*streptococcus pyogenes*)의 유전자 엔도에스(endoS)에 의해 코딩된 108kDa 효소인 엔도글리코시다제 S(EndoS)를 사용하여 수행할 수 있다(Collin et al. (2001) *EMBO J* 2001;20:3046-3055).

[0205] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어, 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이, 구제(salvage) 수용체 결합 에피토프를 상기 항체(특히 항체 단편)에 도입할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "구제 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 생체내 혈청 반감기를 증가시킬 책임이 있는 상기 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0206] 기타 아미노산 서열 변형

[0207] 본원의 인간화 항-C1q 항체 또는 이의 항체 단편의 아미노산 서열 변형이 또한 포함된다. 예를 들어, 상기 항체 또는 항체 단편의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 상기 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산에 적합한 뉴클레오타이드 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 상기 항체 또는 항체 단편의 아미노산 서열 변이체를 제조한다. 이러한 변형은, 예를 들어, 상기 항체의 아미노산 서열내의 잔기로부터의 제거 및/또는 잔기의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 임의 조합의 제거, 삽입 및 치환으로 최종 구축물(construct)에 도달하고, 단 최종 구축물은 바람직한 특성(즉, 본원의 C1q에 결합하거나 이와 물리적으로 상호작용하는 능력)을 갖는다. 아미노산 변경은 또한 상기 항체의 번역후 과정, 예를 들어, 글리코실화 부위의 수 또는 부위의 변경을 바꿀 수 있다.

[0208] 돌연변이에 대한 바람직한 위치인, 상기 항-C1q 항체의 특정 잔기 또는 영역의 동정을 위한 유용한 방법은 "Cunningham and Wells in *Science*, 244:1081-1085 (1989)"에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이법"이

라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기 그룹은 동정되고(예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu과 같은 하전된 잔기) 전하를 띠지 않거나 음전하를 갖는 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 상기 아미노산과 표적 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 이어서 치환 위치에 또는 치환을 위해 추가 변이체 또는 기타 변이체를 도입함으로써 치환에 대한 기능적 감도를 나타내는 아미노산 위치가 개선된다. 따라서, 아미노산 서열 변이체 도입을 위한 부위는 미리 결정되는 반면, 돌연변이 자체의 특성은 미리 결정될 필요가 없다. 예를 들어, 제시된 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이가 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 발현된 항체 변이체는 바람직한 활성에 대해 선별된다.

[0209] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노("N") 및 카복시("C") 말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 서열의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드로의 상기 항체의 N- 또는 C-말단의 융합을 포함한다.

[0210] 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 다른 잔기로 대체된, 항체 분자 중의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이를 위해 가장 흥미로운 부위는 초가변 영역을 포함하나, FR 변경도 포함된다. 보존적 치환은 하기 표 A에 "예시적 치환"의 제목하에 나타낸다. 이러한 치환이 생물학적 활성을 변경시키면, 표 A에 "바람직한 치환"으로 명명되거나 아미노산클래스에 대해 아래에 추가로 기재된 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고 생성물이 선별된다.

[0211] 표 A: 아미노산 치환

본래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0212] 상기 항체의 생물학적 특성의 실질적 변형은 (a) 치환 면적에서의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들어, 시트 또는 나선 구조, (b) 표적 위치에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지시키는 영향면에서 현저히 상이한 치환을 선택함으로써 수행된다. 자연 발생 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 다음 그룹으로 나뉜다:

[0214] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0215] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0216] (3) 산성: asp, glu;

[0217] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0218] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0219] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

- [0220] 비-보존적 치환은 상기 클래스들 중 어느 정도의 것을 다른 클래스로 교환하는 것을 수반한다.
- [0221] 상기 항체의 적합한 구조를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스템인 잔기는 또한 상기 분자의 산화 안정성을 개선시키고 이상(aberrant) 가교결합을 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 항체의 안정성 개선을 위해 시스템인 결합(들)이 항체에 첨가될 수 있다(특히 상기 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).
- [0222] 일부 실시양태에서, 치환 변이체는 모 항체의 하나 이상의 추가변 영역 잔기의 치환을 포함한다(예를 들어, 인간화 또는 인간 항-C1q 항체). 일반적으로, 추가 형성을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성된 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성하기 위한 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙을 포함한다. 간단히 말하면, 일부 추가변 영역 잔기(예를 들어, 6 내지 7개의 부위)를 돌연변이시켜 각각의 위치에서의 모든 가능한 아미노 치환을 생성한다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각 필라멘트성 파지 입자내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 용합물로서 상기 필라멘트성 파지 입자로부터 1가 방식으로 나타난다. 이어서, 파지 디스플레이된 변이체는 본원에 기재된 바와 같이 그들의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)으로 선별된다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 동정하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이를 수행하여 항원 결합에 현저히 공헌한 추가변 영역 잔기를 동정할 수 있다. 그렇지 않으면, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원(예를 들어, 본원의 C1q 단백질) 사이의 접촉점을 동정하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접한 잔기가 본원에서 검토된 기술에 따른 치환용 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생산되면, 변이체의 패널(panel)을 본원에 기재된 바와 같이 선별하고 하나 이상의 관련 측정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.
- [0223] 상기 항체의 아미노산 변이체의 다른 유형은 상기 항체의 본래의 글리코실화 패턴을 변경한다. 변경이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가를 의미한다.
- [0224] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-링크되거나 O-링크된 것이다. N-링크된 것이란 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 결합된 것을 말한다. 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌의 트리펩티드 서열(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 잔기의 아스파라긴 측쇄로의 효소적 결합에 대한 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 중의 이들 트리펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-링크된 글리코실화는 당인 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토스 또는 자일로스 중의 하나를 하이드록시아미노산(비록 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용될 수 있지만), 가장 흔히는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 말한다.
- [0225] 항체로의 글리코실화 부위의 추가는, 아미노산 서열이 (N-링크된 글리코실화 부위에 대해) 하나 이상의 상기한 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 수행한다. 상기 변경은 또한 (O-링크된 글리코실화 부위에 대해) 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래 항체의 서열에 첨가하거나 상기 잔기로 치환함으로써 이를 수 있다.
- [0226] 항-IgE 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산은 당해 분야에 공지된 여러 가지 방법으로 제조할 수 있다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 분리(자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개된 (또는 부위 특이적) 돌연변이, PCR 돌연변이, 및 항체(예를 들어, 본원의 항-C1q 항체) 또는 항체 단편의 미리 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 카세트 돌연변이를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0227] 기타 항체 변형
- [0228] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체 또는 이의 항체 단편은 당해 분야에 알려져 있고 쉽게 이용가능한 추가의 비-단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 유도체화에 적합한 잔기는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 이의 수중 안정성으로 인해 제조에 유리하다. 상기 중합체는 어떠한 분자량이어도 되고 측쇄 또는 비측쇄일 수 있다. 상기 항체에 결합된 중합체의 수는 변할 수 있고, 하나 이상의 중합체가 결합하는 경우, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반

적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 변형되는 항체의 특별한 특성 또는 기능, 항체가 한정된 조건하에 치료에 사용될지의 여부 등을 포함한 고려사항에 기초해 결정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 기술 및 기타 적합한 제제들이 "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)"에 기재되어 있다.

[0229] **핵산, 벡터 및 숙주 세포**

[0230] 본원의 인간화 항-C1q 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 방법 및 조성을 사용하여 생산할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원의 임의의 항-C1q 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 분리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 상기 항-C1q 항체의 VL을 함유하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 함유하는 아미노산 서열(예를 들어, 상기 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 핵산을 함유하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 핵산을 함유하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 (1) 상기 항체의 VL을 함유하는 아미노산 서열 및 상기 항체의 VH를 함유하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 함유 벡터, 또는 (2) 상기 항체의 VL을 함유하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 함유 제1 벡터 및 상기 항체의 VH를 함유하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 함유 제2 벡터를 함유한다(예를 들어, 상기 (1) 또는 (2)가 형질도입된다). 일부 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 진핵세포, 예를 들어, 중국햄스터난소(CHO) 세포 또는 림프구양세포(lymphoid cell)(예: Y0, NS0, Sp20 세포)이다.

[0231] 본원의 항-C1q 항체의 제조방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 항체 발현에 적합한 조건하에서 상기 항-C1q 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 본원의 숙주 세포의 배양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 후속적으로 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배지)로부터 회수된다.

[0232] 본원의 인간화 항-C1q 항체의 재조합 생산을 위해, 상기 항-C1q 항체를 코딩하는 핵산을 분리하고 숙주 세포 내에서의 추가 클로닝(cloning) 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터내로 삽입한다. 이러한 핵산은 쉽게 분리될 수 있고 통상의 절차를 사용하여(예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 서열화할 수 있다.

[0233] 본원의 임의의 항-C1q 항체를 코딩하는 핵산 서열 또는 이의 단편인 본원에 기재된 (항체를 포함하는) 폴리펩티드를 함유하는 적합한 벡터는 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 클로닝 벡터는 표준 기술에 따라 작성될 수 있거나, 당해 분야에서 이용가능한 다수의 클로닝 벡터로부터 선택될 수 있다. 선택된 클로닝 벡터는 사용하고자 하는 숙주 세포에 따라 달라질 수 있는 반면, 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자가복제능력을 갖고 특정한 제한 엔도뉴클레아제에 대한 단일 표적을 가질 수 있고/있거나 상기 벡터를 함유하는 클론을 선택하는 데 사용될 수 있는 마커에 대한 유전자를 가지고 있을 수 있다. 적합한 예는 플라스미드 및 세균 바이러스, 예를 들어, pUC18, pUC19, 블루스크립트(Bluescript)(예: pBS SK+) 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 pSA3 및 pAT28과 같은 셔틀 벡터(shuttle vector)를 포함한다. 이들 및 다수의 기타 클로닝 벡터는 바이오라드(BioRad), 스트레이트진(Stratagene) 및 인비트로젠(Invitrogen)과 같은 판매업자로부터 구입가능하다.

[0234] 발현 벡터는 일반적으로 본원의 핵산을 함유하는 복제가능한 폴리뉴클레오타이드 구조이다. 발현 벡터는 예피솜 또는 염색체 DNA의 구성요소로서 숙주 세포 내에서 복제가능하다. 적합한 발현 벡터는 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 코스미드를 포함하는 바이러스 벡터, 및 PCT 공보 W087/04462에 기재되어 있는 발현 벡터(들)가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 시그널 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 적합한 전사 제어 요소(예: 프로모터, 인핸서 및 터미네이터). 발현(예를 들어, 번역)을 위해, 리보솜 결합 부위, 번역개시 부위 및 정지 코돈과 같은 하나 이상의 번역 제어 요소가 또한 통상 필요하다.

[0235] 흥미있는 핵산을 함유하는 벡터를 전기천공; 염화칼슘, 염화루비듐, 인산칼슘, DEAE-덱스트란 또는 기타 물질을 사용한 형질감염; 미세투과물 충격(microprojectile bombardment); 리포펙션(lipofection); 및 감염(예를 들어, 벡터가 우두바이러스와 같은 감염제인 경우)을 포함하는 다수의 임의의 적합한 수단을 사용하여 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드의 도입의 선택은 종종 숙주 세포의 특징에 좌우될 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 본원의 항-C1q 항체를 코딩하는 하나 이상의 아미노산 서열을 함유하는 핵산을 함유한다.

[0236] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 예를

들어, 본원의 항-C1q 항체는 세균 내에서, 특히 글리코실화 및 Fc 실행 기능이 필요하지 않은 경우 생산될 수 있다. 세균 내에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어, *E. coli*의 항체 단편의 발현을 기재하고 있는 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호 및 제5,840,523호, 및 "Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254"을 참조한다. 발현 후, 상기 항체는 가용성 분획 내의 세균 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다.

[0237] 원핵생물 이외에도, 사상 진균류 또는 효모와 같은 진핵생물 미생물은 또한, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 있어 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체 생산을 초래하는 진균류 또는 효모 균주를 포함하는, 항체-코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다(예를 들어, "Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)" 및 "Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)").

[0238] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 생물(무척추동물 또는 척추동물)로부터 유도될 수 있다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해 사용될 수 있는 다수의 바클로바이러스 균주(baculoviral strain)가 확인되었다. 식물 세포 배지가 또한 숙주로서 사용될 수 있다(예를 들어, 트랜스제닉 식물에서의 항체 생산을 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 기재하고 있는 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호 및 제6,417,429호).

[0239] 척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서의 성장에 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)로 변형된 원숭이 신장 CV1주; 인간 배아 신장주(293 또는 293 세포가, 예를 들어, "Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)"에 기재되어 있음), 새끼 햄스터 신장 세포(baby hamster kidney: BHK); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포(예를 들어, "Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)에 기재된 것과 같은 TM4); 원숭이 신장 CV1주; 아프리카 사바나원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유방 종양(MMT 060562); 예를 들어, "Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)"에 기재된 것과 같은 TRI 세포' MRC 5 세포, 및 FS4 세포이다. 기타 유용한 포유동물 세포주는 DHFR-CHO 세포를 포함하는 중국햄스터난소(CHO) 세포(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), 및 Y0, NS0 및 Sp2/0와 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정한 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어, "Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)"을 참조한다.

[0240] **약제학적 조성물**

[0241] 본원의 인간화 항-C1q 항체는 이 항체가 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 합쳐져 치료학적 용도를 위한 여러가지의 제형으로(예를 들어, 투여에 의해) 또는 (예를 들어, 신경퇴행성 질환 또는 자가면역 질환의 치료 또는 예방용의) 약제의 제조에 도입될 수 있고, 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 제제의 예는 정제, 캡슐제, 산제(powders), 입제(granules), 연고제, 용액제, 현탁액제, 주사제, 흡입제, 겔제, 미소구제 및 에어로졸제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 약제학적 조성물은 목적인 제제에 따라 동물 또는 인간 투여용의 약제학적 조성물을 제형화하는 데 통상 사용되는 비히클인 희석제의 약제학적으로 허용되는 비독성 담체를 포함할 수 있다. 희석제는 배합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 완충수, 생리식염수, PBS, 링거 용액(Ringer's solution), 텍스트로스 용액 및 헹크 용액(Hank's solution)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본원의 약제학적 조성물 또는 제제는 기타 담체, 보조제, 또는 비독성, 비치료학적, 비면역원성 안정제, 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 또한 생리학적 조건에 근사하게 하는 추가의 물질, 예를 들어, pH 조절제, 완충제, 독성 조절제, 습윤제 및 세제를 포함할 수 있다.

[0242] 본원의 약제학적 조성물은 또한, 예를 들어, 항산화제와 같은 임의의 다양한 안정화제를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물이 폴리펩티드를 포함하는 경우, 상기 폴리펩티드는 이의 생체내 안정성을 개선시키거나, 그렇지 않으면 이의 약리학적 특성을 개선시키는(예를 들어, 상기 폴리펩티드의 반감기를 개선시키고, 이의 독성을 저하시키고 용해도나 흡수도를 개선시키는) 다양한 잘 알려진 화합물과 착화될 수 있다. 이러한 변형 또는 착화제의 예는 셀레이트, 글루코네이트, 시트레이트 및 포스페이트를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 조성물의 폴리펩티드는 또한 이의 생체내 속성을 개선시키는 분자와 착화될 수 있다. 이러한 분자는 탄수화물, 폴리아민, 아미노산, 기타 펩티드, 이온(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 망간) 및 지방을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0243] 다양한 유형의 투여에 적합한 제제의 추가 예는 "Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)"에서 찾을 수 있다. 약물 전달 방법의 간단한 검토를 위해 "Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990)"을 참조한다.
- [0244] 경구 투여를 위해, 활성 성분을 고체 투여형, 예를 들어, 캡슐제, 정제 및 산제, 또는 액체 투여형, 예를 들어, 엘릭시르제, 시럽제 및 현탁액제로 투여할 수 있다. 활성 성분(들)은 불활성 성분 및 분말화된 담체, 예를 들어, 글루코스, 락토스, 수크로스, 만니톨, 전분, 셀룰로스 또는 셀룰로스 유도체, 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 나트륨 사카린, 활석, 탄산마그네슘을 함께 젤라틴 캡슐 속에 캡슐화할 수 있다. 목적인 색상, 맛, 안정성, 완충능, 분산 또는 기타 공지된 목적인 특성을 제공하기 위해 첨가할 수 있는 추가의 비활성 성분의 예는 벵갈라(red iron oxide), 실리카겔, 나트륨 라우릴 설페이트, 이산화티탄, 및 식용 화이트 잉크이다. 압축 정제를 만들기 위해 유사한 희석제를 사용할 수 있다. 정제 및 캡슐제 둘 다 수 시간에 걸친 약제의 연속 방출의 제공을 위한 지연 방출 제품으로서 제조할 수 있다. 압축 정제는 임의의 불쾌한 맛을 차폐하고 정제를 대기로부터 보호하기 위해 당 또는 필름으로 코팅될 수 있고, 또는 소화관에서의 선택적 분해를 위해 장 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 투여형은 환자의 수용성을 증가시키기 위해 색상 및 향미를 함유할 수 있다.
- [0245] 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 세균 발육 저지제, 및 제제를 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성, 등장성 무균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 살균 현탁액을 포함한다.
- [0246] 상기 약제학적 조성물을 제형화하는 데 사용되는 성분은 바람직하게는 고순도이고 사실상 잠재적으로 유해한 오염물질을 함유하지 않는다(예를 들어, 적어도 NF(National Food) 등급, 일반적으로 적어도 분석적 등급, 보다 전형적으로 적어도 약제학적 등급). 또한, 생체내 용도용 조성물은 보통 무균이다. 제공된 화합물을 사용 전에 합성해야 할 정도로, 생성된 생성물은 전형적으로 합성 또는 정제 과정 동안 존재할 수 있는 임의의 잠재적 독성 제제, 특히 임의의 내독소를 사실상 함유하지 않는다. 비경구 투여용 조성물은 또한 무균이고, 사실상 등장성이며 GMP 조건하에 제조된다.
- [0247] 제제는 뇌 또는 중추 신경계 내에 보유하고 안정화되기에 최적일 수 있다. 제제가 두개 구역(cranial compartment)으로 투여되는 경우, 제제는 구역 내에 보유하고 혈액 뇌 장벽으로 확산되거나 통과하지 않는 것이 바람직하다. 분자량 증가를 위한 안정화 기술은 가교결합, 다량체화, 또는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아크릴아미드, 중성 단백질 담체 등과 같은 그룹으로의 결합을 포함한다.
- [0248] 보유력을 증가시키기 위한 기타 전략은 본원의 인간화 항-C1q 항체와 같은 항체를 생분해성 임플란트(biodegradable or bioerodible implant)에 구속(entrapment)시키는 것을 포함한다. 치료학적 활성제의 방출 속도는 중합체 매트릭스를 통한 이동 속도 및 임플란트의 생분해에 의해 조절된다. 중합체 장벽을 통한 약제의 이동은 또한 화합물 안정성, 중합체 친수성, 중합체 가교결합 정도, 약제가 중합체 장벽을 보다 잘 투과할 수 있도록 하는 물 흡수시의 중합체의 팽창, 임플란트의 기하학적 구조 등에 의해 영향을 받는다. 임플란트는 이식 위치로 선택된 크기 및 형태에 상응하는 치수의 것이다. 임플란트는 입자, 시트, 패치, 플라크, 섬유, 미세캡슐 등일 수 있고, 선택된 삽입 위치에 맞는 임의의 크기 또는 형태일 수 있다.
- [0249] 임플란트는, 예를 들어, 중합체 매트릭스를 통해 균질하게 분포되어 있거나 캡슐화되어 있는(활성제 저장소가 중합체 매트릭스에 의해 캡슐화되어 있다), 활성제를 포함하는 모노리식(monolithic)일 수 있다. 사용될 중합체 조성물의 선택은 투여 위치, 목적인 치료 기간, 환자 수용성, 치료될 질환의 성질 등에 따라 달라질 것이다. 중합체의 특성은 이식 위치에서의 생분해성, 흥미로운 약제와의 상용성, 캡슐화의 용이성, 생리학적 환경에서의 반감기를 포함할 것이다.
- [0250] 사용될 생분해성 중합체 조성물은, 분해되는 경우, 단량체를 포함한 생리학적으로 허용되는 분해 산물을 생성시키는 유기 에스테르 또는 에테르일 수 있다. 무수물, 아마이드, 오르토에스테르 등은 그 자체로 또는 다른 단량체와의 조합으로 사용될 수 있다. 상기 중합체는 축합 중합체일 수 있다. 상기 중합체는 가교결합된 것이거나 가교결합되지 않은 것일 수 있다. 특히 흥미로운 것은 단독중합체 또는 공중합체인 하이드록시 지방족 카복실산, 및 다당류의 중합체이다. 흥미로운 중합체에는 D-락트산, L-락트산, 라세믹 락트산, 글리콜산, 폴리카프로락톤 및 이의 조합이 포함된다. L-락테이트 또는 D-락테이트를 사용함으로써, 중합체의 느린 생분해가 달성되는데, 사실상 분해는 라세메이트에 의해 증진된다. 글리콜산과 락트산의 공중합체가 특히 흥미로운데, 생분해 속도는 락트산에 대한 글리콜산의 비율에 의해 조절된다. 가장 신속히 분해되는 공중합체는 대략 동량의 글리콜산과 락트산을 갖는데, 단독중합체가 분해에 대해 보다 저항적이다. 락트산에 대한 글리콜산의 비율은 또한 임플란트의 취성에 영향을 미치는데, 보다 유연한 임플란트가 보다 큰 기하학적 구조를 위해 바람직하다. 흥미로운 다당류

는 칼슘 알지네이트, 및 관능화된 셀룰로스, 특히 수용성이며 분자량이 약 5kD 내지 500kD인 것이 특징인 카복시메틸셀룰로스 에스테르 등이다. 생분해성 하이드로겔이 또한 본원의 임플란트에 사용될 수 있다. 하이드로겔은 전형적으로 액체를 흡수하는 능력이 특징인 공중합체 물질이다. 사용될 수 있는 생분해성 하이드로겔의 예는 "Heller in: Hydrogels in Medicine and Pharmacy, N. A. Peppes ed., Vol. III, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, pp 137-149"에 기재되어 있다.

[0251] 약제학적 투여량

[0252] 본원의 인간화 항-C1q 항체를 함유하는 본원의 약제학적 조성물은 볼러스(bolus)로서의 정맥내 투여와 같은 공지된 방법에 따라, 또는 일정 기간에 걸친 연속 투입, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 두개내, 피하, 관절내, 활막내(intrasynovial), 수막내(intrathecal), 경구, 국소 또는 흡입 경로로 사용될 수 있다(예를 들어, 치료가 필요한 개체, 예를 들어, 인간 개체에 항-C1q 항체 투여).

[0253] 본원의 약제학적 조성물의 투여량 및 목적인 약제 농도는 구상된 특정 용도에 따라 달라질 수 있다. 적합한 투여량 또는 투여 경로의 결정은 통상의 기술자의 기술내에 있다. 동물 실험은 인간 치료를 위해 효과적인 용량 결정에 믿을 수 있는 가이드라인을 제공한다. 효과적인 용량의 중간 조절은 "Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46"에 기재된 원리에 따라 수행할 수 있다.

[0254] 본원의 임의의 인간화 항-C1q 항체의 생체내 투여를 위해, 통상의 투여량은 투여 경로에 따라 1일당 개체의 체중 1kg당 약 10ng 내지 100mg 또는 그 이상으로 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 약 1mg/kg/일 내지 약 10mg/kg/일이다. 7일 또는 그 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 치료될 질환, 장애 또는 병태의 중증도에 따라, 증상의 목적인 약제가 성취될때까지 치료를 지속한다.

[0255] 예시적 투여 용법은 인간화 항-C1q 항체를 약 2mg/kg의 초기 용량으로 투여한 후, 약 1mg/kg의 일주간 유지 용량으로 격주로 투여함을 포함한다. 기타 투여 용법이 내과가가 성취하고자 하는 약물동력학 붕괴(decay) 패턴에 따라 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주에 1회 내지 21회의 개체 투여가 본원에 포함된다. 특정 실시양태에서, 약 3 μ g/kg 내지 약 2mg/kg의 용량 범위(예를 들어, 약 3 μ g/kg, 약 10 μ g/kg, 약 30 μ g/kg, 약 100 μ g/kg, 약 300 μ g/kg, 약 1mg/kg 또는 약 2mg/kg)가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 빈도는 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 격일로 1회, 매주 1회, 2주에 1회, 4주에 1회, 5주에 1회, 6주에 1회, 7주에 1회, 8주에 1회, 9주에 1회, 10주에 1회, 또는 매달 1회, 2달에 1회, 3달에 1회, 또는 그 이상이다. 치료의 진전은 통상의 기술과 측정으로 쉽게 모니터링한다. 인간화 항-C1q 항체 투여를 포함한 투여 용법은 사용된 용량과는 독립적으로 기간에 걸쳐 달라질 수 있다.

[0256] 특정 인간화 항-C1q 항체의 투여량은 상기 인간화 항-C1q 항체를 1회 이상 투여받은 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 개체는 상기 인간화 항-C1q 항체의 증분 용량을 투여받는다. 인간화 항-C1q 항체의 효능을 분석하기 위해, 신경퇴행성 장애, 염증성 장애 또는 자가면역 장애의 임의의 임상적 증상을 모니터링할 수 있다.

[0257] 본원의 인간화 항-C1q 항체의 투여는, 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태에 따라, 투여 목적이 치료용인지 예방용인지에 따라, 또한 숙련된 의사에게 알려진 기타 요인에 따라 연속적이거나 간헐적일 수 있다. 인간화 항-C1q 항체의 투여는 미리 선택된 기간에 걸쳐 필수적으로 연속적이거나 일련의 간격을 둔 투여일 수 있다.

[0258] 특정 투여량 및 전달 방법에 관한 가이드라인은 문헌에, 예를 들어, 미국 특허 제4,657,760호, 제5,206,344호 또는 제5,225,212호에 제공되어 있다. 상이한 제제가 상이한 치료 및 상이한 장애에 효과적일 것이고 특정 기관 또는 조직을 치료하고자 하는 투여가 상이와는 상이한 방식으로 다른 기관 또는 조직으로의 전달에 필요할 수 있음은 본원의 범위 내에 있다. 또한, 투여량은 1회 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 투입에 의해 투여될 수 있다. 수 일 또는 그 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 상태에 따라, 질환 증상의 목적인 약제가 일어날 때까지 치료가 지속된다. 그러나, 기타 투여량 용법이 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상의 기술 및 측정에 의해 쉽게 모니터링될 수 있다.

[0259] 치료 용도

[0260] 본원은 인간화 항-C1q 항체, 및 C1q에 결합하고 이의 생물학적 활성을 중화시킬 수 있는 상기 항체의 항원-결합 단편을 제공한다. 이들 인간화 항-C1q 항체는 신경퇴행성 장애, 염증성 장애 및 자가면역 장애를 포함하나 이에 한정되지 않는 보체 활성화와 관련된 질환 범위를 예방하거나 위험을 줄이거나 치료하는 데 유용하다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같이, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 개체에서의 신경퇴행성 장애, 염증성 장애 및 자가면역 장애를 포함하나 이에 한정되지 않는 보체 활성화와 관련된 질환을 치료하거나 예방하거나 위험을 줄이는 데 유

용하다. 일부 실시양태에서, 개체는 이러한 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0261] 본원의 인간화 항-C1q 항체로 치료될 수 있는 신경퇴행성 장애는 CF1-의존적 시냅스 소실을 포함한, 신경 연결 또는 시냅스의 소실과 관련된 질환을 포함한다. 이러한 장애는 알츠하이머병, 근위축측삭경화증, 다발성 경화증, 녹내장, 근긴장성 이영양증, 갈랑-바레 증후군(GBS), 중증 근무력증, 수포성 유천포창, 척수성 근위축증, 다운증후군, 파킨슨병 및 헌팅턴병을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 신경퇴행성 장애에서, 시냅스 소실은 보체 수용체 3(CR3)/C3 또는 보체 수용체 CR1에 좌우된다. 일부 신경퇴행성 장애에서, 시냅스 소실은 병리학적 활성화-의존적 시냅스 가지치기와 관련된다. 일부 장애에서, 시냅스는 미세아교세포에 의해 식작용 처리된다(phagocytosed). 따라서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 본원의 신경퇴행성 장애의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원은, 본원의 인간화 항-C1q 항체를, 예를 들어, C1q와 항강글리오사이드 자가항체와 같은 자가항체간의 상호작용, C1q와 C1r의 상호작용 및/또는 C1q와 C1s의 상호작용을 억제하기 위해 투여함으로써, 본원의 신경퇴행성 장애를 갖는 개체에서의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0262] 본원의 인간화 항-C1q 항체로 치료될 수 있는 염증성 또는 자가면역 질환은 류마티스성 관절염(RA), 급성 호흡곤란증후군(ARDS), 허혈 및 재관류 후 원격 조직 손상, 심폐우회술 동안의 보체 활성화, 피부근염, 천포창, 루푸스신염 및 이로 인한 사구체신염과 혈관염, 심폐우회술, 심장마비-유도된 심장 내피 부전, 타입 II 막증식 사구체신염, IgA 신장병, 급성 신부전, 저온글로불린증, 항인지질증후군, 만성 개방각 녹내장, 급성 폐쇄각 녹내장, 황반변성질환, 연령 관련 황반변성(AMD), (AMD-습성), 지도모양 위축성 맥락막혈관신생(CNV), 포도막염, 당뇨병망막병증, 허혈 관련 당뇨병망막병증, 안구내염, 안구내 혈관신생질환, 당뇨황반부종, 병리학적 근시, 폰히펠-린다우병(von Hippel-Lindau disease), 눈의 히스토플라스마증, 시신경 척수염(NMO), 망막중심정맥폐쇄(CRVO), 각막혈관신생, 망막혈관신생, 레베르의 유전성 시신경병증, 시신경염, 베체트 망막증, 허혈성 시신경병증, 망막혈관염, ANCA 혈관염, 푸르처 망막병증, 쇼그렌 안구 건조증, AMD 건성증, 유육종증, 일시적인 동맥염, 결절성 다발 동맥염, 다발성 경화증, 뿐만 아니라 동종이식, 초급성 거부반응, 혈액투석, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 천식 및 흡인폐렴을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 중증근육무력증, 당뇨병 타입 1, 하시모토 갑상선염, 애디슨병, 셀리아병, 크론병, 악성빈혈, 심상성 천포창, 백반증, 자가면역 용혈빈혈, 부종양증후군, 혈관염, 저보체혈성 두드러기성 혈관염(HUV), 류마티스성 다발성근육통, 관자동맥염 및 베게너 육아종을 추가로 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0263] 시신경 척수염(NMO)과 같은 자가면역 질환에서, 자가항체가 보체 시스템을 활성화시킨다. NMO 환자에서, AQP4-표적화된 자가항체와 같은 자가항체의 이의 항원 AQP4로의 결합에 의해 고전적인 보체 경로가 촉발된다. 이에 의해 AQP4는 보체 활성화의 고전적 경로를 활성화한다. 이 활성화 과정의 첫 번째 단계에서, 보체 인자 C1q는 자가항체-자가항원-면역 복합체에 결합한다. 자가항체는 NMO 환자로부터의 혈청 항체(통상 NMO-IgG로 지칭됨)와 같은 자연 발생 항체, 또는 rAb-53과 같은 단일클론 항체를 포함할 수 있다.

[0264] 따라서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 본원의 감염성 또는 자가면역 질환의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원은, 본원의 인간화 항-C1q 항체를, 예를 들어, C1q와 자가항체간의 상호작용, C1q와 C1r의 상호작용 및/또는 C1q와 C1s의 상호작용을 억제하기 위해 투여함으로써, 본원의 감염성 또는 자가면역 질환을 갖는 개체에서의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0265] 본원의 인간화 항-C1q 항체로 치료할 수 있는 대사 장애는 타입 II 당뇨병과 같은 당뇨병, 및 비만을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 인간화 항-C1q 항체의 시험에 사용될 수 있는 대사 장애의 시험관내 및 생체내 모델은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 따라서, 본원의 인간화 항-C1q 항체가 본원의 대사 장애의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원은, 본원의 인간화 항-C1q 항체를, 예를 들어, C1q와 항강글리오사이드 자가항체와 같은 자가항체간의 상호작용, C1q와 C1r의 상호작용 및/또는 C1q와 C1s의 상호작용을 억제하기 위해 투여함으로써, 본원의 대사 장애를 갖는 개체에서의 하나 이상의 증상을 치료하거나 예방하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0266] 병용 치료

[0267] 본원의 항체를 신경퇴행성 장애, 염증성 장애 및/또는 자가면역 장애의 임의의 추가 치료제와 조합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0268] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 치료학적 유효량으로 항-C1s 또는 항-C1r 항체와 같은 제2 항

-보체 인자 항체(예를 들어, 중화 항-보체 인자 항체) 또는 제2 항-C1q 항체와 조합되어 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는, 치료학적 유효량으로 제2 항-C1q 항체, 항-C1s 항체 및/또는 항-C1r 항체와 같은 제2 및 제3 중화 항-보체 인자 항체와 함께 투여된다.

[0269] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC) 억제제와 조합되어 투여된다. ADCC 억제제는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C를 인지하는 킬러세포 Ig-유사 수용체(KIR), 및 HLA-E(예를 들어, "Lopez-Botet M., T. Bellon, M. Llano, F. Navarro, P. Garcia & M. de Miguel. (2000), Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* **61**: 7-17"; "Lanier L.L. (1998) Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* **92**: 705-707" 참조) 및 카드뮴(예를 들어, "Immunopharmacology 1990; Volume 20, Pages 73-8" 참조)을 인지하는 CD94/NKG2A 헤테로다이머와 같은 가용성 NK 세포 억제 수용체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0270] 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 보체 활성화의 대안적 경로의 억제제와 조합되어 투여된다. 이러한 억제제는 인자 B 차단 항체, 인자 D 차단 항체; CD59, DAF, CR1 CR2, Crry, 또는 SB 290157과 같은 C3, 비-펩티드 C3aR 길항제의 분리를 차단하는 콤스타틴(Comstatin)-유사 펩티드의 가요성, 막-결합된, 표지되거나 용해된 단백질 형태; 코브라 독 인자, 또는 나파모스타트 메실레이트(FUTHAN; FUT-175), 아프로티닌, K-76 모노 카복실산(MX-1) 및 헤파린과 같은 비-특이적 보체 억제제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다(예를 들어, "T.E. Mollnes & M. Kirschfink, *Molecular Immunology* 43 (2006) 107-121" 참조). 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체는 자가항체와 이의 항원간의 상호작용의 억제제와 조합되어 투여된다. 이러한 억제제는 자가항원, 또는 AQP4 항원의 구조적 유사체(minotope)를 포함한 펩티드 또는 RNA-유도된 구조적 유사체의 항원 모방체(mimetics)의 정제된 가용성 형태를 포함할 수 있다. 다르게는, 이러한 억제제는 자가항원을 인지하고 고전적인 보체 경로를 촉발시키지 않으면서 자가항체의 결합을 방지하는 차단제를 포함할 수 있다. 이러한 차단제는, 예를 들어, 자가항원-결합 RNA 앵타머(aptamer) 또는 Fc 도메인에 기능적 C1q 결합 위치가 결합된 항체(예를 들어, Fab 단편, 또는 그렇지 않으면 C1q에 결합되도록 만들어진 항체)를 포함할 수 있다.

[0271] **진단 용도**

[0272] 본원의 인간화 항-C1q 항체 또는 이의 기능적 단편은 또한 진단 용도를 갖는다. 그러므로, 본원은 개체 또는 개체로부터 유도된 조직 샘플에서의 C1q의 검출과 같은 진단 목적을 위한 본원의 항체 또는 이의 기능적 단편의 사용방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 상기 개체는 신경퇴행성 장애, 또는 감염성 또는 자가면역 질환을 앓고 있는 인간이다. 일부 실시양태에서, 본원의 인간화 항-C1q 항체가 시냅스 및 시냅스 소실을 검출하는 데 사용된다. 예를 들어, 시냅스 소실은 알츠하이머 질환 또는 녹내장과 같은 신경퇴행성 장애를 앓고 있는 개체에서 측정될 수 있다.

[0273] 일부 실시양태에서, 진단방법은 본원의 항-C1q 항체 또는 이의 기능적 단편을 개체에 투여하는 단계, 및 상기 개체의 시냅스에 결합된 항체를 검출하는 단계를 포함한다. 시냅스로의 항체-결합은, 예를 들어, 양전자방출단층촬영(PET), X-선 컴퓨터 단층촬영, 단일광자방출단층촬영(SPECT), 컴퓨터 단층촬영(CT) 및 컴퓨터 축 단층촬영(CAT)과 같은 비외과적 기술에 의해 정량화될 수 있다.

[0274] 일부 실시양태에서, 진단방법은 생검 시료, 조직 또는 세포와 같은 생물학적 샘플에서의 시냅스의 검출을 포함한다. 인간화 항-C1q 항체 또는 이의 기능적 단편이 상기 생물학적 샘플과 접촉되고 시냅스-결합된 항체가 검출된다. 검출방법은 시냅스-결합된 항체의 정량화를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플에서의 항체 검출은 면역형광 현미경검사, 면역세포화학, 면역조직화학, ELISA, FACS 분석, 면역 침전 또는 미세양전자방출 단층촬영을 포함한 당해 분야에 알려진 임의의 방법으로 수행할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 예를 들어 ¹⁸F로 방사성 표지되고 이어서 마이크로-양전자방출 단층촬영 분석을 이용하여 검출된다.

[0275] 시냅스-결합된 항체의 정량화는 개체에 존재하는 시냅스의 수의 상대적 척도를 제공한다. 전형적으로, 시냅스는 일정 기간에 걸쳐 반복적으로 정량화된다. 시냅스 정량화의 정확한 주기는 신경퇴행성 질환, 질환 진행의 단계, 치료 양상 및 다수의 기타 인자를 포함한 다수의 인자에 좌우된다. 반복적 측정은 통상 신경퇴행성 장애를 갖는 개체에서의 점진적인 시냅스 소실을 드러낸다. 다르게는, 상대적인 시냅스 수가 단일 시점에서 질환을 갖는 개체 및 건강한 대조군에서 비교될 수 있다. 치료받고 있는 질환을 갖는 개체에서, 치료 효능은 치료된 개체에서의 시냅스 소실 속도를 대조군에서의 시냅스 소실 속도와 비교함으로써 평가할 수 있다. 대조군 구성원은 치료를 받지 않거나, 위약과 같은 대조군 치료를 받았다.

[0276] **키트**

- [0277] 본원은 또한 본원의 인간화 항-C1q 항체 또는 이의 기능적 단편을 함유하는 키트를 제공한다. 본원의 키트는 본원의 정제된 인간화 항-C1q 항체를 포함하는, 하나 이상의 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 본원의 방법에 따라 사용하기 위한 지시를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 지시는 본원의 임의의 방법에 따라 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머 질환), 염증성 질환, 자가면역 질환 및/또는 대사 장애를 포함하나 이에 한정되지 않는, 보체 활성화와 관련된 질환을 치료하거나 진단하기 위해 상기 인간화 항-C1q 항체를 투여한다는 기재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 지시는, 예를 들어, 개체, 조직 샘플 또는 세포에서 어떻게 C1q를 검출하는지에 대한 기재를 포함한다. 상기 키트는 개체가 질환 및 질환의 단계를 갖는지의 확인을 기초로 한 치료에 적합한 개체의 선택에 대한 기재를 추가로 포함한다.
- [0278] 상기 지시는 일반적으로 의도한 치료를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 대한 정보를 포함한다. 상기 용기는 단위 용량, 벌크 패키지(예를 들어, 다중용량 패키지) 또는 서브유닛(subunit) 용량일 수 있다. 본원의 키트에 제공된 지시는 전형적으로 라벨 또는 패키지 인서트(package insert)(예를 들어, 키트에 포함된 인쇄지) 위에 쓰여진 지시이지만, 기계 판독가능한 지시(예를 들어, 마그네틱 또는 광학 저장 디스크에 담겨진 지시)도 허용가능하다.
- [0279] 라벨 또는 패키지 인서트는 조성물이, 예를 들어, 신경퇴행성 질환을 치료하는 데 사용됨을 지시한다. 지시는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 실행하는 데 제공될 수 있다.
- [0280] 본원의 키트는 포장에 적합하다. 적합한 포장은 바이알, 병, 단지(jar), 가요성 포장(예를 들어, 밀봉된 마일라(Mylar) 또는 비닐봉지) 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 흡입기, 코 투여 장치(예를 들어, 분무기), 또는 미니펌프와 같은 투입 장치와 같은 특정 장치와 함께 사용되는 패키지도 포함된다. 키트는 무균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 상기 용기는 정맥주사 용액 백 또는 피하주사용 주입 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 상기 용기는 또한 무균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 상기 용기는 정맥주사 용액 백 또는 피하주사용 주입 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성제는 고전적인 보체 경로의 억제제이다. 상기 용기는 제2의 약제학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0281] 키트는 임의로 완충제와 같은 추가 성분 및 설명적 정보를 제공한다. 통상적으로, 키트는 용기, 및 용기 위에 또는 용기 가까이에 라벨 또는 패키지 인서트(들)를 포함한다.
- [0282] 본원은 다음 실시예를 참고로 보다 상세히 이해될 것이다. 그러나, 이들 실시예가 본원의 양태 또는 범위를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원 전체에서의 모든 인용은 확실히 본원에 참조로 도입된다.
- [0283] **실시예**
- [0284] **실시예 1: 인간화된 항 C1q 항체의 생성**
- [0285] **도입**
- [0286] 이 실시예는 뮤린 하이브리도마 M1 (마우스 항-인간 C1q 항체 M1을 발현)으로부터 완전히 인간화된 항체의 생산 단계를 기술한다. 선택된 인간 서열 절편의 조합물을 코딩하는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 복합 인간 항체 가변 영역 유전자를 생산하였다. 그 후, 이들을 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 및 인간 카파 경쇄를 코딩하는 벡터에 클로닝하였다. 인간화 항체를 NS0 (마우스 골수종 세포주) 세포에서 안정하게 발현시키고, 단백질을 정제하고, 바이오틴화된 뮤린 M1 항체에 대한 경쟁적 ELISA 분석을 사용하여 인간 C1q에 대한 결합을 시험하였다. 선택된 항체를 또한 바이오틴화된 키메라 항체에 대한 경쟁적 ELISA 분석을 사용하여 마우스 C1q에 대한 결합에 대해 시험하였다.
- [0287] **결과**
- [0288] **항 인간 C1q V 영역의 서열 분석**
- [0289] RNAqueousR-4PCR 키트 (Ambion cat. no. AM1914)를 사용하여, M1 항체를 발현하는 하이브리도마 세포 펠렛으로부터 RNA를 추출하였다. 처음에, IgG 및 Igκ 양자에 대한 불변 영역 프라이머와 함께, 뮤린 시그널 서열에 대한 축퇴 프라이머 풀 (degenerate primer pool)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 중쇄 V 영역 RNA를 6개의 축퇴 프라이머 풀 (HA 내지 HF)의 세트를 사용하여 증폭시켰으며, 경쇄 V 영역 mRNA를 κ 클러스터 (KA 내지 KG)에 대한 7개의 축퇴 프라이머 풀의 세트를 사용하여 증폭시켰다.

[0290] VH 영역에 대해, IgG 프라이머 풀 HB 및 HE에서 예상 크기의 증폭 산물이 발견되었다. V_K 영역의 경우, 카파 프라이머 풀 KC, KE 및 KG에서 예상 크기의 증폭 산물이 발견되었다. 성공적인 증폭 과정으로부터 각각 얻은 PCR 산물을 정제하고, 'TA' 클로닝 벡터 (pGEM-T Easy, Promega cat. No. A1360)에 클로닝하여 서열 분석하였다. 총 14개의 VH 및 24개의 V_K 클론을 서열 분석하였다.

[0291] IgG 풀 HB 및 HE로부터 단일 기능성 VH 유전자가 14개의 클론으로 동정되었다. 프라이머 풀 KC로부터 단일 기능성 V_K 유전자 서열이 9개의 클론으로부터 동정되었다. IgG 프라이머 풀로부터 얻어진 가변 영역의 3' 코딩 서열 하류는 IgG인 항체 이소 타입과 일치하였다.

[0292] 기능성 VH 및 V_K 유전자 서열은 VH 서열의 시작 부분의 5개의 아미노산 및 V_K 서열의 시작 부분의 2개의 아미노산을 제외하고는 상기 하이브리도마 서열과 동일하였다. 이러한 차이는 대부분 서열 분석 방법으로 인한 것일 수 있으며, V 영역의 5' 말단으로 축퇴(degenerate)된 프라이머가 아닌 신호 서열로 축퇴된 프라이머를 사용한 결과였다.

[0293] 기능성 VH의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGVIHP
NSGSINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLP
LDYWGQGTSTVTVSS

[0294]

[0295] (서열 21). VH의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 문자로 표시된다.

[0296] 기능성 V_K의 아미노산 서열은 하기와 같다:

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSG
IPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEDFAMYYCQQHNEYPLTFGAGTKLELK

[0297]

[0298] (서열 22). V_K의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0299] *키메라 항체의 제작*

[0300] 무린 M1 항체의 VH 및 V_K 서열을 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 및 카파 사슬 발현 벡터 (도 1)에 클로닝하기 위해, 인접 제한 효소 부위가 도입된 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 상기 유전자를 클로닝하기 위해, V_K 서열로부터 *Bam*HI, *Hind*III 및 *Ssp*I 제한 부위를 제거하였다. VH 영역은 *Mlu*I 및 *Hind*III 부위를 사용하여 클로닝하였고, V_K 영역은 *Bss*HI 및 *Bam*HI 제한 부위를 사용하여 클로닝하였다. 두 개의 구축물 모두 서열 분석에 의해, 확인하였다.

[0301] *복합 인간 가변 영역 서열의 설계*

[0302] Swiss PDB를 사용하여 무린 M1 항체 V 영역의 구조 모델을 생성하고, 상기 항체의 결합 특성에 필수적일 수 있는 V 영역의 주요 "구속 (constraining)" 아미노산을 동정하기 위해 분석하였다. 다수의 프레임워크 잔기와 함께 HVR 내에 포함된 대부분의 잔기 (Kabat과 Chothia 정의 모두 사용)를 중요하게 고려하였다. M1의 VH 및 V_K 서열은 전형적인 프레임워크 잔기를 포함하고, HVR1, 2 및 3 모티프는 다수의 무린 항체와 비슷하였다.

[0303] 상기 분석으로부터, 넓은 범위의 HVR 외부 대체 잔기를 가지나, 단지 좁은 지역의 HVR 서열 내 가능한 잔기를 가지는 M1의 복합 인간 서열이 생성될 수 있다는 것이 고려되었다. 예비 분석은, 여러 가지 인간 항체로부터의 상응하는 서열 절편이 조합되어, 무린 서열과 유사하거나 또는 동일한 HVR을 생성할 수 있다는 것을 시사하였다. HVR의 외측 및 인접 영역에서, 인간 서열 절편의 광범위한 선택이 새로운 인간화된 V 영역의 가능한 성분으로 확인되었다.

[0304] *CD4⁺ T 세포 에피토프 회피*

[0305] 구조 분석에 기초하여, M1 인간화 변이체의 생성에 사용될 수 있는 서열 절편의 대형 예비 세트를 선택하고, 인간형 MHC 클래스 II 대립 형질에 결합하는 펩티드의 *인실리코* 분석 (*in silico analysis*)을 위해 iTope™ 기술 (Perry, LCA et al. *Drugs R D*. 2008;9(6):385-96)을 사용하고, 공지된 항체 서열 관련 T 세포 에피토프의 TCED™ T-세포 에피토프 데이터베이스 (Bryson, CJ et al. *BioDrugs*. 2010 Feb 1;24(1):1-8)를 사용하여 분석하였다. 인간 MHC 클래스 II에 대한 주요 비 인간 생식 세포 결합제로 확인되었거나 또는 TCED™에 대해 상당한

히트가 기록된 서열 절편은 폐기하였다. 결과적으로 절편의 세트가 감소하였고, 절편 사이의 교차점에 잠재적인 T 세포 에피토프가 포함되지 않도록 하기 위해, 상기와 같이, 이들의 조합을 다시 분석하였다. 선택된 서열 단편을 주요 T 세포 에피토프가 결여된 완전한 V 영역 서열로 조립하였다. 그 후, 유전자 합성, 포유동물 세포에서의 발현 및 활성 시험을 위해 4개의 중쇄 서열 (VH1-VH4) 및 4개의 경쇄 서열 (Vκ1-Vκ4)을 선택하였다.

[0306] 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 서열

[0307] 표준 기술을 사용하여, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 카파 경쇄 가변 도메인 (Vκ) 변이체를 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열을 측정하였다.

[0308] 중쇄 가변 도메인 변이체 1 (VH1)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP
NSGSINYNEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSITSEDSAVYYCAGERDSTEVLPM
DYWGQGTSVTVSS

[0309]

[0310] (서열 1). VH1의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0311] 중쇄 가변 도메인 변이체 2 (VH2)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP
NSGSINYNEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPM
DYWGQGTTVTVSS

[0312]

[0313] (서열 2)이다. VH2의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0314] 중쇄 가변 도메인 변이체 3 (VH3)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIHP
NSGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPM
DYWGQGTTVTVSS

[0315]

[0316] (서열 3). VH3의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0317] 중쇄 가변 도메인 변이체 4 (VH4)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGVIHP
NSGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGERDSTEVLPM
DYWGQGTTVTVSS

[0318]

[0319] (서열 4). VH4의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0320] 일부 실시양태에서, VH1, VH2, VH3 또는 VH4 중 임의의 하나의 HVR-H1은 서열 **GYHFTSYWMH** (서열 23)를 가지며, VH1, VH2, VH3, 또는 VH4 중 임의의 하나의 V의 HVR-H2는 **VIHPNSGSINYNEKFES** (서열 24)를 갖고, VH1, VH2, VH3 또는 VH4 중 임의의 하나의 HVR-H3은 서열 **ERDSTEVLPMDY** (서열 25)를 갖는다.

[0321] 중쇄 가변 도메인 변이체 1 (VH1)을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGT
 GAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTG
 GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
 ATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACAATTACT
 GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGA
 GGA CT CGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0322]
 [0323] (서열:26).

[0324] 중쇄 가변 도메인 변이체 2 (VH2)를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGT
 GAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTG
 GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
 ATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGCCACAATTACT
 GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
 GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0325]
 [0326] (서열:27).

[0327] 중쇄 가변 도메인 변이체 3 (VH3)을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGT
 GAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTG
 GGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
 ATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGTCACAATTACT
 GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
 GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

[0328]
 [0329] (서열:28).

[0330] 중쇄 가변 도메인 변이체 4 (VH4)를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGT
 GAAGGTTTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCAGCTACTGGATGCACTG
 GGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCATCCTA
 ATAGTGGTAGTATTAACAATGAGAAGTTCGAGAGCAGAGTCACAATTACT
 GTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA
 GGACACGGCGGTCTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0331]
 [0332] (서열:29).

- [0333] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 1 (V_{K1})의 아미노산 서열은 하기와 같다:
DVQITQSPSYLAASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLOS**
- [0334] **GIPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**TKLEIK**
- [0335] (서열 5). V_{K1}의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
- [0336] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 2 (V_{K2})의 아미노산 서열은 하기와 같다:
DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKANKLLIY**SGSTLOS**
- [0337] **GIPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**TKLEIK**
- [0338] (서열 6). V_{K2}의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
- [0339] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 3 (V_{K3})의 아미노산 서열은 하기와 같다:
DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLOS**G
- [0340] **IPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**TKLEIK**
- [0341] (서열 7). V_{K3}의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
- [0342] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 4 (V_{K4})의 아미노산 서열은 하기와 같다:
DIQLTQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLOS**G
- [0343] **IPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQG**TKLEIK**
- [0344] (서열 8). V_{K4}의 초가변 영역 (HVR)은 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
- [0345] 일부 실시양태에서, V_{K1}, V_{K2}, V_{K3} 또는 V_{K4} 중 임의의 하나의 HVR-L1은 서열 **RASKSINKYLA** (서열 30)을 가지며, V_{K1}, V_{K2}, V_{K3} 또는 V_{K4} 중 임의의 하나의 HVR-L2는 서열 **SGSTLOS**(서열 31)을 갖고, V_{K1}, V_{K2}, V_{K3} 또는 V_{K4} 중 임의의 하나의 HVR-L3은 서열 **QQHNEYPLT** (서열 32)를 갖는다.
- [0346] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 1 (V_{K1})을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:
GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
GCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
CAACAGAAACCTGGGAAACTAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTTG
CAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACT
CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAA
CATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0347]
- [0348] (서열:33).
- [0349] 카파 경쇄 가변 도메인 변이체 2 (V_{K2})를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:
GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
GCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
CAACAGAAACCTGGGAAAGCTAATAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTTG
CAATCTGGAATTCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACT
CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAA
CATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0350]
- [0351] (서열:34).

[0352] 카과 경쇄 가변 도메인 변이체 3 (V_K3)을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

GATGTCCAGATCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
 GCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
 CAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTTG
 CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACT
 CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAA
 CATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

[0353] (서열:35).
 [0354]

[0355] 카과 경쇄 가변 도메인 변이체 4 (V_K4)를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

GATATTCAGCTCACACAGTCTCCATCTTCCCTTTCTGCATCTCTCGGAGAAAGA
 GCTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAAACAAATACTTAGCCTGGTAT
 CAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTTATCTACTCTGGCTCCACTTTG
 CAATCTGGAATTCCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACT
 CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAA
 CATAATGAATACCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

[0356] (서열:36).
 [0357]

[0358] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 불변 도메인의 서열

[0359] 표준 기술을 사용하여, 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 불변 도메인 (즉, CH1, CH2, CH3 및 힌지 영역)을 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열을 측정하였다.

[0360] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열은 하기와 같다:

ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
 GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0361] (서열:37). S241P 돌연변이와 L248E 돌연변이는 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
 [0362]

[0363] 인간 IgG4 (S241P L248E) CH1의 아미노산 서열은 하기와 같다:

ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV

[0364] (서열 38).
 [0365]

[0366] 인간 IgG4 (S241P L248E) 힌지 영역의 아미노산 서열은 **ESKYGPPCPPCP** (서열 39)이다. S241P 돌연변이는 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.

[0367] 인간 IgG4 (S241P L248E) CH2의 아미노산 서열은 하기와 같다:

APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

[0368] (서열 40)이다. L248E 돌연변이는 굵은 글씨의 밑줄이 그어진 글씨로 표시된다.
 [0369]

[0370] 인간 IgG4 (S241P L248E) CH3의 아미노산 서열은 하기와 같다:

GQPREPQVYTI.PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLKGK

[0371]

[0372] (서열 41)이다.

[0373] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 불변 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

GTAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAGGGGG
CTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCC
AGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGGCCTC
TGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCCGCGGTACATGGCACCACCTCTCT
TGCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG
CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAG
GGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGG
CTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCATCTGTCTCCTCACCTG
GAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCC
ACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCCTACCCCAGGCCCTGCGCAT
ACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCC
TGCCCTGACCTAAGCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAG
ACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCC
AAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCC
TCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTTCTCCTCAGCACCTGAGTTCCG
AGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGAC
CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGG
TGGGACCCACGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCACCC
TCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

[0374]

[0375]

[0376] (서열:42).

[0377] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 CH1을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:
 CTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
 CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTTCGTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCC
 GCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG

[0378] (서열:43).

[0379] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 힌지를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

[0381] AGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAG

[0382] (서열 44).

[0383] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 CH2를 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

CACCTGAGTTCGAGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGG
 AACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTACCGTGT
 GGTGACGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
 AAGCCAAAG

[0384] (서열:45).

[0385] 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 CH3을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같다:

GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA
 CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAA
 A

[0386] (서열:46).

[0387] 도 2는 M1의 중쇄 가변 영역 (VH)의 아미노산 서열 및 인간화된 VH 변이체 VH1-VH4의 아미노산 서열 및 M1의 카
 파 경쇄 가변 영역 (VK)의 아미노산 서열 및 인간화된 VK 변이체 VK1-VK4의 아미노산 서열의 정렬을 보여준
 다.

[0388] 복합 인간 항체 변이체의 제작

[0391] M1의 모든 변이 VH 및 VK 영역 유전자를, 어닐링, 절찰 및 PCR 증폭된 일련의 중첩 올리고뉴클레오타이드를 사
 용하여 합성하여, 모든 제한 부위가 제거된 전장 합성 V 영역을 제공하였다. 그 후, 조립된 변이체를 IgG4
 (S241 L248E) 중쇄 및 카파 경쇄의 pANT 발현 벡터 시스템 (도 1)에 직접 클로닝하였다. *MluI* 및 *HindIII* 부위
 를 사용하여 VH 영역을 클로닝하고, *BssHII* 및 *BamHI* 제한 부위를 사용하여 VK 영역을 클로닝하였다. 서열 분
 석에 의해 모든 구축물을 확인하였다.

[0392] 항체의 발현 및 정제

[0393] 총 16개의 완전히 인간화된 항체를 전기천공을 통해 NSO 세포에 안정하게 형질감염시켰다. 또한, 키메라 V_κ (ChV_κ)를 가지는 변이체 VH1 및 변이체 V_κ1을 가지는 2개의 대조군 키메라 VH (ChVH)에 더하여, 키메라 항체 M1이 포함되었다. 안정한 형질감염체를 200 nM 메토틱세이트 (Sigma Cat. No. M8407)를 사용하여 선택하였다. 각 구축물의 메토틱세이트-내성 콜로니를 IgG4 ELISA를 사용하여 IgG 발현 수준에 대해 시험하고, 최상의 발현 주를 선택하여, 증폭시킨 후, 액체 질소 하에 동결시켰다. 16개의 인간화된 M1 변이체 및 키메라 M1, ChVH/V_κ1 및 VH1/ChV_κ 항체 모두에 대해 성공적인 형질감염 및 안정한 클론 선택을 달성하였다. 게놈 DNA의 가변 도메인의 DNA 서열 분석에 의해, 각 세포주의 동일성을 확인하였다.

[0394] 단백질 A 세파로즈 칼럼 (GE Healthcare cat. co. 110034-93)에서 세포 배양 상청액으로부터 항체를 정제하고, pH 7.4, PBS로 완충액 교환하고, 예상 아미노산 서열에 기초한 흡광 계수를 사용하여, OD_{280nm}로 정량화하였다. 키메라 및 인간화 변이체 IgG를 SDS-PAGE를 환원시켜 분석하였다. VH 및 V_κ 사슬의 예상 크기에 상응하는 밴드가 응집, 분해 또는 다른 특이한 특징의 증거 없이 관찰되었다 (도 3).

[0395] 인간 C1q 항원에 대한 경쟁적 ELISA

[0396] 인간 C1q에 대한 인간화 M1 변이체의 결합을 경쟁적 ELISA에 의해 분석하였다. 3배 희석 계열의 시험 항체 (5 μg/ml 내지 0.002 μg/ml)를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하기 전에, 1.0 μg/ml에서 인간 C1q로 사전 코팅된 플레이트상에서 진탕하면서, 일정 농도의 바이오틴화 마우스 M1 항체 (0.02 μg/ml, 최종 농도)와 사전 혼합하였다. 마우스 M1 항체의 결합을 스트렙타비딘-과산화 효소 접합체 (Sigma-Aldrich cat. no. S5512) 및 TMB (3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘) 기질 (Thermo Scientific cat. no. 34029)로 검출하였다. 1M HCl로 반응을 중단시키고, Dynex Technologies MRX TC II 플레이트 판독기로 450 nm에서의 흡광도를 판독하고, 결합 곡선을 도시하였다.

[0397] 도 4는 생산된 모든 인간화 M1 변이체가 키메라 M1 항체와 유사한 결합 특성을 갖는다는 것을 보여준다. 결합 곡선을 사용하여, 키메라 M1의 IC₅₀으로 정규화된 각 항체에 대한 IC₅₀ 값 (표지된 경쟁자 결합을 50% 저해하는 시험 항체의 농도)을 계산한 후, NSO 형질감염체로부터의 항체 수율을 비교하였다 (표 1).

표 1

[0398]

항체	상대적 IC ₅₀	발현 수준 (μg/ml)
키메라 M1	00	.6
ChV1/V _κ 1	09	0
H1/ChV _κ	92	.9
H1/V _κ 1	90	.0
H1/V _κ 2	84	.5
H1/V _κ 3	91	.9
H1/V _κ 4	80	.6
H2/V _κ 1	15	4
H2/V _κ 2	12	8
H2/V _κ 3	75	.3
H2/V _κ 4	72	1
H3/V _κ 1	65	.9
H3/V _κ 2	82	7
H3/V _κ 3	63	.8
H3/V _κ 4	83	.2
H4/V _κ 1	03	5
H4/V _κ 2	84	6
H4/V _κ 3	77	.3
H4/V _κ 4	92	4

[0399] 표 1 인간 C1q와의 결합에 대한 상대적 IC₅₀ 값 및 단백질 발현 수준

[0400] 표 1은 인간 C1q에 결합하는 인간화 M1 변이체에 대한 계산된 상대적 IC₅₀ 값 및 상응하는 NSO 세포주의 단백질

발현 수준을 보여준다.

[0401] 시험된 모든 변이체에 대한 정규화된 IC₅₀ 데이터는 0.63 내지 1.15의 범위였고, 이는 인간 C1q에 대해 완전히 인간화된 M1 항체 모두의 결합 효율이 키메라 M1과 유사하다는 것을 시사한다. 또한, 대부분의 인간화 변이체는 키메라 항체와 비교하여 발현 수준의 증가를 달성하였다.

[0402] *마우스 C1q 항원에 대한 경쟁적 ELISA*

[0403] 마우스 C1q에 대한 인간화 M1 변이체의 결합을 4개의 선택된 항체, VH1/Vκ1, VH3/Vκ3, VH3/Vκ4 및 VH4/Vκ3에 대한 경쟁적 ELISA에 의해 분석하였다. 무관한 IgG4 (S241P L248E) 항체도 결합 대조군으로서 포함되었다. 3배 희석 계열의 시험 항체 (100 μg/ml 내지 0.046 μg/ml)를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하기 전에, 5.0 μg/ml에서 마우스 C1q로 사전 코팅된 플레이트상에서 진탕하면서, 일정 농도의 바이오틴화 키메라 M1 항체 (0.03 μg/ml, 최종 농도)와 사전 혼합하였다. 키메라 M1 항체의 결합을 스트렙타비딘-과산화 효소 접합체 (Sigma-Aldrich cat. no. S5512) 및 TMB 기질 (Thermo Scientific cat. no. 34029)로 검출하였다. 1M HCl로 반응을 중단시키고, Dynex Technologies MRX TC II 플레이트 판독기로 450 nm에서의 흡광도를 판독하고, 결합 곡선을 도시하였다.

[0404] 도 5는 생산된 인간화 M1 변이체가 키메라 M1 항체와 유사한 결합 특성을 갖는다는 것을 보여준다. 결합 곡선을 사용하여, 키메라 M1의 IC₅₀으로 정규화된 각 항체에 대한 IC₅₀ 값을 계산하였다 (표 2).

표 2

항체	상대적 IC ₅₀
키메라 M1	100
H1/Vκ1	62
H3/Vκ3	50
H3/Vκ4	91
H4/Vκ3	84

[0406] **표 2 마우스 C1q에의 결합에 대한 상대적 IC₅₀ 값**

[0407] 표 2는 마우스 C1q에 결합하는 인간화 M1 변이체에 대한 계산된 상대적 IC₅₀ 값을 보여준다.

[0408] **결론**

[0409] 무린 항체 M1의 V 영역 유전자를 벡터에 클로닝하여, 인간 IgG4 (S241P L248E) 중쇄 불변 영역 및 κ 경쇄 불변 영역과 조합된 무린 V 영역을 포함하는 키메라 항체를 생성시켰다. 또한, IgG4 (S241P L248E)의 4개의 인간화된 VH 영역 및 4개의 인간화된 Vκ 영역의 일련의 것을 설계 및 제작하였다.

[0410] 키메라 항체 및 인간화된 V 영역 유전자의 조합물 (총 16개의 항체)을 NS0 세포에서 발현시키고, 정제한 후, 경쟁적 ELISA 분석에서 인간 C1q에 대한 결합에 대해 시험하였다. 결합 데이터 (표 1)를 사용하여, 키메라 M1 항체와 비교하여 인간화된 M1 변이체의 순위를 책정하였다. 중쇄 및 경쇄 밴드의 성질의 유의한 차이는 SDS-PAGE에 의해 검출되지 않았다.

[0411] **실시예 2: 인간화된 항 C1q 항체 VH3/Vκ3의 동역학 특성화**

[0412] **도입**

[0413] 실시간으로 항원-항체 복합체의 결합 및 해리를 측정하는 면역학적 바이오센서, 예를 들어 Biacore™ 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기구는 결합 동역학의 해석을 가능하게 한다. 해리 속도와 그 후속 최적화는 생물 의약품 항체 개발에 특히 중요하다.

[0414] Biacore는 SPR을 사용하여, 실시간으로 용액 '분석물'에서 표면 결합 분자 '리간드'와 그의 결합 파트너 간의 상호 작용을 모니터링한다. SPR은 총 내부 반사 조건하에서, 빛이 층에서 반사될 때, 금속 층의 표면에서 발생하는 전자 전하 밀도 현상이다. 생산된 표면 플라즈몬은 반사된 빛과 반대되는 측면의 금속 층의 매질의 임의의 굴절률 변화에 민감하다. 상기 표면에서 일어나는 단백질-단백질 상호 작용은 매질의 굴절률에 영향을 미치므로, 검출될 수 있다. 리간드 변형 센서 표면과 분자의 결합은, 결합 질량에 비례하는 반응을 생산하여, 결합된 분석물

의 양의 작은 변화를 검출 가능하게 한다 (작은 피코그램 수준까지). 이 기술을 사용하여, 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위의 친화성 상수 (K_D), 10^3 M⁻¹s⁻¹ 내지 10^7 M⁻¹s⁻¹ 사이의 결합 속도 상수 (k_a) 및 10^{-1} s⁻¹ 내지 10^{-6} s⁻¹ 사이의 해리 속도 상수 (k_d)를 측정할 수 있다.

[0415] 상기 기술은 단지 소량의 물질만이 요구되며, 상호 작용하는 생체 분자 모두는 표지되지 않은 형태로 사용될 수 있다. 그러나 상기 기술의 일부 특성과 단백질 중 하나가 표면에 부착되어야 한다는 사실이 잘못된 결과를 초래할 수 있기 때문에, 실험 설계가 중요하다 (Huber and Mueller, *Curr Pharm Des.* 2006;12(31):3999-4021; and Lakey and Raggett, *Curr Opin Struct Biol.*, 1998. 8(1): p. 119-123).

[0416] 이 실시예는 높은 분해능을 위해 Biacore T200 표면 플라즈몬 공명 기구를 사용하여, 인간화된 항-C1q 항체 VH3/Vκ3 (Fab 단편 및 전장 IgG 모두)과 C1q 단백질 사이의 상호 작용의 동역학 특성화를 기술한다.

[0417] 재료 및 방법

[0418] 샘플

[0419] 이 실시예에서 사용되는 시약은 표 3에 열거되어 있다.

표 3

샘플	농도에서의 용적 (mg/ml)
IgG-VH3/Vκ3	1.2 mg/ml에서 400 μl
Fab-VH3/Vκ3	0.3 mg/ml에서 450 μl
마우스 C1q	1.0 mg/ml에서 4 x 50 μl
인간 C1q	1.0 mg/ml에서 10 x 50 μl

[0421] **표 3 샘플**

[0422] 해동시킬 때, +4°C에 보관된 경우를 제외하고, 마우스 및 인간 C1q는 -80°C에서 보관되었다. Fab 및 IgG VH3/Vκ3은 +4°C에서 보관되었다. 희석된 경우, C1q 용액은 얼음에 유지시키고, 24시간 이내에 사용하였다.

[0423] 장비

[0424] Biacore T200 평가 소프트웨어 V1.1 (스웨덴 읍살라)을 운용하는 Biacore T200 기구 (SN: CN 12231)를 사용하였다.

[0425] 재료

[0426] 하기의 재료는 Biacore로부터 하기와 같이 입수하였다 :

[0427] Biacore 예방 유지 키트 2: BR-1006-51, Lot No. 164110

[0428] 시리즈 S CM5 센서 칩: BR-1006-68, Lot No. 10102398

[0429] 아민 커플링 키트: BR-1000-50, Lot No. 2027942/41

[0430] 10 mM 아세테이트 pH 5.0: BR-1003-51, Lot No. 21702813

[0431] HBS-EP 구동 완충액: BR-1006-69, Lot No. 2027942/59

[0432] BSA는 Sigma (A3294)로부터 입수하였다.

[0433] 절차

[0434] 모든 실험은 Biacore 'wizard' 소프트웨어로 진행되었다. 하기 Biacore 방법이 사용되었다:

[0435] 고정화

[0436] 동역학/친화성

[0437] 탈착 및 살균

[0438] 결과

- [0439] VH3/Vκ3 Fab 제조
- [0440] 항 C1q 인간화 항체 VH3/Vκ3의 Fab 단편을 Fab 마이크로 제조 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 제조하였다. 전장 IgG VH3/Vκ3의 시작 농도는 1.88 mg/ml이었다. 충분한 양의 Fab 단편을 얻기 위해, 225 μg의 각각의 전장 IgG의 6개의 반응을 분해하고, 폴딩한 후, 정제하였다. 정제된 Fab 및 전장 IgG를 구동 완충액으로서 1x PBS를 사용하여, Superdex 200 Increase 10/300 GL 칼럼 (GE Healthcare Cat. No. 28-9909-44)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다. 예상 아미노산 서열에 기초한 흡광 계수 ($EC_{(0.1\%)}(IgG\ VH3/V\kappa3\ Ec_{(0.1\%)} = 1.45, Fab\ VH3/V\kappa3\ Ec_{(0.1\%)} = 1.4)$)를 사용하여 OD_{280nm} 로 샘플을 정량화하였다. 두 샘플 모두 비 환원성 및 환원성 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 6). 도 6은 겔 여과 정제된 항체의 쿠마시 블루 염색 SDS-PAGE 겔을 도시한다. 각 샘플 1 μg을 NuPage 4-12 % Bis-Tris 겔 (Invitrogen Cat. No. NP0322BOX)에 넣고, 200V에서 35분 동안 구동시켰다. 크기 마커 (M)는 사전 염색된 단백질 표준 Fermentas PageRuler Plus (Cat. No. SM1811)이다. 레인 1은 환원된 VH3/Vκ3 Fab를 보여주고; 레인 2는 환원되지 않은 VH3/Vκ3 Fab를 보여주며; 레인 3은 환원된 VH3/Vκ3 IgG를 보여주고; 레인 4는 환원되지 않은 VH3/Vκ3 IgG를 보여준다.
- [0441] 항원 준비
- [0442] 마우스 C1q (mC1q) 및 인간 C1q (hC1q) 항원의 샘플은 -80°C에서 보관하였고, 초기 해동시, 복수의 분취액을 제조하고, 재동결시켜, -80°C에서 보관하였다. 동역학 구정을 위해 HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4 및 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05 % (v/v) P20) 내 분석물의 추가 희석을 수행하였다.
- [0443] 기구 준비
- [0444] 샘플 구동 전 및 연구 과정 동안, 시스템 체크 (Biacore 예방 유지 키트 2)를 수행하였다. 테스트 한 모든 시스템이 통과되었으며 (Reagent pump, Refractometer, Injections, Noise, Mixing and Buffer Selector), 이는 상기 기구가 제조사가 정한 기준에 따라 작동된다는 것을 시사한다.
- [0445] 시스템 준비
- [0446] CM5 칩을 삽입한 후, 상기 시스템을 준비시킨 후, BIA 정규화 용액 (Biacore 예방 유지 키트 2)으로 정규화하였다. 모든 샘플은 10°C에서 인큐베이션한 샘플 랙을 이용하여, 25°C에서 구동시켰다. 상기 칩을 HBS-EP를 구동 완충액으로 사용하여 상기 시스템에 첨가한 후; 고정화 전에, 상기 칩 표면을 50 mM NaOH의 2회 주입으로 준비시켰다.
- [0447] 고정화 조건
- [0448] 안정성을 고려하여, 2개의 칩을 준비하였으며; 하나는 리간드로서 hC1q 및 mC1q (칩 A11)를 사용하였고, 하나는 리간드로서 IgG 및 Fab (칩 A13)를 사용하였다. 두 경우 모두 CM5 시리즈 S 센서 칩 (Biacore)에서, m/h C1q에 대한 고정화는 10 mM 아세테이트 완충액 pH 5.5에서 단백질 농도 5 μg/ml로 수행하였고, IgG 및 Fab에 대한 고정화는 10 mM 아세테이트 완충액 pH 5.0에서 단백질 농도 0.5-2 μg/ml로 수행하였다. 동역학 분석에 사용된 칩 A11 및 A13의 최종 반응 수준은 표 4에 제시된다.

표 4

[0449]

	F _{c1}	F _{c2}	F _{c3}	F _{c4}
A11	블랭크	hC1q 808.3	mC1q 801.3	mC1q 824.1
A13	블랭크	Fab 10.4	IgG 12.8	IgG 51.9

[0450] 표 4 최종 반응 수준 (RU)

[0451] 표 4는 각 유동 세포 (F_c)에 대해 칩 A11 및 A13으로부터 달성된 최종 고정화 수준을 나타낸다.

[0452] 동역학 실험에서, 칩의 표면에서의 물질 전달 효과를 피하기 위해, 고정화/포획 리간드의 양을 제한할 필요가 있으며, 표면은 이상적으로 분석물의 최대 결합 반응 (R_{max})이 100-150 반응 단위 (RU)이어야 한다. 따라서, 고정화되는 리간드의 양은 방정식 1을 사용하여 계산된다:

$$\text{분석물 결합능 (RU)} = \frac{\text{분석물 Mw}}{\text{리간드 Mw}} \times \text{고정 리간드 (RU)} \times \text{Sm}$$

[0453]

[0454]

mC1q 및 hC1q 양자의 경우, 410 kDa (문헌 및 시약 제조자), IgG의 경우, 150 kDa (항체 추산치) 및 Fab의 경우, 50 kDa (추산)의 평균 MW가 사용되었다. R_{max} 에 대해 100 RU 및 화학량론 (Sm)을 1로 목표하는 경우, 이상적인 C1q 고정 목표량은 ~ 820 RU이다. Fab 및 IgG 고정화 표면에 대한 결합활성과 관련된 우려로 인해, 고정 리간드의 양은 가능한 한 낮게 유지되었다 (Biacore 고정 소프트웨어에서 10 RU의 한계).

[0455]

비특이적 결합 (NSB) 대조군

[0456]

비특이적 결합은 리간드 (비특이적이고 검출이 어려움), 포획 단백질 또는 센서 칩 표면과 상호 작용하는 분석물 또는 분석물 오염물로 인한 것일 수 있다. 비교적 고농도 (500 nM), mC1q 및 hC1q 모두의 300초 주입 후, 블랭크 Fc1 표면의 반응을 분석하는 경우, 유의한 비특이적 결합 (NSB)이 관찰되었다. 따라서, 50 µg/ml BSA (10 mM 아세트이트 pH 4.25)의 리간드 고정화 후의 추가적 블로킹 단계가 포함되었다 (Moore et al., MAb. 2010 Mar-Apr; 2 (2):181-9). BSA 블로킹 단계는 또한 참조 채널 (Fc1)상에서 반복하였으며; 두 경우 모두, 고정화 수준은 ~ 8000 RU이었다. CM5 표면에서 500 nM의 IgG 또는 Fab를 사용한 경우, NSB가 관찰되지 않았고, 동역학 구동에서 사용된 농도의 경우, BSA 블로킹 표면에 대한 NSB는 나타나지 않았다.

[0457]

재생산 정탐

[0458]

필요한 경우, 모든 표면 재생산에, 1M NaCl/50mM NaOH의 단일 주입 또는 두 번의 연속 30초 주입이 사용되었다. 마지막 재생산 주입 후, 180초 대기 단계를 도입하여, 다음 결합 사이클 개시 전에, 표면이 안정화되도록 하였다.

[0459]

표면 성능

[0460]

개시시, 배치 및 동역학 구동 종료시, 분석물의 반복 제어 주입에 의해, 표면 성능을 분석하였다. 안정한 결합이 전형적으로 동역학 구동 과정 전반에 걸쳐 관찰되었으며, 이는 동역학 분석을 위한 시스템의 안정성을 부각시킨다.

[0461]

물질 전달 대조군

[0462]

결합 속도가 분석물의 칩 표면으로부터의 운송 속도 및 칩 표면으로의 운송 속도와 결합된 상당한 성분을 포함하는 경우, 물질 운송 한계가 발생한다. 물질 전달이 상당한 것으로 나타난 경우, 결과적 동역학 분석은 부정확할 수 있다. 고정된 리간드의 밀도를 낮추거나 유속을 증가시키면, 물질 운송 한계를 감소시킬 수 있다. 저밀도 표면 및 유사한 MW 항원을 사용한 이전의 시도로부터, 본 연구에서는 40 µL/분의 유속이 선택되었다.

[0463]

연계 반응 대조군

[0464]

1 대 1 결합 모델로부터의 편차를 검사하기 위해, 리간드-분석물 상호 작용을 평가하는데, 연계 반응 제어 실험이 사용된다. 분석물을 상이한 시간 (접촉 시간) 동안 표면에 주입하고, 접촉 시간에 따라 변하는지를 측정하기 위해, 해리 속도를 분석한다. 이러한 관계가 관찰되면, 이는, 표면에 안정된 복합체를 초래하는 것으로서, 초기 결합 사건 후, 두 번째 상호 작용 사건이 발생한다는 것을 시사한다.

[0465]

리간드로서, 상기 항체를 사용하는 경우, 두 개의 항체에 결합하는 단일 hC1q와 관련된 결합활성이 예상될 수 있다. 따라서, 더욱 복잡한 데이터 분석 모델을 뒷받침하는 근거를 제공하기 위해, 연계 반응 대조군이 수행되었다.

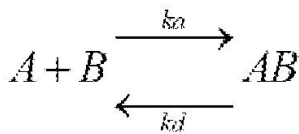
[0466]

동역학 분석

[0467]

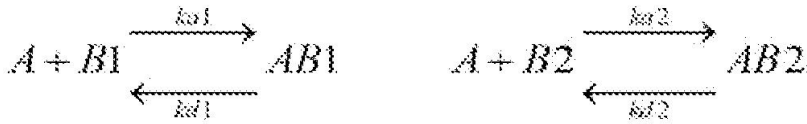
모든 리간드/복합체 상호 작용에 대해 1:1 결합 모델이 초기에 가정되었다 (**방정식 2** 참조). 리간드 활성화 및 기준선 (BSA 블로킹 표면)에서 이동 (drift)으로 인해, 파라미터 R_{max} 는 선택된 동역학 분석을 위한 전체 분석과는 달리 국부적으로 설정되었다. 필요한 경우, 추가적 모델, 예를 들어 이형 리간드 (**방정식 3** 참조) 및 이가 결합 (**방정식 4** 참조)을 또한 적합성 평가로 평가하였다.

[0468] 방정식 2: 1 대 1 결합:



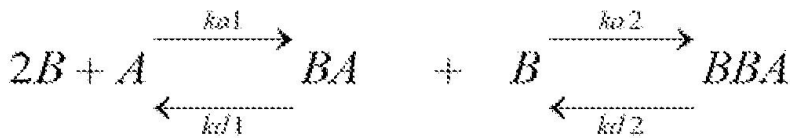
[0469]

[0470] 방정식 3: 이중 리간드:



[0471]

[0472] 방정식 4: 2가 (결합활성):



[0473]

[0474] 항체 특성화

[0475] C1q 복합체 모두는 결합활성을 고려한 것을 기초로 고정화시켰으며 (즉, C1q와 결합하는 2개의 고정 항체), CM5 표면에 대해, mC1q를 사용한 경우, 매우 고 수준의 NSB가 관찰되었고, hC1q는 그 정도가 작았다 (전하 매개 예상 C1q: pI 8-9). C1q 복합체의 안정성과 재생산 조건에 대한 불확실성으로 인해, 예상 동역학 상수를 유도하기 위해, 초기에 단일 사이클 동역학 (single cycle kinetics, SCK)을 사용하였다. SCK 후에 전체 동역학 분석을 수행하였다. 동역학 구동 과정 동안 수행된 리간드 안정성 대조군 주입은, 사용된 재생산 조건이 리간드를 불활성화시켰거나 또는 리간드 자체가 동역학 분석에 필요한 48시간 동안 25°C에서 불안정하였다는 것을 시사하였다. Fab에 대해 mC1q에 의해 나타나는 낮은 친화성은 동역학 분석이 표면 재생산없이 수행될 수 있도록 하였다.

[0476] 안정성 문제로 인해, 동역학 분석에서, 리간드로서 Fab 및 IgG 둘 모두를 사용하였으며, 잠재적 결합활성을 회피하기 위해, 리간드의 양을 최소화하였다.

[0477] 잠재적 물질 전달 효과를 최소화하기 위해, 40 μL/분의 유속에서 동역학 데이터를 얻었다. 동역학 사이클에서, 분석물과 표면 둘 모두의 안정성을 검사하기 위해, 단일 농도의 분석물과 블랭크 (항원 없음)의 2회 반복을 동역학 구동으로 프로그래밍하였다. 초기 동역학 구동에서는 분석물의 3.33배 희석을 구동시켰다. 동역학 분석 및 후속 구동에서 2배 희석 범위를 선택하였다.

[0478] 일부 고농도의 분석물이 정상 상태에 도달하도록 하기 위해, 결합 단계를 500초 동안 모니터링하였다. 동역학 사이클의 해리 단계 동안, 충분한 신호 감소 (≥10 %)를 관찰하기 위해, 해리를 최대 10,800초 동안 측정하여, 동역학의 정확한 평가를 위해, 충분한 해리가 발생할 수 있도록 하였다. 표준 채널 Fc1로부터의 신호는 Fc2, Fc3 및 Fc4의 신호로부터 제외하였다.

[0479] 다양한 분석 포맷에서 VH3/Vκ3의 Fab 단편 및 mC1q의 상호 작용에 대한 동역학 파라미터를 표 5에 제시하였다. 분석물로서 사용되는 경우, mC1q에 대한 K_D 값은 123nM이고, 리간드로서 사용되는 경우, mC1q에 대한 K_D 값은 677nM이었다. 기록된 KD 값의 차이는, 단백질의 2차 또는 3차 구조의 변화를 초래하는 것으로서, 표면과 다중 서브유닛 mC1q의 화학적 커플링의 효과 또는 상호 작용의 방식으로 인한 것일 수 있다.

표 5

리간드	Analyte	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{max} (RU)	SE (R_{max})	Chi ² (RU ²)	K_D (nM)
mC1q	Fab	6.23x10 ³	1.4X10 ²	4.6x10 ⁻³	1.7x10 ⁻⁵	37.0	0.6	0.8	747.9
	VH3/Vκ3	6.9x10 ³	2.4X10 ²	4.1x10 ⁻³	1.0x10 ⁻⁴	33.4	0.5	0.9	606.6
	Mean	6.5x10 ³		4.3x10 ⁻³		35.2			677.3
	Std	5.0x10 ²		3.1x10 ⁻⁴		2.6			99.9
Fab VH3/Vκ3	mC1q	4.5x10 ³	2.6X10 ¹	5.6x10 ⁻²	3.4x10 ⁻³	88.6	0.6	1.9	125.6
		1.7x10 ³	1.8X10 ³	9.1x10 ⁻³	5.4x10 ⁻⁵	50.0	0.3	5.6	121.2
	Mean	3.1x10 ³		3.2x10 ⁻²		69.3			123.4
	Std	2.0x10 ³		3.3x10 ⁻²		27.3			3.1

[0480]

[0481]

표 5 마우스 C1q를 사용한 동역학 분석

[0482]

표 5는 Biacore T200을 사용하여 측정된 바와 같은 것으로서, mC1q와 Fab의 1 대 1 상호 작용에 대한 동역학 파라미터를 보여준다. Chi2 값은 결합 및 해리 데이터가 제안된 결합 모델에 얼마나 잘 적용되는지 보여준다. 값이 낮을수록 더욱 잘 적용된다. 속도 상수에 대한 관련 SE 값은 설명된 모델과의 데이터 적용에 관련된 불확실성을 나타내며, 실제 동역학 값에 대한 총 불확실성을 나타내는 것은 아니다. 평균 반응 데이터는 2개의 독립적인 분석의 평균 동역학 값과 관련 SD를 나타낸다.

[0483]

hC1q와 IgG 및 Fab 상호 작용 모두에 대한 동역학 파라미터는 낮은 피코몰 범위이었다 (1 대 1 모델의 경우 표 6, 이중 모델의 경우 표 7). 결합활성을 회피하기 위해, 처음에 리간드로서 hC1q를 사용하였으나, 이것은 단일 사이클 동역학에 대한 분석 및 더욱 복잡한 모델, 예를 들어, 표면과 다중 서브유닛 단백질의 화학적 커플링과 관련된 hC1q 구조의 다른 형태를 나타낼 수 있는 이중 리간드 결합 모델의 사용을 제한한다 (방정식 3). 분석물로서 hC1q를 사용하는 경우, IgG와 Fab가 결합활성을 회피할 수 있는 최저 농도로 고정화되었다. 1 대 1 모델 및 더욱 복잡한 2가 분석물 모델을 사용하여, 데이터를 분석하였다 (방정식 4). 복잡한 모델 적용은 적용 미터법을 크게 개선하지 않았고, 연계 반응 대조군은 시간 의존적 해리 단계를 나타내지 않았다. 결과는, 더 낮은 리간드 밀도에서, 결합이 주로 결합활성으로 인한 것이 아니라는 것을 시사한다. 분석물로서 hC1q를 사용하는 경우, 전장 VH3/Vκ3 IgG에 대한 KD 값은 5.8pM이었고, VH3/Vκ3 Fab에 대한 KD 값은 8.6이었다. 해리 속도가 너무 느리므로, 이 기술로 정확하게 측정할 수 없음을 유의해야 한다. 결합활성을 회피하기 위해 사용되는 낮은 수준의 결합 및 시스템의 안정성 (BSA 블로킹 층)에 의해, 장시간의 해리 시간이 제한되었다. 이러한 결과는 리간드로서 hC1q를 사용하여 얻은 결과와 잘 일치한다.

표 6

리간드	분석물	k_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/S)	SE (k_d)	R_{max} (RU)	SE (R_{max})	Chi ² (RU ²)	K_D (pM)
hC1q	Fab VH3/Vκ3	5.2x10 ⁴	82	4.6x10 ⁻⁸	1.3x10 ⁻⁷	154.9	0.033	14.8	0.87
	IgG VH3/Vκ3	3.9x10 ⁴	96	3.1x10 ⁻⁷	5.3x10 ⁻⁸	387.9	0.11	206	7.9
Fab VH3/Vκ3	hC1q	1.1x10 ⁶	190	9.1x10 ⁻⁶	1.4x10 ⁻⁸	13.5	0.0015	0.0773	8.6
IgG VH3/Vκ3	hC1q	9.6x10 ⁵	360	6.4x10 ⁻⁶	2.9x10 ⁻⁸	6.5	1.5x10 ⁻³	0.076	6.7
		1.1x10 ⁶	190	5.1x10 ⁻⁶	1.4x10 ⁻⁸	17.4	0.002	0.143	4.9
	평균	1.0x10 ⁶		5.8x10 ⁻⁶					5.8
	Std	6.2x10 ⁴		9.1x10 ⁻⁷					1.3

[0484]

[0485]

표 6 인간 C1q를 사용한 동역학 분석

[0486]

표 6은 Biacore T200을 사용하여 측정된 바와 같은 것으로서, hC1q와 Fab, 또는 IgG의 1 대 1 상호 작용에 대한 동역학 파라미터를 나타낸다. 범례는 표 5와 같다. 빨간색으로 강조된 데이터는 잘 적용되지 않은 기준을 나타내며, 따라서 이러한 데이터 세트는 더욱 복잡한 모델을 사용하여 분석하였다 (표 7).

표 7

리간드	분석물	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/S)	k_{a2} (1/Ms)	k_{d2} (1/S)	R_{max1} (RU)	R_{max2} (RU)	Chi^2 (RU ²)	K_{D1} (nM)	K_{D2} (nM)
hC1q	Fab VH3/Vκ3	1.3x10 ⁷	2.3x10 ⁻⁵	1.8x10 ⁴	6.3x10 ⁻⁸	80.3	78.7	0.1	175.0	3.4
	IgG VH3/Vκ3	2.0x10 ⁵	4.6x10 ⁻⁶	1.6x10 ⁴	1.1x10 ⁻⁷	152.6	247.1	2.41	22.7	7.3

[0487]

[0488]

표 7 이중 리간드 상호 작용에 대한 동역학 분석

[0489]

표 7은 Biacore T200을 사용하여 측정된 바와 같은 것으로서, hC1q 및 Fab 또는 IgG의 이중 리간드 상호 작용에 대한 동역학 파라미터를 나타낸다. 범례는 표 5와 같다. 표면에의 다중 서브유닛 단백질의 고정화의 예상 이중성을 나타내는 것으로서, 이중 리간드 모델에 적용된 데이터.

[0490]

결론

[0491]

VH3/Vκ3 5의 Fab 단편 및 전장 IgG와 hC1q와 mC1q의 상호 작용을 리간드로서 두 종 모두를 사용하여 분석하였다. CM5 텍스트란 표면과 C1q 복합체의 화학적 커플링 및 안정성에 대한 문제는 IgG 및 Fab 표면의 개발을 요구하였으며; 결과는 이 표면에서 관찰된 결합 방식이 주로 1 대 1이었고, 즉 동역학 특성이 결합활성의 신호를 나타내지 않았음을 시사한다. VH3/Vκ3의 Fab 단편 및 전장 IgG 모두는 hC1q에 대해 낮은 피코몰 범위에서 강한 결합을 나타내는 반면 (각각 5.8 및 8.6 pM), VH3/Vκ3의 Fab 단편에 대한 mC1q 결합의 경우, 더 낮은 친화성이 관찰되었다 (123 nM).

[0492]

실시예 3: 인간화된 항 C1q 항체는 보체-매개 용혈을 저해한다

[0493]

인간화된 항 C1q 항체를, C1q를 중화시키고, 하류 보체 캐스케이드의 활성을 블로킹하는 능력에 대하여 인간 및 설치류 용혈 분석 (CH50)에서 시험하였다.

[0494]

본 실시예에서 사용된 인간화 항-C1q 항체는 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성하였다. 실시예 1의 하기 인간화 항체, 즉 항체 VH1/Vκ1 (2B12), 항체 VH3/Vκ3 (5H7), 항체 VH3/Vκ4 (3F1) 및 항체 VH4/Vκ3 (1D3)을 사용하였다. 또한 마우스 단일클론 항체 M1 (ANN-005) 및 키메라 M1 항체 (3E2)를 대조군으로 사용하였다.

[0495]

CH50 분석은 기본적으로 *Current Protocols in Immunology* (1994) Supplement 9 Unit 13.1에 기재된 바와 같이 수행하였다. 요약하면, 5 마이크로리터 (μl)의 인간 혈청 (Cedarlane, NC, Burlington, NC) 또는 0.625 μl의 Wistar 랫트 혈청을 50 μl의 GVB 완충액 (Cedarlane, Burlington, NC)로 희석하고, GVB 완충액으로 희석된 인간화 항체 (1 μg) 50 μl에 첨가하였다. 항체:혈청 혼합물을 얼음 위에서 30분간 사전 인큐베이션한 후, 랫트 및 인간 분석을 위해, 100 μl의 EA 세포 (2x10⁸/ml)에 첨가하였다. EA 세포를 용혈소 (Cedarlane Cat # CL9000) 및 Alsever's (Cedarlane Cat # CL2581)의 양 혈액을 사용하여 Current Protocols에 명시된 대로 정확하게 생산하였다. EA 세포, 혈청 및 항체 혼합물을 37°C에서 30분간 인큐베이션시킨 후, 얼음에 방치하였다. 그 다음, 0.15M NaCl 1.2ml를 혼합물에 첨가하고, 샘플의 OD₄₁₂를 분광 광도계에서 판독하여 세포 용해 양을 측정하였다. 시험 항체의 저해 백분율을 대조군 마우스 IgG1 항체 (Abcam ab18447)에 대비하여, 측정하였다.

[0496]

4개의 C1q-결합 항체 (2B12, 5H7, 3F1 및 1D3)를 투여량-반응 포맷으로 인간 CH50 용혈 분석에서 C1q 중화 활성에 대해 시험하였다 (도 7a). 각각의 항체를, 약 10:1 내지 약 1:1의 범위의 화학량론으로 C1q에 결합하는 항 C1q 항체를 유도하는 유효 투여 범위에 상응하는 3.9 ng, 15.9 ng, 62.5 ng 및 260 ng의 투여량으로 시험하였다. 무린 항 C1q 항체 M1 (ANN-005)과 키메라 M1 항체 (3E2)를 참조로 사용하였다. VH3/Vκ3 항체 (5H7)는 무린 M1 항체와 키메라 M1 항체 둘 다와 유사한 정도로 투여량 의존적 방식으로 CH50 용혈을 저해하였다 (도 7a). 또한, 관찰된 용혈의 50%를 저해하는데, 약 60ng의 VH3/Vκ3 항체 (5H7), VH4/Vκ3 항체 (1D3) 및 VH1/Vκ1 항체 (2B12)가 필요하였다 (도 7a). 관찰된 용혈의 약 95%를 저해하는데에는 약 250ng의 항체 VH3/Vκ4 (3F1)이 필요하였다 (도 7a).

[0497]

4개의 C1q 결합 항체 (2B12, 5H7, 3F1 및 1D3)를 또한 랫트 CH50 분석에서 C1q 중화 활성에 대해 시험하였다 (도 7b). 각각의 항체를, 약 10:1 내지 약 1:1의 범위의 화학량론으로 C1q에 결합하는 항 C1q 항체를 유도하는 유효 투여 범위에 상응하는 3.9 ng, 15.9 ng, 62.5 ng 및 260 ng의 투여량으로 시험하였다. 시험을 투여량 반응 포맷으로 수행하였다. 무린 항 C1q 항체 M1 (ANN-005)과 키메라 M1 항체 (3E2)를 참조로 사용하였다. VH1/Vκ1

항체 (2B12)는 뮤린 M1 항체와 키메라 M1 항체 둘 다와 유사한 정도로 투여량 의존적 방식으로 CH50 용혈을 저해하였다 (도 7b). 또한, 관찰된 용혈의 약 50% 내지 약 80%를 저해하는데, 약 60ng의 VH1/Vκ1 항체 (2B12), 항체 VH3/Vκ4 (3F1), VH3/Vκ3 항체 (5H7), 및 VH4/Vκ3 항체 (1D3)가 필요하였다 (도 7b).

[0498] 전술한 본 발명이 이해의 명확성을 위해, 예시 및 실시예로서 일부 상세히 설명되었지만, 상기 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 그 전체가 참조 문헌으로 명백히 포함된다.

[0499] **실시예 4: 인간화 항 C1q 항체의 약물 동력학, 혈청 C1q 수준에 대한 약동학 효과 및 생체 외 보체 매개 용혈을 평가하기 위한 원숭이에서의 정맥 내 투여 연구**

[0500] 시아노몰거스 원숭이에게 15 및 100 mg/Kg 투여량으로 단일 정맥 내 볼루스 주입 (IV)을 통해 인간화 항 C1q 항체 VH3/Vκ3 (5H7)을 투여하였다 (N=2/투여량, 수컷 원숭이 1마리 및 암컷 원숭이 1마리/투여량).

[0501] 하기 시점에 혈액 샘플을 수집하였다 - 1일째: 연구 전, 투여 후 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 96 및 120시간 및 7, 9, 12, 15, 18 및 21일째. 혈액 샘플을 응고시키고, 혈청을 원심 분리에 의해 분리한 다음, 분석시까지 -80 °C에 냉동 보관하였다.

[0502] 원숭이 샘플의 VH3/Vκ3 (5H7)의 혈청 수준의 측정: 혈청 항 C1q 항체 수준을, 포획 분석물로서 사용된 hC1q를 사용한 직접 ELISA를 사용하여 측정된 후, 인간 5H7 항체를 검출하였다. 측정색 96 웰 ELISA 플레이트 (Corning, Cat # 3925)를 인간 C1q (Complement Technology A099)로 2 µg/mL로 코팅하였다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 둘베코 인산염 완충 식염수 (DPBS) (Thermo Scientific 28372)로 3회 세정하고, 3% BSA를 함유하는 DPBS로 4°C에서 밤새 블로킹하였다. 다음날, 블로킹 용액을 제거하고, 희석 범위 (2000 내지 2000000배)에서 5H7 표준 또는 개별 혈청 샘플을 0.3% BSA 및 0.1% 트윈을 함유하는 분석 완충액 DPBS (KPL Inc. 51-12-10)에서 샘플당 50 µL로 플레이트에 첨가하였다. 샘플을 1시간 동안 300rpm에서 진탕하면서, 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 알칼리 포스파타제 (Jackson Immuno research, 109-055-098)와 접합된 염소 항 인간 FC 항체 50 µL를 분석 완충액에 0.5 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 0.05% 트윈을 함유하는 DPBS에서 3회 세정하였다. 각각의 세정은 플레이트 진탕기에서 300 rpm으로 진탕하면서 10분 동안 지속하였다. 그 후, 플레이트를 가볍게 두드려서 건조시킨 후, 20분 동안 알칼리 포스파타제 기질 인큐베이션을 사용하여 진행시켰다 (Life Technologies, # T2214). Perkin Elmer 구상 판독기 (Perkin Elmer envision reader)에서 발광 계수를 판독하였다. 표준 곡선은 4PL 로지스틱 피트 (logistic fit)를 사용하여 적용하였으며, 미지 신호 계수를 µg/mL 농도로 변환하고, Graphpad Prism을 사용하여 도시하였다.

[0503] 원숭이 샘플의 혈청 C1q 수준의 측정: C1q의 혈청 수준을 2개의 상이한 hC1q 특이적 ELISA 분석을 사용하여 측정하였다. 양쪽 ELISA 분석에서, C1q의 콜라겐 테일에 결합하는 항체인 JL1을 포획 항체로서 사용하였다 (Abcam ab71940). 첫 번째 분석에서, 5H7과 동일한 부위에 결합하는 M1 또는 VH3/Vκ3 (5H7)의 뮤린 버전을 유리 C1q 수준을 단리하기 위한 검출 항체로 사용하였다. 두 번째 분석에서, JL1을 혈청 샘플에서 ANX와 유리 및 결합을 모두하는 C1q를 측정하기 위한 검출 항체로서 사용하였다.

[0504] 블랙 96 웰 ELISA 플레이트 (Corning, Cat # 3925)를 1 µg/mL의 JL1로 코팅하였다. 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 둘베코 인산염 완충 식염수 (DPBS) (Thermo Scientific 28372)로 3회 세정하고, 4°C에서 3% BSA를 함유하는 DPBS로 밤새 블로킹하였다. 다음날, 블로킹 용액을 제거하고, C1q 표준 또는 개별 혈청 샘플을 0.3% BSA 및 0.1% 트윈이 포함된 분석 완충액 DPBS에 1000배 내지 10000배 범위의 희석으로 샘플당 50 µL로 흘려주었다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 분석 완충액에서 200-400 ng/mL의 최종 농도로 각각의 알칼리 포스파타제 접합 항체 M1 또는 JL1 50 µL를 첨가하였다. 샘플을 4°C에서 진탕하면서, 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 플레이트를 0.05% 트윈을 함유하는 DPBS에서 3회 세정하였다. 각각의 세정은 플레이트 진탕기에서 300 rpm으로 진탕하면서 10분 동안 지속하였다. 그 후, 플레이트를 가볍게 두드려 건조시키고, 20분 동안 알칼리 포스파타제 기질 배양을 사용하여 진행시켰다. Perkin Elmer 구상 판독기에서 발광 계수를 판독하였다. 표준 곡선은 4PL 로지스틱 피트를 사용하여 적용하였으며, 미지 신호 계수를 농도, 희석 보정으로 변환한 후, Graphpad Prism을 사용하여 도시하였다.

[0505] 원숭이 혈청 샘플에서의 생체 외 용혈 활성의 측정: 용혈 분석은 하기 변형이 포함된 것으로서, 실시예 3에서와 유사하였다. 본 연구에서 원숭이 혈청 샘플을 GVB ++ 완충 용액 (Complement Technology Cat # B100)으로 1:50으로 희석하고, 17x10⁶ 세포/mL에서 동일한 용적의 항체 감작된 양 적혈구 (antibody sensitized sheep red

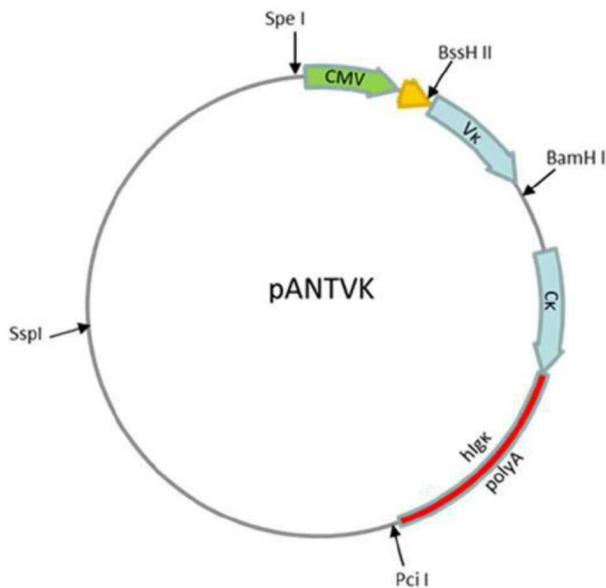
blood cell)와 혼합하였다 (Complement Technology Cat # B201). 샘플을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 기준선 (단지 혈청이 함유되지 않은 완충액)과 100% 용혈 (탈 이온수 사용)을 측정하기 위해, 대조군 웰을 설정했다. 그 후, 샘플을 회전시킨 후, 상청액을 투명 ELISA 플레이트에 옮기고, 415 nm에서 흡광도를 관독하였다. 모든 샘플에 대한 흡광도는 기준선을 제외한 후, 100% 용혈 (탈 이온수)로 정규화하였다. 1:50 희석에서, 혈청 샘플은 물을 이용하여 관찰된 용혈의 50-70%를 나타냈다. 기준선 정규화 후, 각각의 개별 원숭이에 대해, % 용혈을 도시하였다.

[0506]

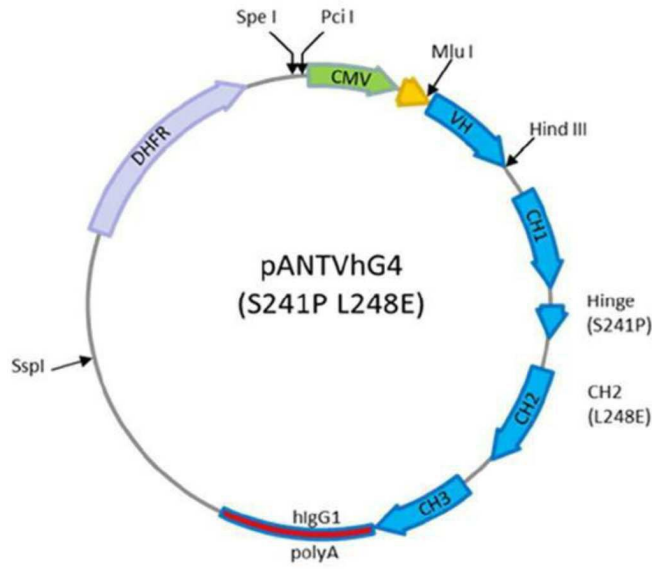
IV 투여 후 혈청 5H7 수준의 투여량 의존적 증가가 관찰되었으며, 15 mg/Kg 투여량에서 ~ 250 ug/mL 및 100 mg/Kg 투여량에서 ~ 2000 ug/mL의 최대 노출이었다. 혈청 5H7 수준은 15mg/Kg 투여량에서 4일 후에 검출 한계 이하로 하락한 반면, 5H7의 지속 혈청 수준은 100mg/Kg 투여량에서 20일간 샘플링하는 동안 분명하였다 (도 8). 혈청 C1q 수준 (JL1-M1 분석)은 15mg/Kg 투여량에서 5일에 걸쳐 > 90% 감소하였고, 투여 개시 후 5-11일 사이에 기준선까지 다시 회복되었다 (도 9a). 반대로, 100mg/Kg 투여량은 투여 개시 후 20일까지 혈청 C1q 수준의 지속적인 감소로 이어졌다 (도 9a). JL1-JL1 분석에서 혈청 C1q의 유사한 시간 경과 및 감소 패턴이 관찰되었다 (도 9b). 하나는 C1q에 5H7과 동일한 부위에 결합하는 검출 항체를 이용하였고, 다른 하나는 C1q상의 독립적인 부위에 대한 검출 항체를 이용한 것으로서, 2개의 독립적인 ELISA 분석에서 혈청 C1q의 견고하고 지속적인 감소의 관찰은 혈청 C1q 수준이 5H7로 처리한 후 제거된다는 것을 시사한다. 혈청 C1q 수준의 감소와 일치하는 것으로서, 투여 개시 후 20일까지 100 mg/Kg 투여량에서 생체 외 용혈의 지속적인 감소가 관찰되었다 (도 10). ANX의 15mg/Kg 투여량에서, 용혈은 5일에 걸쳐 > 90 % 감소되었고, 투여 개시 후 5-11일 사이에 기준선까지 다시 회복되었다 (도 10). 이러한 결과는 항 C1q 항체 VH3/Vκ3 (5H7)이 시아노몰거스 원숭이에서 혈청 C1q 수준과 용혈의 지속적인 감소와 함께 강력한 약동학 노출 및 시간 경과를 보여준다는 것을 방증한다.

도면

도면1a



도면1b



도면2a

M1 항-C1q의 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열 및 인간화 VH 변이체 1-2의 아미노산 서열의 정렬

VH 변이체 1:

M1_VH	1	QVQLQQP	GAEIVKPGASVKLSCKSS	GGYHFTSYMMHWKORP	GGLEWIGY	50
VH1	1	QVQLVQSGAE	LKKPGASVKVSKSS	GGYHFTSYMMHWKQAP	GGLEWIGY	50
M1_VH	51	IHPNGS	INYNKEKFEKATLTVDKSS	STAYMQLSSLTSEDS	AVYYCAGER	100
VH1	51	IHPNGS	INYNKEKFEKATITVDKST	STAYMQLSSLTSEDS	AVYYCAGER	100
M1_VH	101	DSTEVLP	MDYWGQGTSTVSS		121	
VH1	101	DSTEVLP	MDYWGQGTSTVSS		121	

M1_VH는 M1 항체의 VH를 지칭하고, VH1은 VH 변이체 1을 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

VH 변이체 2:

M1_VH	1	QVQLQQP	GAEIVKPGASVKLSCKSS	GGYHFTSYMMHWKORP	GGLEWIGY	50
VH2	1	QVQLVQSGAE	LKKPGASVKVSKSS	GGYHFTSYMMHWKQAP	GGLEWIGY	50
M1_VH	51	IHPNGS	INYNKEKFEKATLTVDKSS	STAYMQLSSLTSEDS	AVYYCAGER	100
VH2	51	IHPNGS	INYNKEKFEKATITVDKST	STAYMQLSSLTSEDS	AVYYCAGER	100
M1_VH	101	DSTEVLP	MDYWGQGTSTVSS		121	
VH2	101	DSTEVLP	MDYWGQGTSTVSS		121	

M1_VH는 M1 항체의 VH를 지칭하고, VH2는 VH 변이체 2를 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

M1 항-C1q의 경쇄 가변 영역(V_k)의 아미노산 서열 및 인간화 V_k 변이체 1-2의 아미노산 서열의 정렬

V_k 변이체 1:

```

M1_VK      1  DVQITQSPSYLAASPEGITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTKNLLIYS      50
VK1        1  DVQITQSPSYLAASLGERATINCRASKSINKYLAWYQOKPGKTKNLLIYS      50
M1_VK      51  GSTLQSGIFSRFSGSGGTDFTLTISLSEPEDFAMYYCOQHNEYPLTFGA      100
VK1        51  GSTLQSGIFARFSGSGGTDFTLTISLSEPEDFAMYYCOQHNEYPLTFGQ      100
M1_VK      101  GTKLELK      107
VK1        101  GTKLELK      107
    
```

M1_VK는 M1 항체의 V_k를 지칭하고, VK1은 V_k 변이체 1을 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

V_k 변이체 2:

```

M1_VK      1  DVQITQSPSYLAASPEGITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTKNLLIYS      50
VK2        1  DVQITQSPSSLASLGERATINCRASKSINKYLAWYQOKPGKANKLLIYS      50
M1_VK      51  GSTLQSGIFSRFSGSGGTDFTLTISLSEPEDFAMYYCOQHNEYPLTFGA      100
VK2        51  GSTLQSGIFARFSGSGGTDFTLTISLSEPEDFAMYYCOQHNEYPLTFGQ      100
M1_VK      101  GTKLELK      107
VK2        101  GTKLELK      107
    
```

M1_VK는 M1 항체의 V_k를 지칭하고, VK2는 V_k 변이체 2를 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

M1 항-C1q의 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열 및 인간화 VH 변이체 3-4의 아미노산 서열의 정렬

VH 변이체 3:

```

M1_VH      1  QVQLQQPQGAELVRFKASVKLSCKSSGYHFTSYNMHWKQRPQGQLEWIGV      50
VH3        1  QVQLVQSGAELKRFKASVKVSKSSGYHFTSYNMHWKQAPGGQLEWIGV      50
M1_VH      51  IHPNSGSIINYNEKFEKATITVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGER      100
VH3        51  IHPNSGSIINYNEKFEKAVITVDKSTSTAYMELSSLRSRSEDTAVYYCAGER      100
M1_VH      101  DSTEVLPMDWGQGTIVTVSS      121
VH3        101  DSTEVLPMDWGQGTIVTVSS      121
    
```

M1_VH는 M1 항체의 VH를 지칭하고, VH3은 VH 변이체 3을 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

VH 변이체 4:

```

M1_VH      1  QVQLQQPQGAELVRFKASVKLSCKSSGYHFTSYNMHWKQRPQGQLEWIGV      50
VH4        1  QVQLVQSGAELKRFKASVKVSKSSGYHFTSYNMHWVRRQAPGGQLEWIGV      50
M1_VH      51  IHPNSGSIINYNEKFEKATITVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGER      100
VH4        51  IHPNSGSIINYNEKFEKAVITVDKSTSTAYMELSSLRSRSEDTAVYYCAGER      100
M1_VH      101  DSTEVLPMDWGQGTIVTVSS      121
VH4        101  DSTEVLPMDWGQGTIVTVSS      121
    
```

M1_VH는 M1 항체의 VH를 지칭하고, VH4는 VH 변이체 4를 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

도면2b

도면2c

도면2d

M1 항-C1q의 경쇄 가변 영역(V_k)의 아미노산 서열 및 인간화 V_k 변이체 3-4의 아미노산 서열의 정렬

V_k 변이체 3:

```

M1_VK      1  DVOITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTNKLLIYS      50
VK3        1  DVOITQSPSSLASLGERATINCRASKSINKYLAWYQKPGKAPKLLIYS      50
M1_VK      51  GSTLQSGIPSRFSGSGGTDFTLTISLSLEPEDFAMFYCQOHNEYPLTFGA      100
VK3        51  GSTLQSGIPAREFSGSGGTDFTLTISLSLEPEDFAMFYCQOHNEYPLTFGQ      100
M1_VK      101  GTKLELK      107
VK3        101  GTKLEIK      107
    
```

M1_VK는 M1 항체의 V_k를 지칭하고, VK3은 V_k 변이체 3을 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

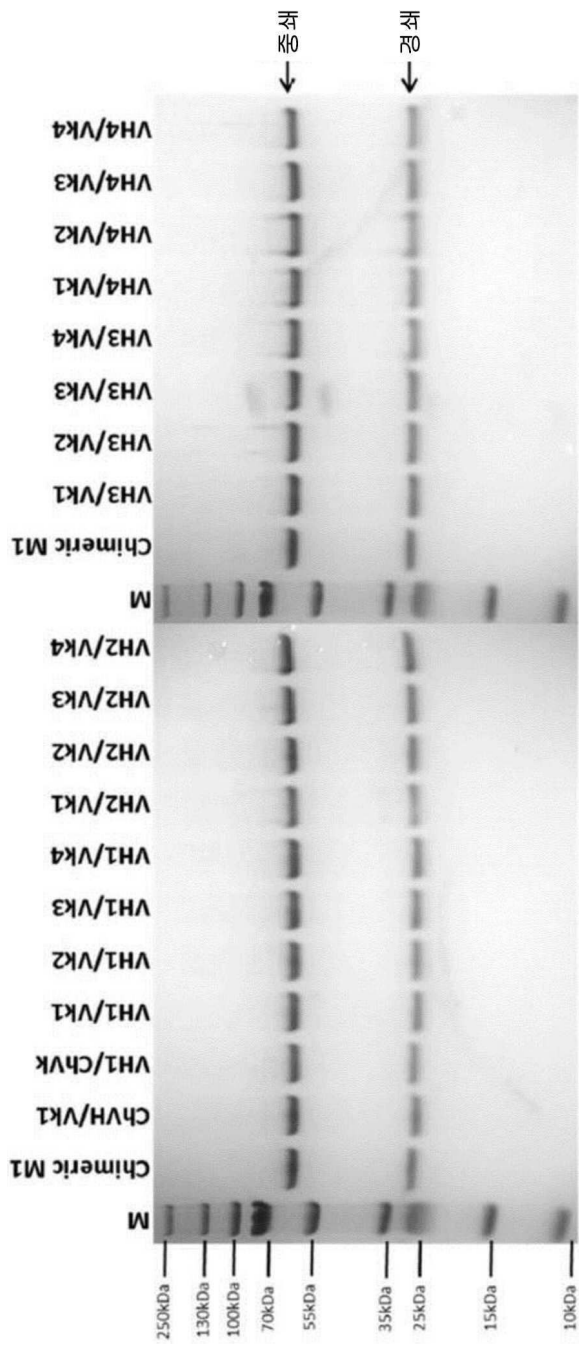
V_k 변이체 4:

```

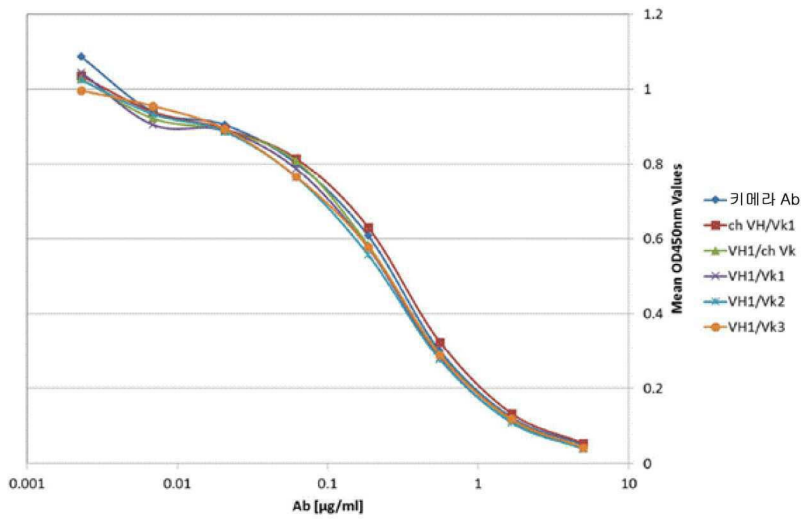
M1_VK      1  DVOITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGKTNKLLIYS      50
VK4        1  DIQLTQSPSSLASLGERATINCRASKSINKYLAWYQKPGKAPKLLIYS      50
M1_VK      51  GSTLQSGIPSRFSGSGGTDFTLTISLSLEPEDFAMFYCQOHNEYPLTFGA      100
VK4        51  GSTLQSGIPAREFSGSGGTDFTLTISLSLEPEDFAMFYCQOHNEYPLTFGQ      100
M1_VK      101  GTKLELK      107
VK4        101  GTKLEIK      107
    
```

M1_VK는 M1 항체의 V_k를 지칭하고, VK4는 V_k 변이체 4를 지칭한다. 3개의 CDR 서열은 볼드체로 표시되어 있다.

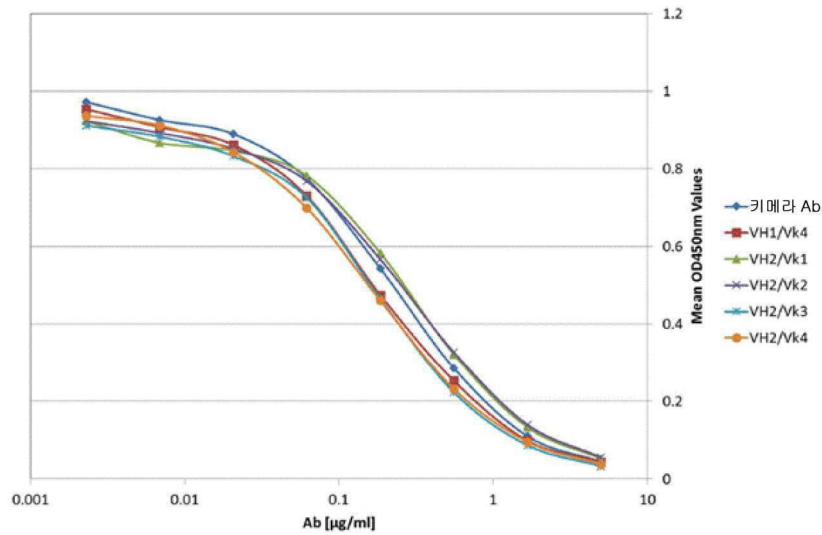
도면3



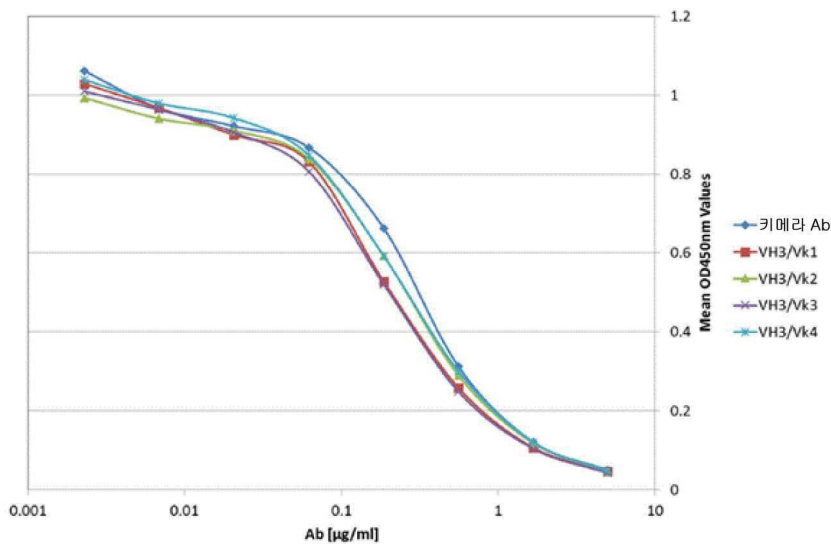
도면4a



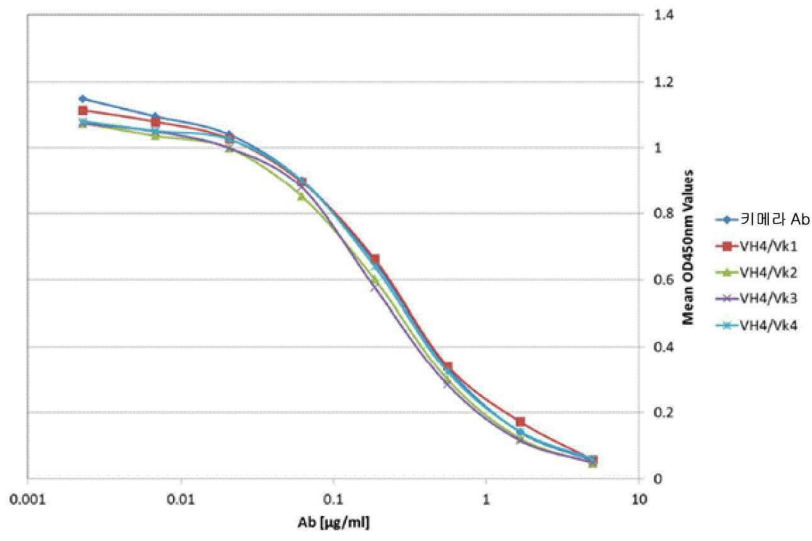
도면4b



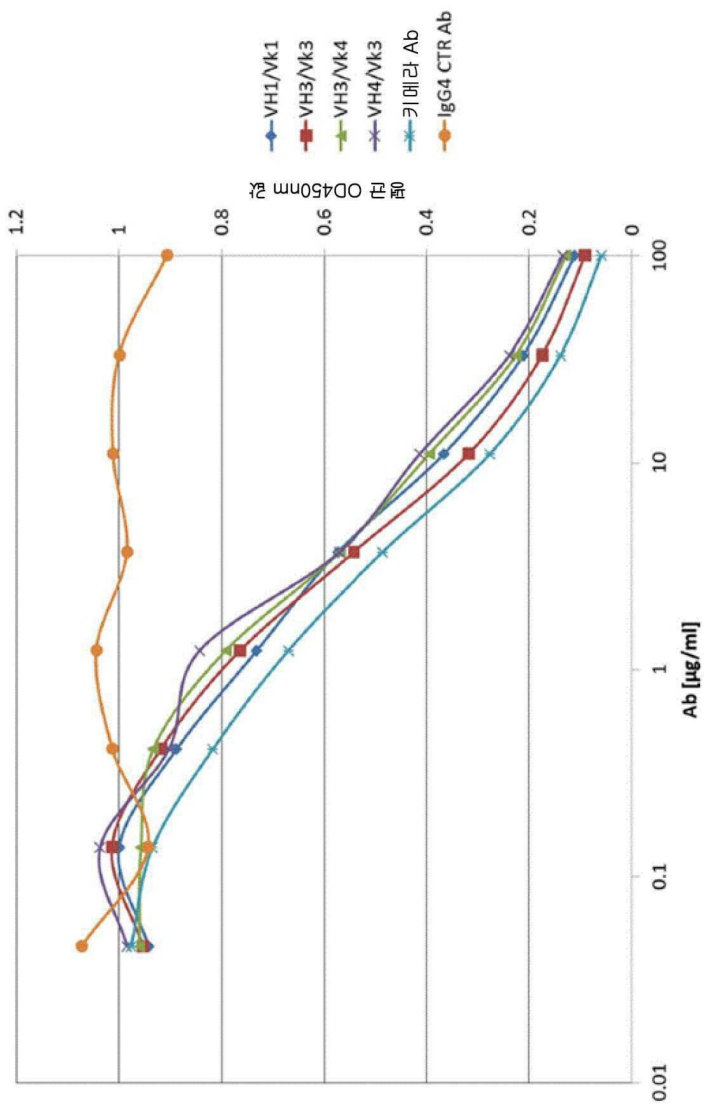
도면4c



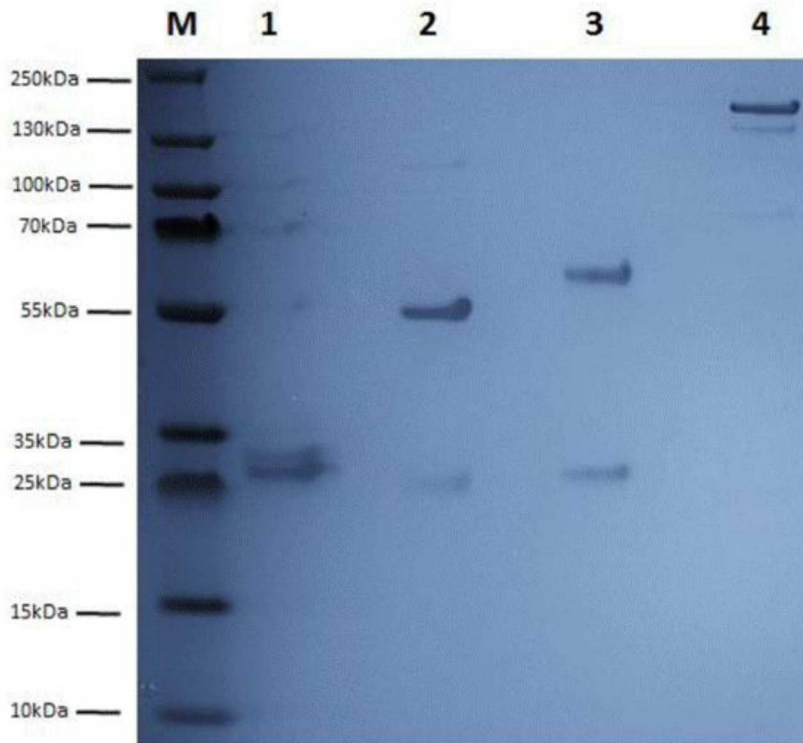
도면4d



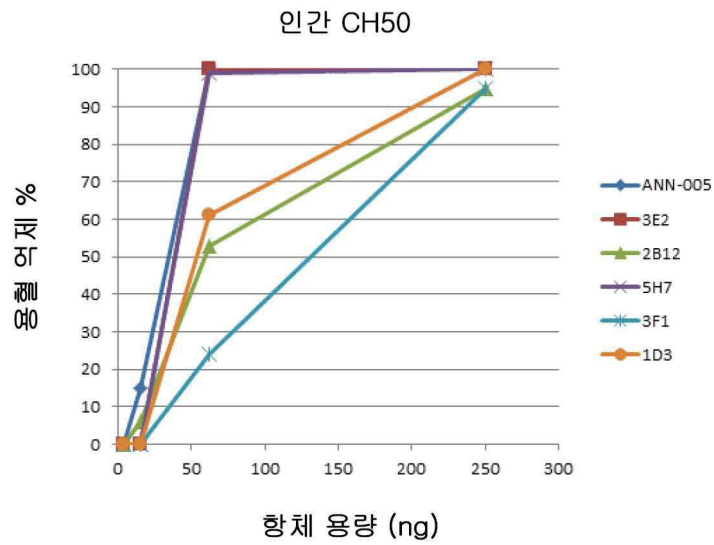
도면5



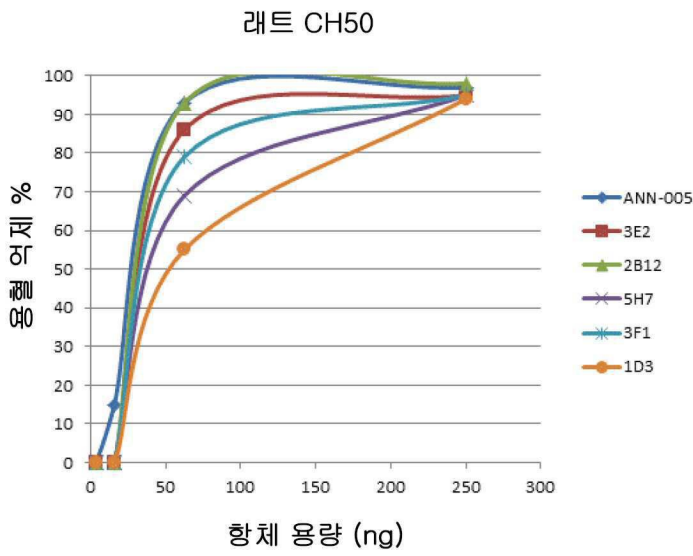
도면6



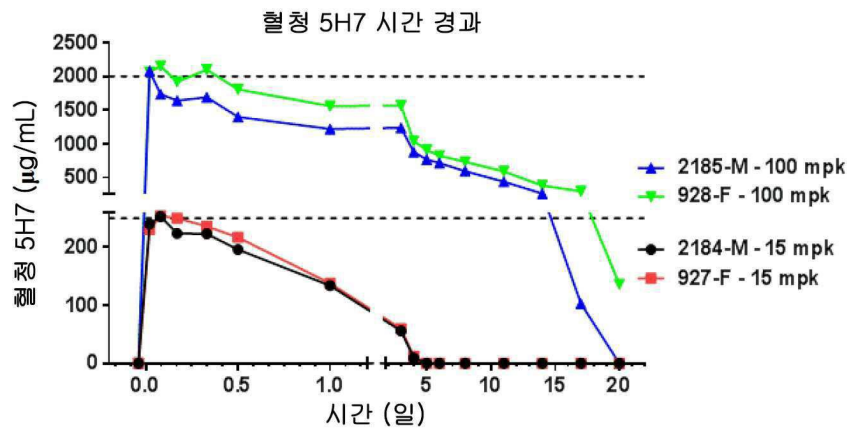
도면7a



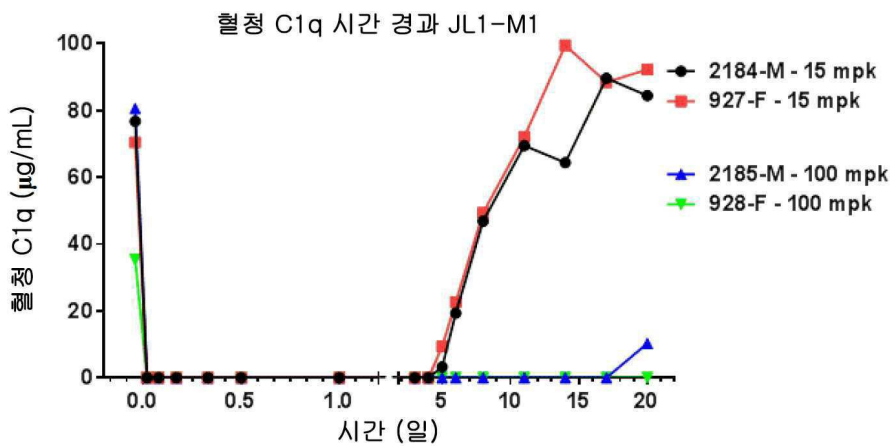
도면7b



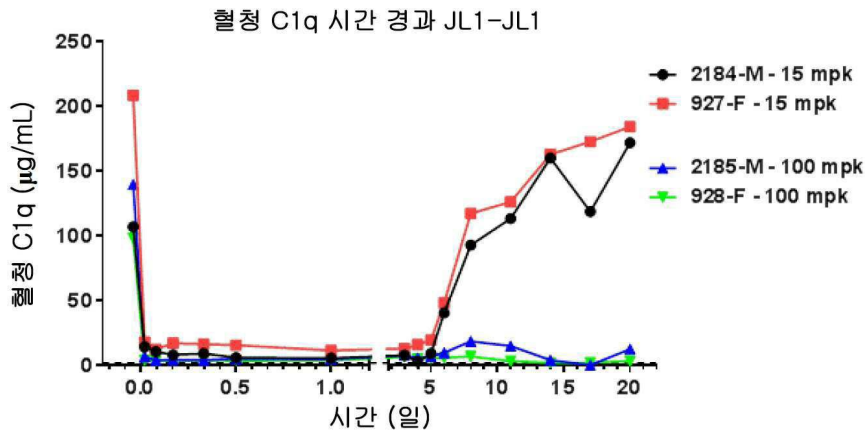
도면8



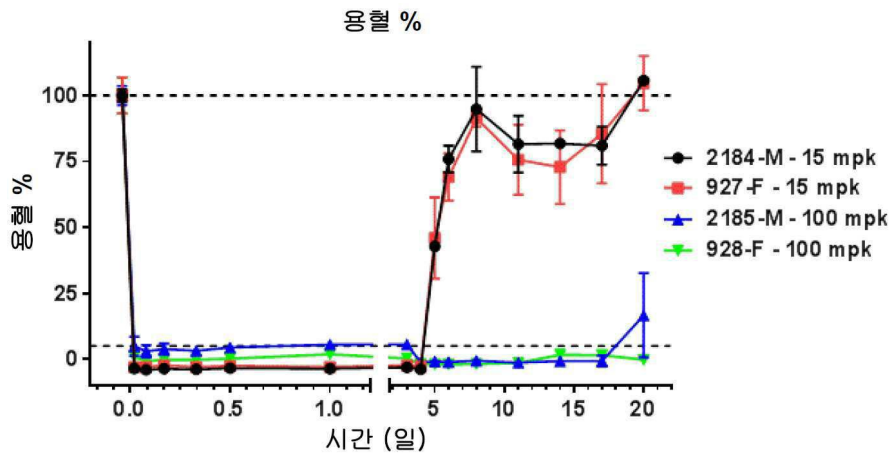
도면9a



도면9b



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ROSENTHAL, ARNON

LEVITEN, MICHAEL

<120> HUMANIZED ANTI-COMPLEMENT FACTOR C1Q ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> ANH-00835

<140> 10-2017-7015260

<141> 2017-07-02

<150> 62/075,793

<151> 2014-11-05

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Glu Ser Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Glu Ser Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys 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 Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

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

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

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

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

<210> 9

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

100 105 110
 Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly
 115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr
 130 135 140

Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 145 150 155 160

Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
 165 170 175

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
 180 185 190

Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
 195 200 205

Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
 210 215 220

His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala
 245

<210> 10

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Met Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr
 20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
 35 40 45

Pro Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45
 Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu

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

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

 195 200 205
 Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr
 210 215 220
 Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
 225 230 235 240
 Leu Leu Phe Pro Asp
 245

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly His Ile
 20 25 30

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro
 20 25

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val
 1 5 10 15

Glu Lys Asp Pro
 20

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val
 1 5 10 15
 Glu Lys

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser

1 5 10 15

Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe

20

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe

1 5 10 15

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly

1 5

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

His Thr Ala Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val

1 5 10 15

Val Thr Phe Cys Gly His Thr

20

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe

1 5

<210> 21

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Glu Arg Asp Ser Thr Glu Val Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

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

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

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

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

Gly Tyr His Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

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

polynucleotide

<400> 27

caggtgcagc tgggtgcagtc aggggctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60
 tcttgcgaagt cttctggcta ccatttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagtg attcatccta atagtggtag tattaactac 180

 aatgagaagt tcgagagcag agccacaatt actgtagaca aatccaccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attattgtgc aggagagaga 300
 gattctacgg aggttctccc tatggactac tggggtcaag gaaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 28

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 28

caggtgcagc tgggtgcagtc aggggctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60

 tcttgcgaagt cttctggcta ccatttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagtg attcatccta atagtggtag tattaactac 180
 aatgagaagt tcgagagcag agtcacaatt actgtagaca aatccaccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attattgtgc aggagagaga 300
 gattctacgg aggttctccc tatggactac tggggtcaag gaaccacggt caccgtctcc 360
 tcag 364

<210> 29

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 29

caggtgcagc tgggtgcagtc aggggctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60

tcttgaagt ctctggcta ccatttcacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagtg attcatccta atagtggtag tattaactac 180
 aatgagaagt tcgagagcag agtcacaatt actgtagaca aatccaccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attattgtgc aggagagaga 300
 gattctacgg aggttctccc tatggactac tggggtcaag gaaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 30

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 31

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 32

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 33

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 33

```

gatgtccaga tcacacagtc tccatcttat cttgctgcat ctctcggaga aagagctact      60
attaattgca gggcaagtaa gagcattaac aaatacttag cctggtatca acagaaacct      120

gggaaaacta ataagctcct tatctactct ggtccactt tgcaatctgg aattccagca      180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttactctca ccatcagtag cctggagcct      240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cataatgaat acccgctcac gttcggtcag      300
gggaccaagc tggagatcaa a                                          321
    
```

<210> 34

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 34

```

gatgtccaga tcacacagtc tccatcttcc ctttctgcat ctctcggaga aagagctact      60

attaattgca gggcaagtaa gagcattaac aaatacttag cctggtatca acagaaacct      120
gggaaagcta ataagctcct tatctactct ggtccactt tgcaatctgg aattccagca      180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttactctca ccatcagtag cctggagcct      240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cataatgaat acccgctcac gttcggtcag      300
gggaccaagc tggagatcaa a                                          321
    
```

<210> 35

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 35
 gatgtccaga tcacacagtc tccatcttcc ctttctgcat ctctcggaga aagagctact 60
 attaattgca gggcaagtaa gagcattaac aaatacttag cctgggatca acagaaacct 120
 gggaaagctc ctaagctcct tatctactct ggtccactt tgcaatctgg aattccagca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttactctca ccatcagtag cctggagcct 240
 gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cataatgaat acccgctcac gttcggtcag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 36

<211> 321

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 36
 gatattcagc tcacacagtc tccatcttcc ctttctgcat ctctcggaga aagagctact 60
 attaattgca gggcaagtaa gagcattaac aaatacttag cctgggatca acagaaacct 120
 gggaaagctc ctaagctcct tatctactct ggtccactt tgcaatctgg aattccagca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttactctca ccatcagtag cctggagcct 240
 gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cataatgaat acccgctcac gttcggtcag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 37

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 37

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

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 38

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

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

20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

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

Arg Val

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 39

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 40

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 42

<211> 1805

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 42

gtaagctttc tggggcaggc cgggcctgac tttggctggg ggcagggagg gggctaaggt 60

gacgcaggtg gcccagcca ggtgcacacc caatgccat gagcccagac actggaccct 120

gcatggacca tcgcgatag acaagaaccg agggcctct gcgcctggg cccagctctg 180

tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgacgt tccaccaagg geccatccgt 240

cttcccctg gcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc acagccgcc tgggctgct 300

ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag 360

cggcgtgac accttcccgg ctgtectaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt 420

ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac acctgcaatg tagatcaaa 480

gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtagagg ccagcacagg gagggagggt 540

gtctgtgga agccaggctc agccctcctg cctggacgca ccccggtgt gcagccccag 600

cccagggcag caaggcaggc cccatctgtc tctcacctg gaggcctctg accaccccac 660
 tcatgctcag ggagagggtc ttctggattt ttccaccagg ctccgggcag ccacaggctg 720
 gatgccccta ccccaggccc tgcgcataca ggggcagggtg ctgctcag acctgccaag 780
 agccatatcc gggaggacc tgcctctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca 840
 ctccctcage ttagacacct tctctctcc cagatctgag taactccaa tcttctctt 900

 gcagagtcca aatatggtcc cccatgceca ccatgcccag gtaagccaac ccaggcctcg 960
 ccctccagct caaggcggga cagggtgccct agagtagcct gcatccaggg acaggcccca 1020
 gccgggtgct gacgcatcca cctccatctc ttctcagca cctgagttcg aggggggacc 1080
 atcagcttcc ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga 1140
 ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta 1200
 cgtggatggc gtggaggtc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag 1260
 cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga 1320

 gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtctctc atcgagaaaa ccatctccaa 1380
 agccaaagggt gggaccacag ggggtcgcagg gccacatgga cagaggtcag ctccggcccac 1440
 cctctgccct gggagtgacc gctgtgccaa cctctgtccc tacagggcag ccccagagac 1500
 cacaggtgta cacctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 1560
 cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatgccctg ggagtgggag agcaatgggc 1620
 agccggagaa caactacaag accacgctc cctgtctgga ctccgacggc tccttctcc 1680
 tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct 1740

 ccgtgatgca ttaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg 1800
 gtaaa 1805

 <210> 43
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 43
 ctccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgcctg ctccaggagc acctccgaga 60
 gcacagccgc cctgggctgc ctggccaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag 180

gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct 240

acacctgcaa thtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttg 294

<210> 44

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

agtccaaata tggccccca tgcccacat gccag 36

<210> 45

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

cacctgagtt cgagggggga ccatcagtct tctgttccc cccaaaacce aaggacactc 60

tcatgatctc cggaccctt gaggtcacgt gctgggtggt ggacgtgagc caggaagacc 120

ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gctgggaggt gcataatgcc aagacaaagc 180

cgcgaggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc 240

aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagc ctcccgtcct 300

ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag 330

<210> 46

<211> 320

<212> DNA

<213>
Artificial Sequence

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

<400> 46

ggcagccccg agagccacag gtgtacacc tgeccccatc ccaggaggag atgaccaaga 60

accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt 120

gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg 180

acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga	240
atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc	300
tctccctgtc tctgggtaaa	320