



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0050950  
(43) 공개일자 2007년05월16일

(21) 출원번호 10-2007-7005374  
(22) 출원일자 2007년03월07일  
심사청구일자 없음  
번역문 제출일자 2007년03월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/031907  
국제출원일자 2005년09월07일

(87) 국제공개번호 WO 2006/029224  
국제공개일자 2006년03월16일

(30) 우선권주장 60/607,909 2004년09월08일 미국(US)  
60/666,553 2005년03월30일 미국(US)

(71) 출원인 제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 아쉬케나지, 아비, 제이.  
미국 94402 캘리포니아주 산 마테오 테리타운 스트리트 1456

(74) 대리인 장수길  
김영

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 사멸 수용체 리간드 및 CD20 항체의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 암 및 면역 관련 질환과 같은 상태를 치료하기 위해 사멸 수용체 리간드, 예컨대 Apo-2 리간드/TRAIL 폴리펩티드 또는 사멸 수용체 항체, 및 CD20 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 실시양태는 CD20 항체와 조합하여 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체, 예컨대 DR5 항체 및 DR4 항체를 사용하는 방법을 포함한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

포유동물의 암 세포를 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체에 노출시키는 것을 포함하는, 암 세포의 치료 방법.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 1-281 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.

## 청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 것인 방법.

## 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 암 세포를 생체내에서 상기 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체에 노출시키는 것인 방법.

## 청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 암 세포가 림프종 세포인 방법.

## 청구항 6.

제1항에 있어서, 암 세포를 추가로 하나 이상의 성장 억제제에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

## 청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 세포를 추가로 방사선에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

## 청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 CHO 세포, 효모 세포 및 이. 콜라이 (*E. coli*)로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 숙주 세포에서 발현된 것인 방법.

## 청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 폴리에틸렌 글리콜 분자와 연결된 것인 방법.

## 청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 CD20 항체가 모노클로날 항체인 방법.

## 청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 CD20 항체가 리톡시맙 항체인 방법.

## 청구항 12.

포유동물에게 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 면역 관련 질환의 치료 방법.

## 청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 1-281 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.

## 청구항 14.

제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 것인 방법.

## 청구항 15.

제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 CHO 세포, 효모 세포 및 이. 콜라이로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 숙주 세포에서 발현된 것인 방법.

## 청구항 16.

제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 폴리에틸렌 글리콜 분자와 연결된 것인 방법.

## 청구항 17.

제12항에 있어서, 상기 면역 관련 질환이 류마티스성 관절염 또는 다발성 경화증인 방법.

## 청구항 18.

제12항에 있어서, 상기 CD20 항체가 모노클로날 항체인 방법.

## 청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 CD20 항체가 리톡시맙 항체인 방법.

## 청구항 20.

제1항 또는 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

## 청구항 21.

제1항 또는 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체가 동시에 투여되는 것인 방법.

## 명세서

## 기술분야

본 발명은 사멸 수용체 리간드 및 CD20 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 다양한 병리학 적 장애, 예컨대 암 및 면역 관련 질환을 치료하기 위한, CD20 항체와 조합으로 Apo-2 리간드/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

종양 괴사 인자 (TNF) 상위계열에 속한 여러 리간드 및 수용체는 당업계에서 확인되었다. 상기 리간드에는 종양 괴사 인자-알파 ("TNF-알파"), 종양 괴사 인자-베타 ("TNF-베타" 또는 "림포톡신-알파"), 림포톡신-베타 ("LT-베타"), CD30 리간드, CD27 리간드, CD40 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, LIGHT, Apo-1 리간드 (Fas 리간드 또는 CD95 리간드로도 언급됨), Apo-2 리간드 (Apo2L 또는 TRAIL로도 언급됨), Apo-3 리간드 (TWEAK로도 언급됨), APRIL, OPG 리간드 (RANK 리간드, ODF, 또는 TRANCE로도 언급됨), 및 TALL-1 (BlyS, BAFF 또는 THANK로도 언급됨)이 있다 (예를 들어, 문헌 [Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430 (2002)]; [Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998)]; [Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000)]; [Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411]; [Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001)]; [Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995)]; [Schmid et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986)]; [Dealtry et al., Eur. J. Immunol., 17:689 (1987)]; [Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996)]; [Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995)]; [Browning et al., Cell, 72:847-856 (1993)]; [Armitage et al. Nature, 357:80-82 (1992)], WO 97/01633 (1997년 1월 16일자로 공개됨); WO 97/25428 (1997년 7월 17일자로 공개됨); [Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998)]; [Chicheportiche et al., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)]; [Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998)]; WO 98/28426 (1998년 7월 2일자로 공개됨); WO 98/46751 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 98/18921 (1998년 5월 7일자로 공개됨); [Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)]; [Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999)]; [Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999)]; 및 [Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)] 참조).

상기 TNF 계열 리간드에 의해 매개되는 다양한 세포 반응의 유도는 전형적으로 특이 세포 수용체와의 결합에 의해 개시된다. 모든 경우 그런 것은 아니지만, 일부 TNF 계열 리간드는 결합하여 세포 표면 "사멸 수용체"를 통해 다양한 생물학적 활성을 유도하여 카스파제, 또는 세포 사멸 또는 아폽토시스 (apoptosis) 경로를 수행하는 효소를 활성화시킨다 (문헌 [Salvesen et al., Cell, 91:443-446 (1997)]). 현재까지 확인된 TNF 수용체 상위계열의 구성원은 TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (Apo-1 또는 CD95로도 언급됨), DR4 (TRAIL-R1로도 언급됨), DR5 (Apo-2 또는 TRAIL-R2로도 언급됨), DcR1, DcR2, 오스테오프로테게린 (OPG), RANK 및 Apo-3 (DR3 또는 TRAMP로도 언급됨)이다 (예를 들어, 문헌 [Ashkenazi, Nature Reviews, 2:420-430 (2002)]; [Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998)]; [Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000)]; [Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997)]; [Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411]; [Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001)]; [Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995)]; [Hohman et al., J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989)]; [Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990)]; 유럽 특허 제417,563호 (1991년 3월 20일자로 공개됨); [Loetscher et al., Cell, 61:351 (1990)]; [Schall et al., Cell, 61:361 (1990)]; [Smith et al., Science, 248:1019-1023 (1990)]; [Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991)]; [Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)]; [Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403-1410 (1989)]; [Mallett et al., EMBO J., 9:1063-1068 (1990)]; [Anderson et al., Nature, 390:175-179 (1997)]; [Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)]; [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)]; [Pan et al., Science, 277:815-818 (1997)]; [Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997)]; [Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997)]; [Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997)]; [Tsuda et al., BBRC, 234:137-142 (1997)]; [Nocentini et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:6216-6221 (1997)]; [vonBulow et al., Science, 278:138-141 (1997)] 참조).

이들 TNF 수용체 계열 구성원의 대부분은 세포외 영역, 막횡단 영역 및 세포내 영역을 비롯한 전형적인 구조의 세포 표면 수용체를 공유하는 반면, 다른 것은 천연에서 막횡단 도메인 및 세포내 도메인이 없는 가용성 단백질로서 발견된다. 전형적인 TNFR의 세포외 부분은 NH<sub>2</sub>-말단에서 시작하여 다중 시스테인-풍부 도메인 (CRD)의 반복 아미노산 서열 패턴을 함유한다.

Apo-2L 또는 TRAIL로 언급되는 리간드는 수년 전 사이토카인의 TNF 계열의 구성원으로서 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995)]; [Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996)]; WO 97/01633; WO 97/25428; 미국 특허 제5,763,223호 (1998년 6월 9일자로 허여됨); 동 제6,284,236호 (2001년 9월 4일자로 허여됨) 참조). 전장 천연 서열 인간 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드는 아미노산 281개 길이의 제II형 막횡단 단백질이다. 일부 세포는 상기 폴리펩티드의 세포외 영역을 효소로 절단하여, 천연 가용성 형태의 상기 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다 (문헌 [Mariani et al., *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)]). 가용성 형태의 Apo2L/TRAIL을 결정학적으로 연구하여 TNF 및 다른 관련 단백질의 구조와 유사한 동중삼량체 구조를 밝혀냈다 (문헌 [Hymowitz et al., *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999)]; [Cha et al., *Immunity*, 11:253-261 (1999)]; [Mongkolsapaya et al., *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999)]; [Hymowitz et al., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]). 그러나, Apo2L/TRAIL은 다른 TNF 계열 구성원들과는 달리, (동중삼량체 내의 각 서브유닛의 위치 230에서) 3개 시스테인 잔기가 아연 원자와 함께 배위 결합하고, 상기 아연 결합이 삼량체 안정성과 생물학적 활성에 있어 중요하다는 점에서 독특한 구조적 특징을 갖는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Hymowitz et al., 상기 문헌]; [Bodmer et al., *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)]).

하기 문헌에서, Apo2L/TRAIL은 자가면역 질환 (예컨대, 류마티스성 관절염)을 비롯한 면역계 조정에서 소정의 역할을 담당할 수 있다는 사실이 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Thomas et al., *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998)]; [Johnsen et al., *Cytokine*, 11:664-672 (1999)]; [Griffith et al., *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999)]; [Song et al., *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)] 참조).

가용성 형태의 Apo2L/TRAIL은 또한 다양한 암 세포, 예를 들어 결장, 폐, 유방, 전립선, 방광, 신장, 난소 및 뇌종양 뿐만 아니라 흑색종, 백혈병, 및 다발성 골수종에서 아파토시스를 유도하는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Wiley et al., 상기 문헌]; [Pitti et al., 상기 문헌]; 미국 특허 제6,030,945호 (2000년 2월 29일자로 허여됨); 동 제6,746,668호 (2004년 6월 8일자로 허여됨); [Rieger et al., *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998)]; [Ashkenazi et al., *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999)]; [Walczak et al., *Nature Med.*, 5:157-163 (1999)]; [Keane et al., *Cancer Research*, 59:734-741 (1999)]; [Mizutani et al., *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999)]; [Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999)]; [Yu et al., *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000)]; [Chinnaiyan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)] 참조). 쥐과동물 종양 모델에서의 생체내 연구는 추가로 Apo2L/TRAIL이 단독으로, 또는 화학요법 또는 방사선 요법과 조합으로 실질적인 항-종양 효과를 보일 수 있음을 제안한다 (예를 들어, 문헌 [Ashkenazi et al., 상기 참조]; [Walczak et al., 상기 참조]; [Gliniak et al., *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999)]; [Chinnaiyan et al., 상기 참조]; [Roth et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999)]; PCT 출원 US/00/15512; PCT 출원 US/01/23691 참조). 많은 유형의 암세포와 달리, 대부분의 정상 인간 세포 유형은 특정 재조합 형태의 Apo2L/TRAIL에 의해 유도되는 아파토시스에 저항하는 것으로 보인다 (문헌 [Ashkenazi et al., 상기 참조]; [Walczak et al., 상기 참조]). 조 (Jo) 등은 폴리히스티딘-표지를 단 가용성 형태의 Apo2L/TRAIL은 정상적인 단리된 인간 간세포에서 (비인간 간세포에서가 아니라) 시험관 내에서 아파토시스를 유도하는 것으로 보고하였다 (문헌 [Jo et al., *Nature Med.*, 6:564-567 (2000)]); [Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)] 참조). 특정 재조합 Apo2L/TRAIL 제제는, 예를 들어 표지 분자의 존재 또는 부재하에, 아연 함량 및 삼량체 함량%에 따라 질병 세포 대 정상 세포에 대한 생화학적 특성 및 생물학적 활성의 측면에서 다양할 수 있다고 여겨진다 (문헌 [Lawrence et al., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001)]; [Qin et al., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)] 참조).

Apo2L/TRAIL은 적어도 5개의 상이한 수용체에 결합하는 것으로 밝혀졌다. Apo2L/TRAIL에 결합하는 적어도 2개의 수용체는 기능성 세포질 사멸 도메인을 포함한다. 한 상기 수용체는 "DR4" (달리 TR4 또는 TRAIL-R1로도 언급됨)로 언급된다 (문헌 [Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997)]; WO 98/32856 (1998년 7월 30일자로 공개됨); WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 12월 7일자로 공개됨); US 6,433,147 (2002년 8월 13일자로 허여됨); US 6,461,823 (2002년 10월 8일자로 허여됨) 및 US 6,342,383 (2002년 1월 29일자로 허여됨) 참조).

Apo2L/TRAIL에 대한 또다른 상기 수용체는 DR5로 언급되었다 (달리 Apo-2; TRAIL-R 또는 TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 또는 KILLER로도 언급됨) (예를 들어, 문헌 [Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997)]); [Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997)]; WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO 98/41629 (1998년 9

월 24일자로 공개됨); [Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997)]; [Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997)]; [Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997)]; WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); 유럽 특허 제870,827호 (1998년 10월 14일자로 공개됨); WO 98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO 99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨); WO 99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨); US 2002/0072091 (2002년 8월 13일자로 공개됨); US 2002/0098550 (2001년 12월 7일자로 공개됨); US 6,313,269 (2001년 12월 6일자로 허여됨); US 2001/0010924 (2001년 8월 2일자로 공개됨); US 2003/01255540 (2003년 7월 3일자로 공개됨); US 2002/0160446 (2002년 10월 31일자로 공개됨); US 2002/0048785 (2002년 4월 25일자로 공개됨); US 6,342,369 (2002년 2월 허여됨); US 6,569,642 (2003년 5월 27일자로 허여됨); US 6,072,047 (2000년 6월 6일자로 허여됨); US 6,642,358 (2003년 11월 4일자로 허여됨); US 6,743,625 (2004년 6월 1일자로 허여됨) 참조). DR4와 같이, DR5는 세포질 사멸 도메인을 포함하고, 리간드 결합시에 (또는 리간드의 활성을 모방하는 아고니스트 항체와 같은 분자와 결합시에) 아파토시스의 신호를 전달할 수 있다고 보고되었다. Apo-2L/TRAIL과 DR5 사이에 형성된 복합체의 결정 구조는 문헌 [Hymowitz et al., Molecular Cell, 4:563-571 (1999)]에 기재되어 있다.

리간드 결합시에, DR4와 DR5는 둘 다 FADD/Mort1로 언급되는 사멸 도메인 함유 어댑터 분자를 통한 아파토시스 개시제 카스파제-8의 동원 및 활성화에 의해 독립적으로 아파토시스를 촉발시킬 수 있다 (문헌 [Kischkel et al., Immunity, 12:611-620 (2000)]; [Sprick et al., Immunity, 12:599-609 (2000)]; [Bodmer et al., Nature Cell Biol., 2:241-243 (2000)]).

Apo2L/TRAIL은 또한 DcR1, DcR2 및 OPG로 언급되는 수용체에 결합하는 것으로 보고되었고, 이는 신호전달의 변환자라기보다는 억제제로서 기능하는 것으로 여겨진다 (예를 들어, DCR1 (TRID, LIT 또는 TRAIL-R3로도 언급됨) (문헌 [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)]; [Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997)]; [McFarlane et al., J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997)]; [Schneider et al., FBBS Letters, 416:329-334 (1997)]; [Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997)]; 및 [Mongkolsapaya et al., J. Immunol., 160:3-6 (1998)]); DCR2 (TRUNDD 또는 TRAIL-R4로도 언급됨) (문헌 [Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997)]; [Pan et al., FEBS Letters, 424:41-45 (1998)]; [Degli-Esposti et al., Immunity, 7:813-820 (1997)]), 및 OPG [Simonet et al., 상기 문헌] 참조). DR4 및 DR5와 달리, DcR1 및 DcR2 수용체는 아파토시스 신호를 전달하지 않는다.

DR4 및/또는 DR5 수용체에 결합하는 특정 항체가 상기 문헌에 보고된 바 있다. 예를 들어, DR4 수용체에 작용하고 특정 포유동물의 세포에서 아고니스트 또는 아파토시스 활성을 갖는 항-DR4 항체가, 예를 들어 문헌 WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 7월 12일자로 공개됨); WO 03/066661 (2003년 8월 14일자로 공개됨)에 기재되어 있다. 또한, 문헌 [Griffith et al., J. Immunol., 162:2597-2605 (1999)]; [Chuntharapai et al., J. Immunol., 166:4891-4898 (2001)]; WO 02/097033 (2002년 12월 2일자로 공개됨); WO 03/042367 (2003년 5월 22일자로 공개됨); WO 03/038043 (2003년 5월 8일자로 공개됨); WO 03/037913 (2003년 5월 8일자로 공개됨)을 참조한다. 특정 항-DR5 항체도 마찬가지로, 예를 들어 문헌 WO 98/51793 (1998년 11월 8일자로 공개됨); [Griffith et al., J. Immunol., 162:2597-2605 (1999)]; [Ichikawa et al., Nature Med., 7:954-960 (2001)]; [Hylander et al., "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada]; WO 03/038043 (2003년 5월 8일자로 공개됨); WO 03/037913 (2003년 5월 8일자로 공개됨)에 기재되어 있다. 또한, DR4와 DR5 수용체 둘 다에 대한 교차반응성을 갖는 특정 항체가 예를 들어, 미국 특허 제6,252,050호 (2001년 6월 26일자로 허여됨)에 기재되어 있다.

CD20 항원 (인간 B-림프구-한정 분화 항원, Bp35로도 명명됨)은 분자량이 대략 35 kD이고 pre-B 및 성숙 B 림프구에 위치해 있는 소수성 막단 단백질이다 (문헌 [Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989)] 및 [Einfeld et al. EMBO J. 7(3):711-717 (1988)]). 상기 항원은 또한 90% 초과 B 세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 발현하나 (문헌 [Anderson et al. Blood 63(6):1424-1433 (1984)]), 조혈 줄기 세포, pro-B 세포, 정상 혈장 세포 또는 다른 정상 조직에서는 나타나지 않는다 (문헌 [Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)]). CD20은 세포 주기 개시 및 분화에 대한 활성화 과정에서 초기 단계를 조절하고 (문헌 [Tedder et al., 상기 참조]), 가능하게는 칼슘 이온 채널로서 기능한다 (문헌 [Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)]). CD20이 B 세포 림프종에서 발현된다는 점에서, 이 항원은 그러한 림프종의 "표적화"를 위한 후보로서 작용할 수 있다.

리툽시맵 (rituximab) (리툽산(등록상표) (RITUXAN(등록상표))) 항체는 유전공학적으로 조작된, CD20 항원에 대한 키메라 쥐과동물/인간 모노클로날 항체이다. 리툽시맵은 미국 특허 제5,736,137호 (1998년 4월 7일자로 허여됨) (Anderson et al.)에서 "C2B8"로 명명된 항체이다. 리툽산(등록상표)은 재발성 또는 난치성인 저급 또는 여포성의 CD20-양성 B 세포 비-호지킨 림프종을 앓는 환자의 치료용으로 지시된다. 시험관내 작용 메커니즘 연구 결과, 리툽산(등록상표)이 인간

보체에 결합하여, 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 통해 림프성 B 세포주를 분해시킨다는 것을 증명하였다 (문헌 [Reff et al. Blood 83 (2): 435-445 (1994)] 및 [Cragg and Marlin, Blood, 103: 2738-2743 (2004)]). 부가적으로, 이는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)에 대한 분석에서 상당한 활성을 갖는다. 보다 최근에, 리툭산(등록상표)은 다른 항-CD19 항체 및 항-CD20 항체와 다르게 삼중수소화 티미딘 혼입 분석법에서 항-증식성 효과를 가지며 아팍토시스를 직접 유도하는 것으로 나타났다 (문헌 [Maloney et al. Blood 88(10): 637a (1996)]). 리툭산(등록상표)과 특정 화학요법 및 독소 사이의 상승 효과도 실험적으로 관찰되었다. 특히, 리툭산(등록상표)은 약물-내성 인간 B 세포 림프종 세포주를 독소 루비신, CDDP, VP-16, 디프테리아 독소 및 리신에 대해 민감해지도록 한다 (문헌 [Demidem et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186 (1997)]). 생체내 전-임상 연구 결과, 리툭산(등록상표)이 아마도 보체 및 세포-매개 과정을 통해 사이노몰거스 원숭이 (cynomolgus monkey)의 말초 혈액, 림프절 및 골수로부터 B 세포를 고갈시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)]).

#### <발명의 요약>

본원은 사멸 수용체 리간드, 예컨대 Apo-2 리간드/TRAIL 폴리펩티드 또는 사멸 수용체 항체, 및 CD20 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 실시양태는 암 세포를 유효량의 Apo2L/TRAIL 및 CD20 항체에 노출시키는 것을 포함하는, 암의 치료 방법을 포함한다. 임의로는, 상기 암 세포는 유효량의 사멸 수용체 항체, 예컨대 아고니스트 DR4 항체 또는 아고니스트 DR5 항체, 및 CD20 항체에 노출된다. 임의로는, 상기 방법에 사용되는 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 양은 치료적으로 상승 효과, 예를 들어 Apo2L/TRAIL 또는 항체를 단일 치료제로서 개별로 사용하여 수득한 항암효과보다 큰 조합 항암효과를 얻기에 유효한 양이다. 상기 방법은 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체를 포유동물 (환자)에게 투여하는 경우의 시험관내 사용 또는 생체내 사용을 포함한다. 임의로는, 상기 방법에서 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체로 치료될 암 세포는 림프종 세포이다.

본 발명의 추가 실시양태는 면역-관련 질환을 앓는 포유동물에게 유효량의 Apo2L/TRAIL 및 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 면역-관련 질환의 치료 방법을 포함한다. 임의로는, 유효량의 사멸 수용체 항체 (예컨대, 아고니스트 DR4 항체 또는 아고니스트 DR5 항체) 및 CD20 항체를 상기 포유동물에게 투여한다. 임의로는, 상기 방법에 사용되는 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 양은 치료적으로 상승 효과를 얻기에 유효한 양이며, 예를 들어 면역-관련 질환을 치료하는 이들의 조합 효과는 단일 치료제로서 Apo2L/TRAIL 또는 항체를 개별적으로 사용할 경우에 얻는 효과보다 크다. 임의로는, 상기 방법에서 면역-관련 질환은 류마티스성 관절염 또는 다발성 경화증이다.

본 발명의 방법은 포유동물로부터 조직 또는 세포 샘플을 수득하는 단계, CD20, DR4, 및/또는 DR5의 발현에 대해 상기 조직 또는 세포를 시험하는 단계, 및 상기 하나 이상의 수용체를 발현하는 상기 조직 또는 세포 샘플 측정시, 상기 포유동물에게 유효량의 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 면역-관련 질환 또는 암과 같은 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 하나 이상의 상기 수용체 발현을 시험하는 방법에서의 상기 단계는 mRNA 발현 검출 분석법 및 면역조직화학 분석법을 비롯한 다양한 분석 포맷으로 수행될 수 있다.

임의로는, 본 발명의 방법은 상기 포유동물에게 유효량의 Apo2L/TRAIL 및/또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체를 투여하는데 추가로 화학요법제 또는 방사선 요법제를 투여하는 것을 포함한다.

본 발명의 실시양태에서는 하기 청구항의 예로 예시된다:

1. 포유동물의 암 세포를 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체에 노출시키는 것을 포함하는, 암 세포의 치료 방법.
2. 제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 1-281 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.
3. 제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 것인 방법.
4. 제1항에 있어서, 상기 암 세포를 생체내에서 상기 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체에 노출시키는 것인 방법.
5. 제1항에 있어서, 상기 암 세포가 림프종 세포인 방법.
6. 제1항에 있어서, 암 세포를 추가로 하나 이상의 성장 억제제에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

7. 제1항에 있어서, 상기 세포를 추가로 방사선에 노출시키는 것을 포함하는 방법.
8. 제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 CHO 세포, 효모 세포 및 이. 콜라이 (*E. coli*)로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 숙주 세포에서 발현된 것인 방법.
9. 제1항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 폴리에틸렌 글리콜 분자와 연결된 것인 방법.
10. 제1항에 있어서, 상기 CD20 항체가 모노클로날 항체인 방법.
11. 제10항에 있어서, 상기 CD20 항체가 리톡시맙 항체인 방법.
12. 포유동물에게 상승적 유효량의 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 면역 관련 질환의 치료 방법.
13. 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 1-281 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.
14. 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 도 1 (서열 1)의 아미노산 114-281을 포함하는 것인 방법.
15. 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 CHO 세포, 효모 세포 및 이. 콜라이로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 숙주 세포에서 발현된 것인 방법.
16. 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드가 폴리에틸렌 글리콜 분자와 연결된 것인 방법.
17. 제12항에 있어서, 상기 면역 관련 질환이 류마티스성 관절염 또는 다발성 경화증인 방법.
18. 제12항에 있어서, 상기 CD20 항체가 모노클로날 항체인 방법.
19. 제18항에 있어서, 상기 CD20 항체가 리톡시맙 항체인 방법.
20. 제1항 또는 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체가 순차적으로 투여되는 것인 방법.
21. 제1항 또는 제12항에 있어서, 상기 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드 및 CD20 항체가 동시에 투여되는 것인 방법.

## 발명의 상세한 설명

달리 정의되지 않는 경우에는, 본원에 사용되는 당업계 의 모든 용어, 표시법 및 다른 과학적 용어법은 본 발명에 속하는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가지는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 명료함 및/또는 용이한 참조를 위해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 용어를 본원에 정의하고, 본원의 이러한 정의의 함유 내용은 당업계에서 일반적으로 이해되는 것 이상의 실질적인 차이를 나타내는 것으로 반드시 해석되지는 않아야 한다. 본원에 설명되거나 참조된 기술 및 절차는 당업자에게 일반적으로 잘 이해되고, 통상적인 방법, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]에 기재된 바와 같은 널리 이용되는 분자 클로닝 방법을 사용하여 적용된다. 적절한 경우, 시판되는 키트 및 시약의 사용을 수반하는 과정은 달리 언급되지 않으면 제조사에 의해 규정된 프로토콜 및(또는) 파라미터에 따라 일반적으로 수행된다.

본 발명의 방법, 키트 및 용도를 설명하기 전에, 본 발명은 물론 변할 수 있는 것으로, 기술된 본원은 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 동물 종 또는 속, 구성체 및 시약으로 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것으로서 단지 첨부되는 청구의 범위에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다.

본원 명세서 및 첨부되는 청구의 범위에서 단수 형태 (부정관사) 및 정관사는 문맥에서 달리 분명하게 언급되지 않으면 복수 형태를 포함함을 알아야 한다.



본원에서 언급되는 모든 간행물은 그 간행물이 그와 관련하여 언급되는 방법 및/또는 물질을 개시하고 설명하기 위해 본원에 참고로 포함된다. 본원에서 언급되는 간행물은 본원의 출원일 이전의 그의 개시 내용에 대해 인용된다. 여기서, 그 어느 것도 본 발명자들이 본 발명의 최우선일 또는 우선일에 의해 간행물보다 선행한다고 말하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 또한, 실제 공개일은 제시된 것과 상이할 수 있고, 별도의 확인을 필요로 할 수 있다.

## 정의

용어 "Apo-2 리간드", "Apo-2L", "Apo2L", "Apo2L/TRAIL", "Apo-2 리간드/TRAIL" 및 "TRAIL"은 도 1에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 잔기 114-281, 95-281, 잔기 92-281, 잔기 91-281, 잔기 41-281, 잔기 39-281, 잔기 15-281, 또는 잔기 1-281을 포함하는 폴리펩티드 서열, 및 상기 서열의 생물학적으로 활성인 단편, 결실, 삽입 또는 치환 변이체를 나타내기 위해 본원에 교환적으로 사용된다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 서열은 도 1의 잔기 114-281을 포함한다. 임의로 도 1의 잔기 92-281 또는 잔기 91-281을 포함한다. Apo-2L 폴리펩티드는 도 1에 도시된 천연 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다. 임의로는, 잔기 Pro119 (도 1)를 코딩하는 코돈은 "CCT" 또는 "CCG"일 수 있다. 임의로는, 단편 또는 변이체는 생물학적으로 활성이고, 상기 서열의 임의의 하나와 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 동일성, 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 상기 정의는 적어도 하나의 그의 천연 아미노산이 또다른 아미노산, 예컨대 알라닌 잔기로 치환된 Apo-2 리간드의 치환 변이체를 포함한다. 임의의 치환 변이체에는 하나 이상의 잔기 치환이 포함된다. 임의의 변이체는 도 1의 천연 서열 Apo-2 리간드 폴리펩티드 서열과 상이하고, 하나 이상의 하기 아미노산 치환을 도 1 중의 잔기 위치(들)에서 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다: S96C; S101C; S111C; R170C; K179C. 상기 정의는 또한 Apo-2 리간드 공급원으로부터 단리되거나 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조된 천연 서열 Apo-2 리간드를 포함한다. 본 발명의 Apo-2 리간드는 WO 97/01633 (1997년 1월 16일자로 공개됨), WO 97/25428 (1997년 7월 17일자로 공개됨), WO 99/36535 (1999년 7월 22일자로 공개됨), WO 01/00832 (2001년 1월 4일자로 공개됨), WO 02/09755 (2002년 2월 7일자로 공개됨), 및 WO 00/75191 (2000년 12월 14일자로 공개됨)에 개시된 Apo-2 리간드 또는 TRAIL로서 나타난 폴리펩티드를 포함한다. 상기 용어는 폴리펩티드의 단량체, 이량체, 삼량체, 육량체 또는 고차 올리고머 형태를 포함하는 Apo-2 리간드의 형태를 일반적으로 나타내는 것으로 사용된다. Apo-2L 서열에서 언급되는 아미노산 잔기의 모든 넘버링은 달리 구체적으로 언급되지 않으면 도 1에 따른 넘버링을 사용한다. 예를 들어, "D203" 또는 "Asp203"은 도 1에 제시된 서열에서 위치 203의 아스파르트산 잔기를 의미한다.

본원에 사용된 용어 "Apo-2 리간드 선택적인 변이체"는 천연 Apo-2 리간드 서열에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고 DR4 수용체 또는 DR5 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 갖는 Apo-2 리간드 폴리펩티드를 나타낸다. 한 실시양태에서는, Apo-2 리간드 변이체는 DR4 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 나타내고, 천연 Apo-2 리간드 서열의 위치 189, 191, 193, 199, 201 또는 209 중의 어느 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시양태에서, Apo-2 리간드 변이체는 DR5 수용체에 대한 선택적인 결합 친화성을 갖고, 천연 Apo-2 리간드 서열의 위치 189, 191, 193, 264, 266, 267 또는 269 중 임의의 하나에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 바람직한 Apo-2 리간드 선택적 변이체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 이는 DR4 수용체에 대한 천연 서열 Apo-2 리간드의 결합 친화도와 동일하거나 이 보다 큰 ( $\geq$ ), DR4 수용체에 대한 결합 친화도를 나타내며, 더욱 바람직하게는, Apo-2 리간드 변이체는 천연 서열 Apo-2 리간드에 의해 나타난 DR5에 대한 결합 친화도 보다 작은 ( $<$ ), DR5 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. DR4 수용체에 대한 상기 Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서 대략 동일하거나 (변하지 않음) 보다 크고 (증가됨), DR5 수용체에 대한 상기 Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서 덜하거나 거의 제거된 것으로 평가된 경우에는, Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 본원의 목적상, DR4 수용체에 "선택적"인 것으로 간주된다. 본 발명의 바람직한 DR4 선택적 Apo-2 리간드 변이체는 (천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서) DR5 수용체에 대한 결합 친화도가 10배 이상 작을 것이며, 더욱 바람직하게는, (천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서) DR5 수용체에 대한 결합 친화도가 100배 이상 작을 것이다. 이러한 Apo-2 리간드 변이체의 각각의 결합 친화도는 당업계에 공지되어 있는 ELISA, RIA 및/또는 BIAcore 분석에 의해 측정되고, 천연 Apo-2L (예컨대, 114-281 형태)의 결합 특성과 비교할 수 있다. 본 발명의 바람직한 DR4 선택적인 Apo-2 리간드 변이체는 포유동물 세포 (바람직하게는, 암 세포) 중 하나 이상의 종류에서 아팍토시스를 유도할 것이고, 이러한 아팍토시스 활성은 당업계 공지된 방법, 예컨대 알라마르 블루(alarmar blue) 또는 크리스탈 바이올렛 분석법에 의해 측정될 수 있다. DR4 선택적인 Apo-2 리간드 변이체는 Apo-2L에 대한 임의의 유인 수용체에 대한 결합 친화도를 변경시키거나 또는 변경시킬 수 없으며, 여기서 상기 유인 수용체는 DcR1, DcR2 및 OPG로 당업계에 나타내고 있다.

추가 바람직한 Apo-2 리간드 선택적 변이체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 이는 DR5 수용체에 대한 천연 서열 Apo-2 리간드의 결합 친화도와 동일하거나 이 보다 큰 ( $\geq$ ), DR5 수용체에 대한 결합 친화도를 나타내며, 더욱 바람직하게는, 이러한 Apo-2 리간드 변이체는 천연 서열 Apo-2 리간드에 의해 나타난 DR4에 대한 결합 친화도 보다 작은

(<), DR4 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. DR5 수용체에 대한 상기 Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서 대략 동일하거나 (변하지 않음) 보다 크고 (증가됨), DR4 수용체에 대한 상기 Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서 작거나 거의 제거된 것으로 평가된 경우에는, Apo-2 리간드 변이체의 결합 친화도가 본원의 목적상, DR5 수용체에 "선택적"인 것으로 간주된다. 본 발명의 바람직한 DR5 선택적 Apo-2 리간드 변이체는 (천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서) DR4 수용체에 대한 결합 친화도가 10배 이상 작을 것이며, 더욱 바람직하게는, (천연 서열 Apo-2 리간드와 비교해서) DR4 수용체에 대한 결합 친화도가 100배 이상 작을 것이다. 이러한 Apo-2 리간드 변이체의 각각의 결합 친화도는 당업계에 공지되어 있는 ELISA, RIA 및/또는 BIAcore 분석에 의해 결정될 수 있고, 천연 Apo-2L (예컨대, 114-281 형태)의 결합 특성과 비교할 수 있다. 본 발명의 바람직한 DR5 선택적인 Apo-2 리간드 변이체는 포유동물 세포 (바람직하게는, 암 세포) 중 하나 이상의 종류에서 아파토시스를 유도할 것이고, 이러한 아파토시스 활성화는 당업계 공지된 방법, 예컨대 알라마르 블루 또는 크리스탈 바이올렛 분석법에 의해 측정될 수 있다. DR5 선택적인 Apo-2 리간드 변이체는 또는 Apo-2L에 대한 임의의 유인 수용체에 대한 결합 친화도를 변경시키거나 또는 변경시킬 수 없으며, 여기서 상기 유인 수용체를 DcR1, DcR2 및 OPG로 당업계에 나타내고 있다.

아미노산 확인은 아미노산의 단일 문자 알파벳 또는 3문자 알파벳을 이용할 수 있다:

Asp D 아스파르트산 Ile I 이소류신

Thr T 트레오닌 Leu L 류신

Ser S 세린 Tyr Y 티로신

Glu E 글루탐산 Phe F 페닐알라닌

Pro P 프롤린 His H 히스티딘

Gly G 글리신 Lys K 리신

Ala A 알라닌 Arg R 아르기닌

Cys C 시스테인 Trp W 트립토판

Val V 발린 Gln Q 글루타민

Met M 메티오닌 Asn N 아스파라긴

용어 "Apo2L/TRAIL 세포의 도메인" 또는 "Apo2L/TRAIL ECD"는 본질적으로 막횡단 도메인 및 세포질 도메인이 존재하지 않는 Apo2L/TRAIL의 형태를 의미한다. 통상적으로, ECD는 1% 미만의 상기 막횡단 도메인 및 세포질 도메인을 가질 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 상기 도메인을 가질 것이다. 본 발명의 폴리펩티드에 대해 확인된 임의의 막횡단 도메인(들)은 소수성 도메인 종류를 확인하기 위해 당업계에서 통상 사용되는 기준에 따라 확인하는 것으로 이해될 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계는 상이할 수 있지만, 가장 가능하게는 초기에 확인된 도메인의 어느 한 말단에 약 5개 이하의 아미노산만큼 상이할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, ECD는 막횡단 도메인 및 세포질 또는 세포내 도메인이 존재하지 않는 (및 막 결합되지 않은) 폴리펩티드의 가용성 세포외 도메인 서열로 이루어질 것이다. Apo-2L/TRAIL의 특정 세포외 도메인 서열은 PCT 공개 WO 97/01633 및 WO 97/25428에 기재되어 있다.

용어 "Apo2L/TRAIL 단량체" 또는 "Apo2L 단량체"는 Apo2L의 세포외 도메인 서열의 공유결합쇄를 의미한다.

용어 "Apo2L/TRAIL 이량체" 또는 "Apo2L 이량체"는 이황 결합을 통해 공유 연결로 결합된 2개의 Apo-2L 단량체를 의미한다. 본원에서 사용되는 상기 용어는 유리 Apo2L 이량체 및 Apo2L의 삼량체 형태 내에 존재하는 (즉, 다른 제3의 Apo2L 단량체와 회합된) Apo2L 이량체를 포함한다.

용어 "Apo2L/TRAIL 삼량체" 또는 "Apo2L 삼량체"는 비공유결합된 3개의 Apo2L 단량체를 의미한다.

용어 "Apo2L/TRAIL 응집체"는 예를 들어 Apo2L/TRAIL의 육량체 및 구량체 형태를 형성하는 Apo2L/TRAIL의 자가회합된 보다 높은 올리고머 형태, 예를 들어 Apo2L/TRAIL 삼량체를 의미하기 위해 사용된다. Apo2L/TRAIL 단량체, 이량

체, 또는 삼량체 (또는 다른 응집체)의 존재 및 양의 측정은 당업계에 공지된 방법 및 분석 (및 시판되는 물질을 사용), 예를 들어 천연 크기 배제 HPLC ("SEC"), 소듐 도데실 술페이트를 사용하여 변형 크기 배제 ("SDS-SEC"), 역상 HPLC 및 모세 관 전기영동을 사용하여 수행할 수 있다.

"Apo-2 리간드 수용체"는 그의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 각각 도 2 및 3에 나타낸 "DR4" 및 "DR5"로서 당업계에 언급되는 수용체를 포함한다. 문헌 [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)]에 "DR4"로 언급되는 TNF 수용체 패밀리를 구성원이 기재되어 있다 (또한 WO 98/32856 (1998년 7월 30일자로 공개됨); WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 12월 7일자로 공개됨); US 6,433,147 (2002년 8월 13일자로 허여됨); US 6,461,823 (2002년 10월 8일자로 허여됨) 및 US 6,342,383 (2002년 1월 29일자로 허여됨) 참조). 문헌 [Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997)] 및 [Pan et al., Science, 277:815-818 (1997)]은 Apo2L/TRAIL에 대한 다른 수용체를 기재한 바 있다 (또한 WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO 98/41629 (1998년 9월 24일자로 공개됨) 참조). 상기 수용체는 DR5로도 언급된다 (상기 수용체는 또한 달리 Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 또는 KILLER로도 언급된 바 있음; 문헌 [Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997)]; [Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997)]; [Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997)]; WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); 유럽 특허 제870,827호 (1998년 10월 14일자로 공개됨), WO 98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO 99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨), WO 99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨); US 2002/0072091 (2002년 8월 13일자로 공개됨); US 2002/0098550 (2001년 12월 7일자로 공개됨); US 6,313,269 (2001년 12월 6일자로 허여됨); US 2001/0010924 (2001년 8월 2일자로 공개됨); US 2003/01255540 (2003년 7월 3일자로 공개됨); US 2002/0160446 (2002년 10월 31일자로 공개됨), US 2002/0048785 (2002년 4월 25일자로 공개됨), US 6,569,642 (2003년 5월 27일자로 허여됨), US 6,072,047 (2000년 6월 6일자로 허여됨), US 6,642,358 (2003년 11월 4일자로 허여됨)). 상기한 바와 같이, Apo-2L에 대한 다른 수용체는 DcR1, DcR2 및 OPG를 포함한다 (문헌 [Sheridan et al., 상기 문헌], [Marsters et al., 상기 문헌] 및 [Simonet et al., 상기 문헌] 참조). 본원에서 사용될 때 용어 "Apo-2L 수용체"는 천연 서열 수용체 및 수용체 변이체를 포함한다. 상기 용어는 인간을 포함하여 다양한 포유동물에서 발현되는 Apo-2L 수용체를 포함한다. Apo-2L 수용체는 다양한 인간 조직 계통에서 자연 발생하는 바와 같이 내인성으로 발현될 수 있거나, 재조합 또는 합성 방법에 의해 발현될 수 있다. "천연 서열 Apo-2L 수용체"는 자연에서 유도되는 Apo-2L 수용체와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 Apo-2L 수용체는 임의의 포유동물의 자연 발생 Apo-2L 수용체의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 천연 서열 Apo-2L 수용체는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생산될 수 있다. 용어 "천연 서열 Apo-2L 수용체"는 구체적으로 수용체의 천연 생성 말단 절단 또는 분비 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열을 포함하는 가용성 형태), 천연 생성 변이체 형태 (예를 들어, 교대 스플라이싱된 형태) 및 천연 생성 대립유전자 변이체를 포함한다. 수용체 변이체는 천연 서열 Apo-2L 수용체의 단편 또는 결실 돌연변이체를 포함할 수 있다. 도 3A는 WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨)에 제시된 인간 DR5의 411개의 아미노산 서열을 보여준다. 인간 DR5의 전사 스플라이스 변이체는 당업계에 공지되어 있다. 상기 DR5 스플라이스 변이체는 WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨)의 도 3B 및 3C에 도시된 인간 DR5의 440개의 아미노산 서열을 코딩한다.

"사멸 수용체 항체"는 종양 괴사 인자 수용체 상위계열의 수용체에 대해 작용하고 아파토티스의 신호를 전달할 수 있는 사멸 도메인을 포함하는 항체 또는 항체들을 일반적으로 의미하기 위해 본원에 사용되고, 상기 항체는 DR5 항체 및 DR4 항체를 포함한다.

"DR5 수용체 항체", "DR5 항체" 또는 "항-DR5 항체"는 적어도 하나의 형태의 DR5 수용체 또는 그의 세포외 도메인에 결합하는 항체를 넓은 의미로 언급하기 위해 사용된다. 임의로는, DR5 항체는 이중 서열 또는 분자에 융합되거나 연결된다. 바람직하게는, 이중 서열은 항체가 보다 고차원의 또는 올리고머 형태의 복합체를 형성하는 것을 허용하거나 돕는다. 임의로는, DR5 항체는 DR5 수용체에 결합하지만, 임의의 추가의 Apo-2L 수용체 (예를 들어, DR4, DcR1 또는 DcR2)에는 결합하거나 교차반응하지 않는다. 임의로는, 항체는 DR5 신호전달 활성의 아고니스트가다.

임의로는, 본 발명의 DR5 항체는 BIAcore 결합 분석으로 측정시에 약 0.1 nM 내지 약 20 mM의 농도에서 DR5 수용체에 결합한다. 임의로는, 본 발명의 DR5 항체는 BIAcore 결합 분석으로 측정시에 약 0.6 nM 내지 약 18 mM의 IC<sub>50</sub> 값을 보인다.

"DR4 수용체 항체", "DR4 항체" 또는 "항-DR4 항체"는 적어도 하나의 형태의 DR4 수용체 또는 그의 세포외 도메인에 결합하는 항체를 가장 넓은 의미로 언급하기 위해 사용된다. 임의로는, DR4 항체는 이중 서열 또는 분자에 융합되거나 연결된다. 바람직하게는, 이중 서열은 항체가 보다 고차원의 또는 올리고머 형태의 복합체를 형성하는 것을 허용하거나 돕는다. 임의로는, DR4 항체는 DR4 수용체에 결합하지만, 임의의 추가의 Apo-2L 수용체 (예를 들어, DR5, DcR1 또는 DcR2)에는 결합하거나 교차반응하지 않는다. 임의로는, 항체는 DR4 신호전달 활성의 아고니스트가다.

임의로는, 본 발명의 DR4 항체는 BIAcore 결합 분석으로 측정시에 약 0.1 nM 내지 약 20 mM의 농도에서 DR4 수용체에 결합한다. 임의로는, 본 발명의 DR4 항체는 BIAcore 결합 분석으로 측정시에 약 0.6 nM 내지 약 18 mM의 IC50 값을 보인다.

용어 "아고니스트"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 시험관내에서, 계내에서 (in situ) 또는 생체내에서 Apo2L/TRAIL, DR4 또는 DR5의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 향상, 자극 또는 활성화시키는 임의의 분자를 포함한다. Apo2L/TRAIL의 DR4 또는 DR5에 대한 상기 생물학적 활성 결합의 예는 아팍토시스 및 문헌에 추가로 보고된 것을 포함한다. 아고니스트는 직접 또는 간접 방식으로 기능할 수 있다. 예를 들어, 아고니스트는 수용체 활성화 또는 신호 전달을 야기하는 DR4 또는 DR5에 대한 그의 직접 결합의 결과로서, 시험관내에서, 계내에서 또는 생체내에서 DR4 또는 DR5의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 향상, 자극 또는 활성화시키는 기능을 수행할 수 있다. 아고니스트는 또한, 예를 들어 DR4 또는 DR5 활성화 또는 신호 전달을 추후 야기하는 다른 이펙터 분자의 자극의 결과로서, 시험관내에서, 계내에서 또는 생체내에서 DR4 또는 DR5의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 향상, 자극 또는 활성화시키는 기능을 간접적으로 수행할 수 있다. 아고니스트가 DR4 또는 DR5 활성화 또는 활성을 향상 또는 증가시키는 기능을 간접적으로 수행하는 인헨서 분자로서 기능할 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 아고니스트는 포유동물에서 내인성 Apo-2L의 활성을 향상시킬 수 있다. 이것은, 예를 들어 DR4 또는 DR5의 예비복합체화 또는 DR4 또는 DR5 수용체와 각각의 리간드 복합체의 안정화 (예를 들어, Apo-2L과 DR4 또는 DR5 사이에 형성된 천연 복합체의 안정화)에 의해 달성될 수 있다.

본원에 사용되는 용어 "DR4" 및 "DR4 수용체"는 문헌 [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)]; WO 98/32856 (1998년 7월 30일자로 공개됨); 미국 특허 제6,342,363호 (2002년 1월 29일자로 허여됨); 및 WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨)에 기재된 수용체의 전장 및 가용성 세포외 도메인 형태를 나타낸다. DR4 수용체의 전장 아미노산 서열은 본원 도 2에 제공된다.

본원에 사용되는 용어 "DR5" 및 "DR5 수용체"는 문헌 [Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997)]; [Pan et al., Science, 277:815-818 (1997)], 미국 특허 제6,072,047호 (2000년 6월 6일자로 허여됨); 동 제6,342,369호, WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO 98/41629 (1998년 9월 24일자로 공개됨); [Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997)]; [Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997)]; [Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997)]; WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); 유럽 특허 제870,827호 (1998년 10월 14일자로 공개됨); WO 98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO 99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨); WO 99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨)에 기재된 수용체의 전장 및 가용성 세포외 도메인을 나타낸다. DR5 수용체는 또한 Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 또는 KILLER로서 당업계에서 나타나어 왔다. 본원에 사용되는 용어 DR5 수용체에는 도 3A에 제공하는 전장 411개 아미노산 폴리펩티드 및 도 3B-C에 제공하는 전장 440개 아미노산 폴리펩티드가 포함된다.

본원에 사용되는 용어 "폴리올"은 넓게 다가 알콜 화합물을 나타낸다. 폴리올은 예를 들어 임의의 수용성 폴리(알킬렌 옥시드) 중합체일 수 있고, 선형 또는 분지형 쇄를 가질 수 있다. 바람직한 폴리올에는 화학적 기, 예컨대 1 내지 4개의 탄소를 갖는 알킬기를 갖는 하나 이상의 히드록실 위치에서 치환되는 것이 포함된다. 전형적으로, 폴리올은 폴리(알킬렌 글리콜), 바람직하게는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이다. 그러나, 당업자는 다른 폴리올, 예컨대 폴리(프로필렌 글리콜) 및 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜 공중합체가 PEG에 대해 본원에 기재된 접합에 대한 기술을 사용하여 사용될 수 있다는 것을 인식한다. 본 발명의 폴리올에는 당업계에 널리 공지된 것 및, 예컨대 시판되는 공급원으로부터 공공연하게 입수가능한 것이 포함된다.

용어 "접합"은 함께 결합 또는 연결되는 것을 의미하는 가장 넓은 의미에 따라 본원에 사용된다.

용어 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 없는 리간드 또는 수용체 형태를 나타낸다. 통상적으로, 가용성 ECD는 이러한 막횡단 및/또는 세포질 도메인을 1% 미만으로 보유할 것이며, 바람직하게는 상기 도메인들을 0.5% 미만으로 보유할 것이다.

용어 "2가의 금속 이온"이란 2개의 양 전하를 가진 금속 이온을 일컫는 것이다. 본 발명에서 사용하기 위한 2가의 금속 이온의 예는 아연, 코발트, 니켈, 카드뮴, 마그네슘 및 망간을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수 있는 이러한 금속의 특정한 형태는 상기 언급된 2가의 금속 이온의 염산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 및 황산염 형태와 같은 염 형태 (예를 들어, 제약상 허용되는 염 형태)를 포함한다. 본 발명에 기재된 2가의 금속 이온은 바람직하게는 예를 들어 (1) 원

하는 기간에 걸쳐 Apo-2L 삼량체의 보관 안정성을 향상시키거나, (2) 재조합 세포 배양 또는 정제 방법에서 Apo-2L 삼량체의 생성 또는 수율을 향상시키거나, (3) Apo-2L 삼량체의 용해도를 증가 (또는 응집을 감소)시키거나, 또는 (4) Apo-2L 삼량체 형성을 증가시키기에 충분한 농도 또는 양 (예를 들어, 유효량)으로 사용된다.

"단리된"이 본원에 개시된 다양한 단백질을 기재하기 위해 사용되는 경우, 이는 천연 환경 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 단백질을 의미한다. 상기 단백질의 천연 환경의 오염 성분은 상기 단백질이 진단 또는 치료에 사용되는 것을 전형적으로 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 단백질은 (1) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열화기의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기를 15개 이상 얻기에 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시에 블루 (Coomassie Blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 비-환원 또는 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제할 것이다. 단리된 단백질은 재조합 세포내에서 제자리 단백질을 포함하는데, 이는 단백질 천연 환경 성분이 1종 이상 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 단백질은 하나 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

"단리된" 핵산 분자는 상기 핵산의 천연 공급원 내에서 통상적으로 결합되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 환경과는 다르게 존재한다. 따라서, 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 Apo-2 리간드 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 Apo-2 리간드 핵산 분자는, 예를 들어 천연 세포의 경우와 상이한 염색체 위치에 존재하며 통상적으로 Apo-2 리간드를 발현하는 세포에 함유된 Apo-2 리간드 핵산 분자를 포함한다.

본원에서 확인된 서열에 대해 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭을 도입시킨 후 Apo-2 리간드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성에 필요한 할당 알고리즘을 포함하고, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있는, 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 달성할 수 있다. 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값은 그 공급 코드가 미국 저작권 (United States Copyright Office) (미국 20559 워싱턴 디. 씨. 소재)에서 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 TXU510087 하에 등록된 제넨테크사 (Genentech, Inc.) 소유의 서열 비교 컴퓨터 프로그램 "ALIGN-2"를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크사 (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재)로부터 입수가 가능하다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들어, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 예비 서열 또는 분비 유도서열에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현될 경우 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위가 번역을 촉진하도록 위치할 경우, 이는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접함을 의미하고, 분비 유도서열의 경우에 인접하고 관독 단계에서 인접함을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한효소 절단 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 상기 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 연결기가 통상의 용례에 따라 사용된다.

"B 세포"는 골수 내에서 성숙되는 림프구이며, 여기에 면역반응 비노출 B 세포, 면역기억 B 세포, 또는 이펙터 B 세포 (형질 세포)가 포함된다. 본원의 B 세포는 정상 또는 비-악성 B 세포일 수 있다.

"CD20" 항원은 말초 혈액 또는 림프성 기관으로부터 얻은 B 세포 중 90%가 넘는 세포의 표면에서 발견되는 약 35 kDa의 비-글리코실화 인단백질이다. CD20은 정상 B 세포 및 악성 B 세포 모두에 존재하지만, 줄기 세포에서는 발현되지 않는다. 문헌상의 CD20의 다른 이름으로는 "B-림프구-제한 항원" 및 "Bp35"가 있다. CD20 항원은, 예를 들어 문헌 [Clark *et al.* PNAS (USA) 82:1766 (1985)]에 기술되어 있다.

CD20 항원에 결합하는 항체의 예로는, 지금은 "리툽시맵" ("리툽산(등록상표)")으로 불리는 "C2B8" (미국 특허 제 5,736,137호); "Y2B8" 또는 "이브리투모맵 티우세탄 (Ibritumomab Tiuxetan)" 제발린 (ZEVALIN(등록상표))으로 명명된 이트륨-[90]-표지된 2B8 쥐과동물 항체 (이텍 파마세우티칼스, 인크. (Idex Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수가 가능함) (미국 특허 제 5,736,137호; ATCC에 고유번호 HB11388로 1993년 6월 22일자로 기탁된 2B8); "토시투모맵

(Tositumomab)"으로도 불리는 쥐과동물 IgG2a "B1" (임의로  $^{131}\text{I}$ 로 표지되어 " $^{131}\text{I}$ -B1" 항체 (요오드 I131 토시투모맵, 벅사르(상표명) (BEXXAR(상표명))를 생성함)(코릭사(Corixa)로부터 상업적으로 입수가 가능함)(또한, 미국 특허 제 5,595,721호 참조); 쥐과동물 모노클로날 항체 "1F5" (문헌 [Press *et al. Blood* 69(2):584-591 (1987)]) 및 "프레임워크 패치된 (framework patched)" 또는 인간화 1F5 (WO 03/002607, 룡(Leung); ATCC 기탁번호 HB-96450); 쥐과동물 2H7 및 키메라 2H7 항체 (미국 특허 제 5,677,180호); 인간화 2H7; B 세포의 세포막 중의 CD20 분에 표적화된 HUMAX-CD20(상표명) 전체 인간 고-친화성 항체 (덴마크 소재의 젠마브(Genmab); 예를 들어, 문헌 [Glennie and van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003)] 및 [Cragg *et al., Blood* 101: 1045-1052 (2003)] 참조); WO 04/035607 (문헌 [Teeling *et al.*])에 나타난 인간 모노클로날 항체; AME-133(상표명) 항체 (Applied Molecular Evolution); A20 항체 또는 그의 변이체, 예컨대 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각, cA20 또는 hA20) (US 2003/0219433, 이뮤노메딕스(Immunomedics)); 및 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 (국제 백혈구 타이핑 워크숍 (International Leucocyte Typing Workshop)에서 입수할 수 있음) (문헌 [Valentine *et al., In: Leukocyte Typing* III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))]. 본원에 바람직한 CD20 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 CD20 항체, 더 바람직하게는 리톡시맵, 인간화 2H7, 키메라 또는 인간화 A20 항체 (이뮤노메딕스), 및 HUMAX-CD20(상표명) 인간 CD20 항체 (젠마브)이다.

본원에서 사용된 용어 "리톡시맵" 또는 "리톡산(등록상표)"은 CD20에 결합하는 능력을 보유하는 그의 단편을 포함하여 유전공학적으로 조작된 CD20 항원에 대한 키메라 쥐과동물/인간 모노클로날 항체를 의미하며, 이는 미국 특허 제 5,736,137 호에서 "C2B8"로 지칭되었다.

순수하게 본원의 목적상 달리 지시가 없는 한, "인간화 2H7"은 인간화 CD20 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 나타내며, 여기서 항체는 영장류 B 세포를 생체내에서 격감시키는데 효과적이고, 항체가 항-인간 CD20 항체로부터의 하나 이상의 CDR H3 서열에서 그의 H 쇠 가변 영역 ( $V_H$ ), 이어서 인간 중쇄 하위군 III ( $V_{HIII}$ )의 인간 동일 프레임워크 (FR) 잔기를 포함한다.

바람직한 인간화 2H7은 하기 가변 경쇄 서열 및 가변 중쇄 서열을 포함하는 무손상 항체 또는 항체 단편이다:

#### <가변 경쇄 서열>

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (서열 7)

#### <가변 중쇄 서열>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLVWGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKS  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSYWFYDVGQGTLLTVSS (서열 8)

인간화 2H7 항체가 무손상 항체인 경우, 바람직하게는 경쇄 아미노산 서열인

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVD  
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 9) ; 및

#### 중쇄 아미노산 서열인

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLVWGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKS  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSYWFYDVGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
DKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNGSYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (서열 10)

또는

#### 중쇄 아미노산 서열인

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKS  
KNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNATYRVVSVLTFLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSTDAIEWEESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (서열 11)

를 포함한다.

"항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현시키는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포에 결합한 항체를 인식하여, 후속적으로 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 의미한다. 단핵세포는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현시키는데 반해, ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현시킨다. 조혈 세포 상에서 FcR의 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991)]의 464 페이지 상의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 조사하기 위해서는, 예컨대 미국 특허 제5,500,362호 또는 동 5,821,337에 기술된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석법이 수행될 수 있다. 그러한 분석법에 유용한 이펙터 세포로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 있다. 별법으로 또는 부가적으로는, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. *PNAS(USA)* 95: 652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 조사될 수도 있다.

"인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현시키고, 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이 세포는 적어도 FcγRIII를 발현시키고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵세포, 세포독성 T 세포 및 호중구가 있으며, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다.

용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고, 그 예로는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위 집단 (이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 달리 스플라이싱된 (alternatively spliced) 형태를 포함함)의 수용체가 있다. FcγRII 수용체로는 FcγRIIA ("활성화 수용체") 및 FcγRIIB ("억제 수용체")가 있으며, 이들은 세포질 도메인에서 주로 다른, 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체인 FcγRIIA는 면역수용체 티로신-기반의 활성화 모티프 (ITAM)를 세포질 도메인에 함유한다. 억제 수용체인 FcγRIIB는 면역수용체 티로신-기반의 억제 모티프 (ITIM)를 세포질 도메인에 함유한다 (문헌 [Daëron, *Anne. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [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)]에서 검토된 바 있다. 앞으로 확인하게 될 FcR을 비롯한 다른 FcR도 본원에서 사용된 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모체의 IgG를 태아로 수송하는 역할을 하는 신생아의 수용체인 FcRn을 또한 포함한다 (문헌 [Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)]). 본원의 FcR에는 다형태, 예컨대 IgG1에 결합하는 수용체의 영역에 위치하는 아미노산 위치 158에 페닐알라닌 (F) 또는 발린 (V)을 생성하는 FcγRIIIa를 코딩하는 유전자의 유전 이형태가 포함된다. 동형접합성 발린 FcγRIIIa (FcγRIIIa-158V)는 인간 IgG1에 대해 높은 친화성을 가지고, 동형접합성 페닐알라닌 FcγRIIIa (FcγRIIIa-158F) 또는 이형접합성 (FcγRIIIa-158F/V) 수용체에 비해 증가된 시험관내 ADCC를 매개하는 것으로 나타났다.

"보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에 표적을 분해시키는 분자의 능력을 의미한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원과 복합체를 형성한 분자 (예를 들어, 항체)에 결합함으로써 시작된다. 보체 활성화를 조사하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)]에 기술된 바와 같은 CDC 분석법을 수행할 수 있다.

본원에서 사용된 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 무손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이성 항체), 및 항체 단편 (단, 원하는 생물학적 활성을 보이는 경우에 한함)을 포괄한다.

"항체 단편"은 무손상 항체의 일부분을 포함하며, 바람직하게는 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체가 있다.

"천연 항체"는 일반적으로 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당 단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합으로 중쇄에 연결되어 있으며, 디설파이드 연결의 수는 면역글로불린 이소형이 다른 중쇄들 사이에서 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠 내부의 이황 다리를 갖는다. 각 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인( $V_H$ )을 갖고, 그 뒤쪽에 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인( $V_L$ )을 갖고, 다른 쪽 말단에는 불변 도메인을 갖는데, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄의 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄의 가변 도메인의 경계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 사이에서 서열이 매우 다르고, 각 특정 항체의 자신의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역(FR)이라 칭한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은,  $\beta$ -시트 구조를 연결하는(어떤 경우는  $\beta$ -시트 구조의 부분을 형성함) 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 주로  $\beta$ -시트 입체구조를 채택한 4개의 FR을 각각 포함한다. 각 쇠에서의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 가깝게 유지되고, 다른 쇠의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(문헌 [Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는데 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능(예컨대, 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)에 항체가 관여하는 것)을 나타낸다.

항체를 파파인으로 분해하면, 각각 1개의 항원-결합 부위가 있는 2개의 동일한 항원-결합 단편("Fab" 단편이라 불림), 및 나머지 "Fc" 단편(이름이 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신으로 처리하면, 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는  $F(ab')_2$  단편이 수득된다.

"Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 이러한 영역은 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비-공유 결합에 의해 연결되어 이루어진 이량체로 구성된다. 이 입체구조에서는 각 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면에서 항체-결합 부위를 형성한다. 총괄하여, 6개의 초가변 영역이 항체에게 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 1개의 가변 도메인(또는 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 반)만으로도 항원을 인식하여 결합하는 능력을 나타내지만, 이 경우의 친화도는 전체 결합 부위보다 낮다.

Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 비롯하여, 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기가 추가되어 있다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서 Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'를 의미한다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 1쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.

임의의 척추동물 종으로부터 유래한 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 명백히 구별되는 2가지 유형(카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로 불림) 중 하나에 할당될 수 있다.

중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류로 할당될 수 있다. 무손상 항체의 5가지 주요 부류(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)가 있으며, 이들 중 몇몇은 하위 부류(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 세분될 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 불린다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3-차원 입체구조는 널리 공지되어 있다.

"단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함하는데, 이때 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠로 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는,  $V_H$ 와  $V_L$  도메인 사이의 폴리펩티드 연결기를 추가로 포함한다. scFv의 고찰을 위해서는 문헌 [Plueckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.



용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드쇄 ( $V_H-V_L$ )에서 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위가 있는 작은 항체 단편을 의미한다. 동일한 쇠에서 2개의 도메인 사이의 페어링이 발생하지 않을 만큼 짧은 연결기를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 페어링하여 2개의 항원-결합 부위를 형성시킨다. 디아바디는 예를 들어, 문헌 [유럽 특허 제404,097호; WO 93/11161; 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기술되어 있다.

본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적인 항체 집단으로부터 얻은 항체, 즉 모노클로날 항체가 가능한 자연 발생 돌연변이화 (그러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재할 수 있음)를 제외하고는 집단을 포함하는 개별 항체가 동일한 것을 의미한다. 모노클로날 항체는 단일 항원성 부위에 결합하는 높은 특이성이 있다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 결합한다. 특이성에 더해서, 모노클로날 항체는 이들을 하이브리도마 배양에 의해 합성하는 경우에 다른 면역글로불린으로 오염되지 않는다는 점에서 이점을 갖는다. 수식어 "모노클로날"은 항체가 실질적으로 동질적인 항체 집단으로부터 얻어졌다는 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법으로 항체를 생성해야하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조하거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)]에 개시된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

본원의 모노클로날 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 동질성이며, 상기 쇠(들)의 나머지 부분이 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 동질적인 "키메라" 항체 (면역글로불린), 및 그러한 항체의 단편 (단, 원하는 생물학적 활성을 보이는 경우에 한함)을 특별히 포함한다 (문헌 [미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)]). 본원에서 관심있는 키메라 항체로는 인간을 제외한 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이 (Old World Monkey), 예컨대 개코원숭이, 붉은털 원숭이 또는 사이노몰거스 원숭이)로부터 유래한 가변 도메인 항원-결합 서열, 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 있다 (미국 특허 제5,693,780호).

비-인간 (예를 들어, 쥐과동물) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 역량을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체) (예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 또는 인간을 제외한 영장류)의 초가변 영역으로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개량하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 모든 하나 이상의 (전형적으로, 2개의) 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 적어도 일부분의 면역글로불린 불변 영역, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 설명을 위해 문헌 [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.

본원에서 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원-결합을 일으키는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 중쇄 가변 도메인의 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외에 가변 도메인 잔기이다.

목적하는 항원에 "결합하는" 항체, 예컨대 CD20 또는 DR4 또는 DR5는 항체가 항원을 발현하는 세포를 표적화하기 위한 치료제로서 유용하도록 충분한 친화성 및(또는) 결합력으로 항원에 결합할 수 있는 것이다.

본 발명의 목적을 위해, "면역요법"은 비접합되거나 또는 "네이키드 (naked)" 항체일 수 있거나, 또는 이중 분자(들) 또는 제제(들), 예를 들어 하나 이상의 세포독성 제제(들)과 접합되거나 융합되어 "면역컨쥬게이트"를 생성시킬 수 있는 항체를 사용하여 포유동물 (바람직하게는, 인간 환자)을 치료하는 방법을 의미할 것이다.

"단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및(또는) 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 길항제 또는 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 서열화기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 한 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

표현 "유효량"은 대상 질환 또는 병태의 예방, 완화 또는 치료에 효과적인 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 양을 의미한다.

부가적 요법을 위해 본원에서 사용되는 용어 "면역억제제"는 본원에서 치료되는 포유동물의 면역계를 억제하거나 차폐하는 작용을 하는 물질을 의미한다. 이는 사이토카인 생성을 억제하거나, 자가-항원의 발현을 하향조절 또는 억제하거나, 또는 MHC 항원을 차폐하는 물질을 포함할 것이다. 그러한 제제의 예로는 2-아미노-6-아릴-5-치환 피리미딘 (이 거명을 통해 그 개시 내용이 본원에 포함되는 미국 특허 제4,665,077호 참조); 비스테로이드 소염제 (NSAID); 아자티오프린 (azathioprine); 시클로포스파미드 (cyclophosphamide); 브로모크립틴 (bromocryptine); 다나졸 (danazol); 답손 (dapsone); 글루타르알데히드 (미국 특허 제4,120,649호에 기술된 바와 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린 A; 글루코코르티코스테로이드와 같은 스테로이드, 예를 들어 프레드니손 (prednisone), 메틸프레드니솔론 (methylprednisolone), 텍사메타손 (dexamethasone), 및 히드로코르티손 (hydrocortisone); 메토크세이트 (경구 또는 피하 투여); 히드록시클로로퀸 (hydroxycloquine); 술파살라진 (sulfasalazine); 레플루노마이드 (leflunomide); 항-인터페론- $\gamma$ ,  $-\beta$  또는  $-\alpha$  항체, 항-종양 괴사 인자- $\alpha$  항체 (인플릭시맵 (infliximab) 또는 아달리무맵 (adalimumab)), 항-TNF $\alpha$  이뮤노어헤신 (immunoahesin) (에타너셉트 (etanercept)), 항-종양 괴사 인자- $\beta$  항체, 항-인터루킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체를 비롯한 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 길항제; 항-CD11a 및 항-CD18 항체를 비롯한 항-LFA-1 항체; 항-L3T4 항체; 이중 항-림프구 글로불린; 판 (pan)-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (WO 90/08187; 1990년 7월 26일자로 공개됨); 스트렙토키나제 (streptokinase); TGF- $\beta$ ; 스트렙토도르나제 (streptodornase); 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시스페르그알린 (deoxyspergualin); 라파마이신; T-세포 수용체 [Cohen et al., 미국 특허 제5,114,721호]; T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al., Science, 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Ianeway, Nature, 341: 482 (1989)]; 및 WO 91/01133); 및 T10B9와 같은 T 세포 수용체 항체 (유럽 특허 제 340,109호)가 있다.

본원에서 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 의미한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소 또는 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독소와 같은 독소, 또는 이들의 단편을 포함하는 것이다.

본원의 목적을 위한 "상승적 활성" 또는 "상승작용" 또는 "상승 효과" 또는 "상승적 유효량"은 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 조합을 사용하는 경우에 얻는 효과가 (1) Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 또는 CD20 항체를 단독으로 (또는 개별적으로) 사용하는 경우에 달성되는 효과보다 크고, (2) 그 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체에 대한 합계(덧셈)의 효과보다 큰 것을 의미한다. 이러한 상승작용 또는 상승 효과는 당업자에게 공지된 다양한 의미를 위해 결정될 수 있다. 예를 들어, Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 상승 효과는 종양 세포 수 또는 종양 매스의 감소를 조사하는 시험관내 또는 생체내 분석법 형식으로 관찰될 수 있다.

용어 "아폽토시스" 및 "아폽토시스 활성"은 넓은 의미로 사용되고, 세포질의 축합, 혈장 막 미세융모의 손실, 핵의 분열, 염색체 DNA의 파괴 또는 미토콘드리아 기능의 손실을 비롯한 하나 이상의 특징적 세포 변화에 의해 전형적으로 달성되는 포유동물 중의 세포 사멸의 규칙적 또는 제어된 형태를 나타낸다. 이 활성은 당업계에 잘 공지된 방법, 예를 들어 세포 생존 분석법, FACS 분석 또는 DNA 전기영동, 어넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화,

및/또는 막 소포(아폽토시스체 (apoptotic body)라 불림)의 형성에 의해 결정 및 측정될 수 있다. 아폽토시스를 유도하는 항체(예를 들어, 리톡시맙)의 능력을 결정하는 분석법은 예를 들어, 문헌 [Shan et al. *Cancer Immunol Immunother* 48: 673-83(2000); Pedersen et al. *Blood* 99: 1314-9(2002); Demidem et al. *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3): 177-186(1997)]에 기재되어 있다.

용어 "암", "암성" 또는 "악성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에게서의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예에는 선암종, 림프종, 모세포종, 흑색종, 육종 및 백혈병이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예에는 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 췌장암, 교모세포종, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 예컨대 간암종 및 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 직장결장암, 자궁내막암종, 골수종 (예컨대, 다발성 골수종), 타액선 암종, 신장암, 예컨대 신장 세포 암종 및 윌름스 종양, 기저세포 암종, 흑색종, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 고환암, 식도암, 및 각종 유형의 두경부암이 포함된다.

용어 "면역 관련 질환"은 포유동물의 면역계의 성분이 포유동물의 이환을 야기, 매개 또는 다른 방식으로 작용하는 질환을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 개입이 질환의 진행에 대한 개선 효과를 갖는 질환이 포함된다. 상기 용어에는, 자가면역 질환, 면역-매개 염증성 질환, 비-면역 매개 염증성 질환, 감염성 질병, 및 면역결핍 질환이 포함된다. 그 일부가 면역 또는 T 세포 매개성인, 본 발명에 따라 치료될 수 있는 면역 관련 및 염증성 질환의 예는 진진 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 소아 만성 관절염, 척추관절염, 전신 경화증 (피부경화증), 특발성 염증성 근육병증 (피부근염, 다발근염), 쇼그렌 증후군, 전신성 혈관염, 유육종증, 자가면역 용혈성 빈혈 (면역 범혈구 감소증, 발작성 야간혈색소뇨증), 자가면역 혈소판 감소증 (특발성 혈소판 감소 자반증, 면역-매개 혈소판 감소증), 갑상선염 (그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 소아 림프구성 갑상선염, 위축 갑상선염), 진성 당뇨병, 면역-매개 신장병 (사구체신염, 세뇨관 간질성 신장염)), 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환, 예를 들어 다발성 경화증, 특발성 탈수초성 다발신경병증 또는 기랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증; 간담증성 질환, 예를 들어 감염성 간염 (A, B, C, D, E형 간염 및 다른 비간진 화성 바이러스), 자가면역 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종 간염, 및 경화성 담관염, 염증성 및 섬유성 폐 질환, 예를 들어 염증성 장 질환 (궤양성 대장염: 크론병); 글루텐 민감 장병증, 및 휘플 (Whipple) 병, 자가면역 또는 면역-매개 피부병, 예를 들어 수포성 피부 질환, 다형홍반 및 접촉성 피부염, 건선, 알레르기 질환, 예를 들어 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증 및 두드러기, 폐의 면역학적 질환, 예를 들어 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증 및 과민증 폐렴, 이식 관련 질환, 예를 들어 이식편 거부 및 이식편 대 숙주 질환을 포함한다. 감염성 질환은 AIDS (HIV 감염), A, B, C, D 및 E형 간염, 박테리아 감염, 진균 감염, 원충 감염 및 기생충 감염을 포함한다.

"B 세포 악성종양"은 B 세포와 관련된 악성종양이다. 그 예로는 림프구 우세 호지킨병 (LPHD)을 비롯한 호지킨병; 비-호지킨 림프종 (NHL); 여포성 중심 세포 (FCC) 림프종; 급성 림프구성 백혈병 (ALL); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 털세포 (hairy cell) 백혈병; 형질세포양 (plasmacytoid) 림프성 림프종; 외투 세포 (mantle cell) 림프종; AIDS 또는 HIV-관련 림프종; 다발성 골수종; 중추신경계 (CNS) 림프종; 이식 후 림프세포증식성 장애 (PTLD); 발덴스트롬 거대글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia) (림프형질세포성 림프종); 점막-관련 림프조직 (MALT) 림프종; 및 경계부 림프종/백혈병이 있다.

비-호지킨 림프종(NHL)으로는 저급/여포성 NHL, 재발성 또는 난치성 NHL, 전-선 저급 NHL, 단계 III/IV NHL, 화학요법 내성 NHL, 소림프구성 (SL) NHL, 중급/여포성 NHL, 중급 확산성 NHL, 확산성 대세포 림프종, 공격성 NHL (공격성 전-선 NHL 및 공격성 재발성 NHL를 포함), 자가 줄기 세포 이식 후의 NHL 재발 또는 자가 줄기 세포 이식에 대한 난치성 NHL, 고급 면역모세포성 NHL, 고급 모림프구성 NHL, 고급 소 비-절단 세포 NHL, 거대 질환 NHL 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본원에서 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직으로부터 발생하고 그 조직을 대상으로 하는 질환 또는 장애, 이들의 합병증 또는 징후, 또는 이들로부터 초래된 증상이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예로는 관절염 (류마티스성 관절염, 연소기 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염 및 강직성 척추염), 건선, 피부염 (아토피성 피부염 포함); 만성 특발성 두드러기 (만성 자가면역 두드러기 포함), 다발성근염/피부근염, 중독성 표피 괴사증, 전신성 경피증 및 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) 관련 반응 (크론병, 궤양성 대장염, 및 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염 및/또는 상공막염의 합병증을 수반하는 IBD), 호흡 장애 증후군 (성인 호흡 장애 증후군(ARDS) 포함), 수막염, IgE-매개 질환 (예컨대, 과민성 및 알레르기성 비염), 뇌염 (예컨대, 라스머센(Rasmussen) 뇌염), 포도막염, 대장염 (예컨대, 미시적 대장염 및 교원성 대장염), 사구체신염(GN) (예컨대, 막성 GN, 특발성 막성 GN, 막 증식성 GN(MPGN) (제I형 및 제II형 포함) 및 고속 진행성 GN), 알레르기 증상, 습진, 천식, T 세포 침윤 및 만성 염증성 반응 관련 증상, 아테롬성동맥경화증, 자가면역 심근염, 백혈구 유착 결핍증, 전신성 홍반성 루푸스(SLE) (예컨대, 피부 SLE), 루푸스 (신장염, 뇌염, 소아 비-신장성 원형 탈모증 포함), 연소성 당뇨병, 다발성 경화증(MS) (예컨대, 척수-안구 MS), 알레르기성 뇌척수염, 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연된 과민증 관련 면역 반응, 결핵, 유육종증, 육아종증 (베게너 육아종증 포함), 무과립구증, 혈관염

(대혈관염 (다발성 근육통 류마티카(Rheumatica) 및 거대세포 (타가야스; Takayasu) 동맥염 포함), 중혈관염 (가와사키 병 및 결절성 다발성 동맥염 포함), CNS 혈관염 및 ANCA-관련 혈관염 (예컨대, 척-스트라우스 혈관염 또는 증후군(CSS)), 재생불량성 빈혈, 콤스(Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙판(Diamond Blackfan) 빈혈, 면역 용혈성 빈혈 (자가면역 용혈성 빈혈(AIHA) 포함), 악성 빈혈, 순수 적혈구 무형성증(PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구 감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 누출 관련 질환, CNS 염증성 장애, 다중 기관 손상 증후군, 중증 근무력증, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병, 케슬만 증후군, 굿파스튜어 증후군, 람버트-이튼 근무력증 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 증후군, 고형 기관 이식 거부반응 (높은 패널 반응성 항체 역가를 위한 예비치치, 조직에서의 IgA 침착, 및 신장 이식, 간 이식, 장 이식, 심장 이식 으로부터 발생하는 거부반응 등 포함), 이식편 대 숙주 질환(GVHD), 수포성 유전포창, 천포창 (심상, 엽상 및 천포창 점막 유전포창 포함), 자가면역 다내분비질환, 라이터병, 강직-인간 증후군, 면역 복합성 신장염, IgM 다발성 신경병증 또는 IgM 매개 신경병증, 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP), 혈전 혈소판 감소성 자반증(TTP), 혈소판 감소증 (예를 들어, 심 근경색증 환자에서 발생한 혈소판 감소증; 자가면역 혈소판 감소증 포함), 고환 및 난소의 자가면역 질환 (자가면역 고환염 및 난소염 포함), 원발성 갑상선기능저하증; 자가면역 내분비 질환, 예컨대 자가면역 갑상선염, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 아급성 갑상선염, 특발성 갑상선기능저하증, 아디슨병, 그레이브병, 자가면역 다선성 증후군 (또는 다선성 내분 비증 증후군), 인슐린-의존성 진성 당뇨병(IDDM)으로도 지칭되는 제I형 당뇨병 (소아 IDDM 포함) 및 쉬한 증후군; 자가 면역 간염, 림프양 간질성 폐렴 (HIV), 폐쇄성 세기관지염(비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 버거스병 (IgA 신장병), 원발성 담도 경화증, 비열대성 스프루(글루텐 장병증), 피부염 포진 합병증을 수반하는 불응성 스프루, 한성글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증(ALS; 루게릭병), 관상동맥 질환, 자가면역 내이 질환(AIED), 자가면역 청력 상실, 안간대성 근경련 증후군(OMS), 다발성 연골염 (예컨대, 불응성 다발성 연골염), 폐포 단백증, 아밀로이드증, 거대세포 간염, 공막염, 비특정 /미지의 중요성을 갖는 모노클로날 감마글로불린병증(MGUS), 말초 신경병증, 부종양 증후군, 채널 병리상태 (channelopathies) (예컨대, 간질, 편두통, 부정맥, 근장애, 청각 장애, 시각 장애, 주기성 사지마비, 및 CNS의 채널 병리상 태), 자폐증, 염증성 근질환 및 국소 분절성 사구체경화증(FSGS)이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 출원에서 사용된 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 암 세포에 세포독성이 적고, 효소에 의해 활성화되거나 활성이 더 높은 모 형태로 전환될 수 있는 제약상 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)] 참조). 본 발명의 전구약물로는 포스페이트-함유 전구약 물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코 실화 전구약물,  $\beta$ -락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세 트아미드-함유 전구약물, 활성이 더 높은 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우 리딘 전구약물이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포 독성 약물의 예로는 상기 기재한 화학요법제가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  및  $Lu$ 의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소 또는 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독소와 같은 독소, 및 이들의 단편 및 /또는 변이체를 포함하는 것이다.

"화학요법제"는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예컨대 티오테과 및 시톡산(CYTOXAN; 등 록상표) 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘, 예컨대 벤조도과, 카르 보쿠온, 메투레도과 및 우레도과; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미 드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 아세토제닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 캅토테 신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유 사체 포함); 크립토포신 (특히, 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 돌라스타틴; 두오카르미신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로르암부실, 클 로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 델 팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클 로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라님누스틴; 항생제, 예컨대 엔다인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특 히 칼리케아미신  $\gamma$ II 및 칼리케아미신  $\omega$ II (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신 (다이네미신 A 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 크로 모포어 및 관련 색소단백질 엔다인 항생제 크로모포어), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블 레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데

토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN;등록상표) 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예컨대, 미토마이신 C), 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르보푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 염산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄산 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (JHS 내추럴 프덕츠(JHS Natural Products), 미국 오리곤주 유진 소재); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안퀴딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피오프로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL;등록상표) 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스킵 온컬로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 미국 뉴욕주 프린스턴 소재), 아브락산(ABRAXANE;상표명), 파클리탁셀의 크레모포르(Cremophor)-무함유 알부민-가공된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 미국 일리노이주 샴버그 소재), 탁소테레(TAXOTERE;등록상표) 독세탁셀 (롱프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니 소재); 클로르암부실; 겐자(GEMZAR;등록상표) 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE;등록상표) 비노렐린; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 및 이들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 있다.

또한, 이 정의는 종양에서 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX;등록상표) 타목시펜 포함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON) 토레미펜 포함; 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소인 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가제(MEGASE;등록상표) 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN;등록상표) 액세메스탄, 포르메스타니에, 파드로졸, 리비조(RIVISOR;등록상표) 보로졸, 페마라(FEMARA;등록상표) 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX;등록상표) 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 변종 세포 증식에 관련된 신호전달 경로 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC- $\alpha$ , Ralf 및 H-Ras; 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME;등록상표) 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN;등록상표) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN;등록상표) 백신 및 박시드(VAXID;등록상표) 백신; 프로루킨(PROLEUKIN;등록상표) rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN;등록상표) 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX;등록상표) rmRH; 및 이들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

본원에 사용된 경우, "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 상기 유전자를 과발현시키는 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것이다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기가 아닌 단계에서) 차단하는 제제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 제제를 포함한다. 종래의 M기 차단제로는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔 및 topo II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 있다. G1 정지 제제는 또한 S기 정지를 유발하며, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토크세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C가 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, 제 13면)에서 찾아볼 수 있다.

용어 "사이토카인"은 세포간 매개체로서 다른 세포에 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 포괄적 용어이다. 이러한 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이 있다. 사이토카인에는 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호

르몬(LH); 간 성장인자; 섬유아세포 성장인자; 프롤락틴; 태반성 락토겐; 종양 괴사인자- $\alpha$  및 종양 괴사인자- $\beta$ ; 물러-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-결합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피세포 증식인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장인자; 혈소판 증식인자; 형질전환 성장인자(TGF), 예컨대 TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ ; 인슐린-유사 성장인자-I 및 인슐린-유사 성장인자-II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론- $\alpha$ , 인터페론- $\beta$  및 인터페론- $\gamma$ ; 콜로니 자극인자(CSF), 예컨대 대식세포-CSF(M-CSF); 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 과립구-CSF(G-CSF); 인터루킨(IL), 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 비롯한 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에 사용된 용어 사이토카인은 천연 공급원으로부터의 단백질 또는 재조합 세포 배양액으로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 증가물을 포함한다.

"포장 삽입물"은 시판되는 약품의 포장에 상업용으로 포함되는 지시사항을 표기하기 위해 사용되는 것으로, 이는 지시, 용법, 용량, 투여법, 금기사항, 포장된 제품과 함께 병용되는 다른 약품 및/또는 이러한 약품의 사용에 관한 주의사항 등을 함유한다.

본원에 사용된 "치료하는", "치료" 및 "요법"은 치료 요법, 예방 요법 및 방지 요법을 나타낸다.

본원에 사용된 용어 "포유동물"은 인간, 소, 말, 개 및 고양이를 비롯한 포유동물로 분류된 임의의 포유동물을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

## II. 본 발명의 조성물 및 방법

TNF 리간드 족과 관련된 사이토카인, 즉 본원에서 "Apo-2 리간드" 또는 "TRAIL"로 확인된 사이토카인이 기재되어 있다. 예상되는 천연 인간 Apo-2 리간드의 성숙한 아미노산 서열은 281개의 아미노산을 함유하며, 그의 계산된 분자량은 대략 32.5 kDa이다. 신호 서열의 부재 및 내부 소수성 영역의 존재는 Apo-2 리간드가 제II형 막횡단 단백질임을 시사한다. 또한, 가용성 세포의 도메인 Apo-2 리간드 폴리펩티드가 기재되어 있다 (예를 들어, WO 97/25428 (1997년 7월 17일에 공개됨) 참조). Apo-2L 치환 변이체도 기재되어 있다. 생물학적 활성을 갖는 다양한 치환 변이체 분자를 확인하기 위해 알려진 스캐닝 기술이 이용되어 왔다. Apo-2 리간드의 특정 치환 변이체는 하나 이상의 아미노산이 또다른 아미노산, 예컨대 알려진 잔기로 치환된 것을 포함한다. 이들 치환 변이체는, 예를 들어 "D203A", "D218A" 및 "D269A"로 지칭된다. 이 명명법은 203, 218 및/또는 269 위치(도 1에 도시된 지정번호를 이용)에 존재하는 아스파르트산 잔기가 알려진 잔기로 치환된 Apo-2 리간드 변이체를 지칭하는데 사용된다. 임의로는, 본 발명의 Apo-2L 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 임의로는, 상기 Apo-2L 변이체는 DR4 또는 DR5 수용체 선택적인 변이체일 것이다.

하기 기재는, Apo-2 리간드 코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 배양하여 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 회수함으로써 Apo-2 리간드 변이체를 비롯한 Apo-2 리간드를 생성하는 방법에 관한 것이다.

Apo-2 리간드를 코딩하는 DNA는 Apo-2 리간드 mRNA를 보유하며 이를 검출가능한 수준으로 발현시킬 것으로 여겨지는 조직으로부터 제작된 임의의 cDNA 라이브러리로부터 수득할 수 있다. 따라서, 인간 Apo-2 리간드 DNA는 인간 조직으로부터 제작된 cDNA 라이브러리, 예컨대 WO 97/25428에 기재된 인간 태반 cDNA의 박테리오파지 라이브러리로부터 편리하게 수득할 수 있다. Apo-2 리간드 코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 수득할 수 있다.

라이브러리는 대상 유전자 또는 이에 의해 코딩되는 단백질을 확인하기 위해 설계된 프로브 (예컨대, Apo-2 리간드 또는 약 20 내지 80개 이상의 염기쌍을 갖는 올리고뉴클레오타이드에 대한 항체)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선별된 프로브를 사용하여 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하는 것은, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 절차를 이용하여 수행할 수 있다. Apo-2 리간드를 코딩하는 유전자를 단리하는 다른 수단은 PCR 방법을 이용하는 것이다 (문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]).

Apo-2 리간드의 아미노산 서열 단편 또는 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 Apo-2 리간드 DNA에 도입시키거나, 또는 목적하는 Apo-2 리간드 폴리펩티드를 합성함으로써 제조할 수 있다. 이러한 단편 또는 변이체는 세포내 영역, 막횡단 영역 또는 세포외 영역, 또는 도 1에서 전장 Apo-2 리간드에 대해 도시한 아미노산 서열의 내부, 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 잔기가 삽입, 치환 및/또는 결실된 것을 나타낸다. 삽입, 치환 및/또는 결실을 임의로 조합하여 최종 구축물을 완성할 수 있으나, 단 최종 구축물은 예를 들어 본원에 정의된 목적하는 생물학적 활성, 예컨대 아팍토시스 활성을 보유한다. 바람직한 실시양태에서, 단편 또는 변이체는 Apo-2 리간드의 세포내, 막횡단 또는 세포외 도메인에 대해 본원에 정의된

서열, 또는 Apo-2 리간드에 대한 전장 서열과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상, 보다 더 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상이다. 또한, 아미노산 변화는 글리코실화 부위의 개수 또는 위치를 변화시키거나, 막 부착화 특성을 변경시키는 것과 같이 Apo-2 리간드의 번역후 과정을 변경시킬 수 있다.

상기 기재된 Apo-2 리간드 서열의 변이는 미국 특허 제5,364,934호에 나열된 보존적 및 비-보존적 돌연변이유발에 이용되는 임의의 기술 및 지침을 이용하여 만들 수 있다. 이들은 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이유발을 포함한다.

스캐닝 아미노산 분석을 이용하여 연속된 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 확인할 수 있다. 스캐닝에는 상대적으로 크기가 작은 중성의 아미노산이 바람직하다. 이러한 아미노산으로는 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인이 있다. 알라닌은 전형적으로 상기 군 중에서도 바람직한 스캐닝 아미노산인데, 이는 알라닌이  $\beta$ -탄소 뒤의 측쇄를 제거하므로 변이체의 주쇄 형태를 변경시킬 가능성이 적기 때문이다 (문헌 [Cunningham et al., Science, 244:1081 (1989)]). 또한, 알라닌은 전형적으로 가장 공통적인 아미노산이기 때문에 바람직하다. 또한, 이는 매몰된 위치 및 노출된 위치 모두에서 빈번하게 발견된다 (문헌 [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]).

아미노산은 이들 측쇄 특성의 유사성에 따라 분류될 수 있다 (문헌 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

- (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) 비하전된 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) 산성: Asp (D), Glu (E)
- (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

별법으로, 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기초한 군으로 분류할 수 있다:

- (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) 산성: Asp, Glu;
- (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- (5) 쇠 방위에 영향을 끼치는 잔기: Gly, Pro;
- (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

**[표 1]**

본래의 잔기	예시 치환기	바람직한 치환기
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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

또한, 본 발명의 범위에 포함되는 Apo-2 리간드 서열의 변이는 아미노-말단 유도체 또는 변형된 형태와 관련된다. 이러한 Apo-2 리간드 서열은 폴리펩티드 서열의 N-말단에 메티오닌 또는 변형된 메티오닌 (예컨대, 포르밀 메티오닐 또는 다른 차단된 메티오닐 중)을 갖는 본원에 기재된 임의의 Apo-2 리간드 폴리펩티드를 포함한다.

천연 Apo-2 리간드 또는 Apo-2 리간드 변이체를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 추가로 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현시키기 위해 복제가능한 벡터에 삽입할 수 있다. 다양한 벡터가 대중적으로 사용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 전사 종결 서열 (각각에 대해 하기에 기재함) 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 임의의 신호 서열, 복제 기점, 마커 유전자, 인핸서 요소 및 전사 터미네이터 서열이 당업계에 공지되어 있으며, WO 97/25428에 보다 상세하게 기재되어 있다.

발현 벡터 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인식되며 Apo-2 리간드 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터는 이들이 작동가능하게 연결되어 있는 특정 핵산 서열, 예컨대 Apo-2 리간드 핵산 서열의 전사 및 번역을 제어하는 구조 유전자 (일반적으로, 약 100 내지 1000 bp) 개시 코돈의 상류(5')에 위치하는 번역되지 않은 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 유도가능한 군과 구성적인 군으로 분류된다. 유도가능한 프로모터는, 일부 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도 변화에 대한 자신의 제어하에, DNA로부터의 전사 수준을 증가시키기 시작하는 프로모터이다. 본 출원 당시, 다수의 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 공지되어 있었다. 이러한 프로모터는 제한 효소 분해에 의해 DNA 공급원으로부터 프로모터를 분리하고, 이 단리된 프로모터 서열을 벡터에 삽입함으로써 Apo-2 리간드 코딩 DNA에 작동가능하게 연결된다. 천연 Apo-2 리간드 프로모터 서열 및 다수의 이종 프로모터 모두가 Apo-2 리간드 DNA의 증폭 및/또는 발현을 유도하는데 사용될 수 있다.

원핵생물 및 진핵생물 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 당업계에 공지되어 있으며, WO 97/25428에 보다 상세하게 기재되어 있다.

이. 콜라이에서 가용성 Apo-2L을 생성하는 바람직한 방법은 생성물 발현을 조절하기 위한 유도가능한 프로모터를 사용한다. 제어가능하고 유도가능한 프로모터의 사용은 생성물 발현이 유도되어 숙주에 허용되지 않을 수 있을 정도로 상당한 양의 생성물이 축적되기 전에 배양물이 목적하는 세포 농도까지 증식되도록 한다.

본 출원인은 몇몇 유도가능한 프로모터 시스템 (T7 폴리머라제, trp 및 알칼리성 포스파타제 (AP))을 Apo-2L (114 내지 281 형태)의 발현에 대해 평가하였다. 이들 3가지 프로모터를 각각 사용하였을 때 수확된 세포 페이스트로부터 가용성이며 생물학적으로 활성인 Apo-2L 삼량체가 상당량 회수되었다. AP 프로모터는 수확된 세포 페이스트에서 프로모터 제어가 보다 엄격하고 세포 농도 및 역가가 더 높았으므로, 상기 시험된 3가지 유도가능한 프로모터 시스템 중에서 AP 프로모터가 바람직하다.

상기 나열된 성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 제작은 표준 라이게이션 기술을 이용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 목적하는 형태로 절단하고, 재단하고, 다시 라이게이션하여 필요한 플라스미드를 제작한다.



제작된 플라스미드에서 정확한 서열을 확인하기 위한 분석의 경우, 라이게이션 혼합물을 사용하여 이. 콜라이 K12 균주 294 (ATCC 31,446)를 형질전환시킬 수 있으며, 성공적인 형질전환체를 적절한 경우에 암피실린 또는 테트라사이클린 내성에 의해 선별할 수 있다. 형질전환체로부터 플라스미드를 준비하고, 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 분석하고/거나 당업계에 공지된 표준 기술을 이용하여 서열분석한다 (예를 들어, 문헌 [Messing et al., Nucleic Acids Res., 9:309 (1981)], [Maxam et al., Methods in Enzymology, 65:499 (1980)] 참조).

포유동물 세포에서 Apo-2 리간드를 코딩하는 DNA를 일시적으로 발현시키는 발현 벡터가 사용될 수 있다. 일반적으로, 일시적 발현은 숙주 세포에서 효율적으로 복제될 수 있는 발현 벡터의 사용과 관련되며, 이에 따라 숙주 세포는 수많은 발현 벡터 카피를 축적시켜 이후에 발현 벡터에 의해 코딩되는 목적하는 폴리펩티드를 높은 수준으로 합성하게 된다 [Sambrook et al., 상기 문헌]. 적합한 발현 벡터 및 숙주 세포를 포함하는 일시적 발현 시스템은 클로닝된 DNA에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 양성 확인을 편리하게 할 뿐만 아니라, 목적하는 생물학적 또는 생리학적 특성에 대해 상기 폴리펩티드를 신속하게 스크리닝할 수 있도록 한다. 따라서, 일시적 발현 시스템은 생물학적으로 활성인 Apo-2 리간드인 Apo-2 리간드의 유사체 및 변이체를 확인하기 위한 목적 측면에서 본 발명에 특히 유용하다.

재조합 척추동물 세포 배양액에서 Apo-2 리간드의 합성을 변경시키는데 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포는 문헌 [Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)], [Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)], 유럽 특허 제117,060호 및 유럽 특허 제117,058호에 기재되어 있다.

본원에서 벡터에 포함된 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포를 포함한다. 상기 목적에 적합한 원핵생물로는 진정세균, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아 세아(*Enterobacteriaceae*), 예컨대 에스케리치아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*) (예를 들어, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)), 세라티아(*Serratia*), (예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*)), 시겔라(*Shigella*), 및 바실리(*Bacilli*), (예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 비. 리케니포르미스 41P, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시되어 있음)), 슈도모나스(*Pseudomonas*) (예컨대, 피. 에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)가 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해 효소를 분비해야 한다.

원핵생물 이외에도, 진핵 미생물, 예컨대 곰팡이 또는 효모가 Apo-2 리간드 코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 글리코실화된 Apo-2 리간드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. CHO 세포를 비롯한 상기 모든 숙주 세포의 예는 WO 97/25428에 상세하게 기재되어 있다.

숙주 세포는 Apo-2 리간드 생성에 사용되는 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염시키거나, 바람직하게는 형질전환시켜, 프로모터의 도입, 형질전환체의 선별, 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 사용하기 적절하도록 변형된 영양 배지에서 배양한다.

형질감염은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는지 여부에 관계없이 숙주 세포에 발현 벡터가 도입되는 것을 나타낸다. 다수의 형질감염 방법이 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어  $\text{CaPO}_4$  및 전기천공법이 있다. 성공적인 형질감염은 일반적으로 상기 벡터가 숙주 세포에서 작용하고 있음을 암시하는 임의의 지표가 나타나는 경우에 인정된다.

형질전환은 DNA가 복제가능하게 되도록 상기 DNA를 염색체의 요소로서 또는 염색체 통합에 의해 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행한다. 염화칼슘을 사용하는 칼슘 처리법 ([Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재되어 있음) 또는 전기천공법이 원핵생물 또는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 다른 세포에 대해 이용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로의 감염은 문헌 [Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)] 및 WO 89/05859 (1999년 6월 29일자로 공개됨)에 기재된 바와 같이 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다. 또한, 식물은 WO 91/00358 (1991년 1월 10일자로 공개됨)에 기재된 바와 같은 초음파 처리를 이용하여 형질감염될 수 있다.

위와 같이 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, 인산칼슘 침전 방법 (문헌 [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)])이 이용될 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적인 측면은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모로의 형질전환은 전형적으로 문헌 [Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)]의 방법에 따라 수행한다. 그러나, DNA를 세포에 도입시키는 다른 방법,

예컨대 핵 미세주입, 전기천공법, 박테리아 원형질과 온전한 세포의 융합체 또는 다가양이온 (예를 들어, 폴리브렌, 폴리오르니틴)도 사용될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키는 다양한 기술에 대해, 문헌 [Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

Apo-2 리간드의 생성에 사용되는 원핵세포는 일반적으로 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 적합한 배양 배지에서 배양할 수 있다. 이. 콜라이 배양에 사용될 수 있는 특정 형태의 배양 배지가 아래 실시예에 추가로 기재되어 있다. Apo-2 리간드 생성에 사용되는 포유동물 숙주 세포는 다양한 배양 배지에서 배양할 수 있다.

시판되는 배양 배지의 예로는 Ham's F10 (시그마; Sigma), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium) ("MEM", 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ("DMEM", 시그마)가 있다. 임의의 상기 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 증식 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 증식인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액 (예컨대, HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데닌 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 겐타마이신(Gentamycin;상표명) 약물), 미량 원소 (일반적으로,  $\mu\text{M}$  범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의함), 및 글루코스 또는 등가의 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물은 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건 (예컨대, 온도, pH 등)은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전부터 사용되어 온 것으로, 당업자에게 명백할 것이다.

일반적으로, 포유동물 세포 배양물의 생산성을 최대화시키는 원리, 프로토콜 및 실용 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)]에서 찾아볼 수 있다.

본 발명의 한 측면에 따라, 전형적으로 하나 이상의 2가 금속 이온이 숙주 세포 배양 또는 발효에 사용되는 배양 배지에 첨가 또는 포함될 것이다. 2가 금속 이온은 바람직하게는 Apo-2L 삼량체의 보관 안정성을 향상시키거나, 가용성을 향상시키거나, 또는 하나 이상의 아연 이온에 의해 배위결합된 안정한 Apo-2L 삼량체의 형성을 보조하기에 충분한 농도 수준으로 배양 배지에 존재하거나 또는 첨가된다. 첨가될 수 있는 2가 금속 이온의 양은, 부분적으로는 배양액 중 숙주 세포의 농도 또는 상기 2가 금속 이온에 대한 잠재적인 숙주 세포 민감성에 따라 달라질 것이다. 배양액 중 숙주 세포의 농도가 보다 높은 경우에는 2가 금속 이온의 농도를 증가시키는 것이 유리할 수 있다. 2가 금속 이온이 숙주 세포에 의해 생성물이 발현되는 동안 또는 발현된 후에 첨가된다면, 숙주 세포에 의한 생성물 발현이 증가할 때 2가 금속 이온 농도를 조정 또는 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 일반적으로 통상 시판되는 세포 배양 배지에 존재할 수 있는 미량 수준의 2가 금속 이온이 안정한 삼량체 형성에 불충분할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같이 2가 금속 이온을 더 첨가하는 것이 바람직하다.

배양액에서 숙주 세포가 증식하는 동안 2가 금속 이온을 첨가하는 경우, 2가 금속 이온은 바람직하게는 숙주 세포 증식에 역효과를 나타내거나 또는 부정적인 영향을 끼치지 않는 농도로 배양 배지에 첨가된다. 진탕 플라스크 배양액에서,  $\text{ZnSO}_4$ 를 1 mM 초과 농도로 첨가하면 숙주 세포 농도가 감소될 수 있다는 것이 관찰되었다. 당업자는 박테리아 세포가 세포 매트릭스와 금속 이온 복합체를 형성함으로써 금속 이온을 효과적으로 고립시킬 수 있음을 인지하고 있다. 따라서, 세포 배양액에서 세포를 증식시킨 후 (목적하는 숙주 세포 농도가 달성된 후) 또는 숙주 세포에 의해 생성물이 발현되기 직전에 선택된 2가 금속 이온을 배양 배지에 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 충분한 양의 2가 금속 이온이 존재하도록 하기 위해, 생성물이 발현되는 동안 추가의 2가 금속 이온을 세포 배양 배지에 첨가 또는 공급할 수 있다.

배양 배지 중 2가 금속 이온의 농도는 숙주 세포에 해롭거나 독성일 수 있는 농도를 초과해서는 안 된다. 숙주 세포로 이. 콜라이를 사용하는 본 발명의 방법에서는, 배양 배지 중 2가 금속 이온의 농도가 약 1 mM을 초과하지 않는 것이 바람직하다 (바람직하게는, 1 mM 이하). 보다 더 바람직하게는, 배양 배지 중 2가 금속 이온의 농도는 약 50 내지 약 250  $\mu\text{M}$ 이다. 가장 바람직하게는, 상기 방법에 사용되는 2가 금속 이온이 황산아연이다. 2가 금속 이온은 금속 이온 및 Apo-2 리간드 삼량체가 1:1의 몰비율로 존재할 수 있는 양으로 세포 배양액에 첨가하는 것이 바람직할 수 있다.

2가 금속 이온을 임의의 허용되는 형태로 세포 배양액에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 금속 이온 용액은 물을 사용하여 제조할 수 있으며, 이어서 2가 금속 이온 용액을 배양 배지에 첨가 또는 공급할 수 있다.

Apo-2L의 발현은, 예를 들어 mRNA의 전사를 정량하기 위한 통상적인 서던 블랏팅(Southern Blotting), 노던 블랏팅(Northern Blotting) (문헌 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]), 점 블랏팅(dot Blotting) (DNA 분석) 또는 계내 혼성화에 의해, 본원에 제공된 서열을 기초로 적절하게 표지된 프로브를 사용하여 샘플에서 직접 측정할 수 있다. 다양한 표지가 사용될 수 있으며, 가장 통상적으로는 방사선 동위원소, 특히  $^{32}\text{P}$ 가 사용될 수 있다. 한편, 다른 기술도 이용될 수 있는데, 예컨대 폴리뉴클레오티드로의 도입을 위해 비오틴-변형된 뉴클레오티드를 사용하는 기술을 이용할 수 있다. 비오틴은 이후에 아비딘 또는 항체에 대한 결합 부위로서 사용되며, 이들은 매우 다양한 표지, 예컨대

방사선 뉴클레오타이드, 형광물질 또는 효소로 표지될 수 있다. 별법으로, DNA 이합체, RNA 이합체, 및 DNA-RNA 하이브리드 이합체 또는 DNA-단백질 이합체를 비롯한 특정 이합체를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 항체는 이후에 표지될 수 있으며, 이합체가 표면에 결합된 경우에 분석을 수행함으로써 표면에 이합체가 형성되었을 때 이합체에 결합된 항체의 존재를 검출할 수 있다. 별법으로, 면역학적 방법, 예컨대 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학 염색 및 세포 배양액 또는 체액 분석에 의해 유전자 발현을 측정하여 유전자 생성물의 발현을 직접 정량할 수 있다. 전형적으로, 면역조직화학 염색 기술을 이용하고, 탈수 및 고정시킨 후에 커플링된 유전자 생성물에 대해 특이적인 표지된 항체와 반응시킴으로써 세포 샘플을 제조하며, 이 때 표지는 통상적으로 시각적으로 검출가능한 것, 예를 들어 효소 표지, 형광 표지, 발광 표지 등이다.

샘플액의 면역조직화학 염색 및/또는 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있으며, 이들은 임의의 포유동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 천연 Apo-2 리간드 폴리펩티드에 대한 항체, 본원에 제공된 DNA 서열 기재의 합성 펩티드에 대한 항체, 또는 Apo-2 리간드 DNA에 융합되어 있으며 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대한 항체를 제조할 수 있다.

Apo-2 리간드는 바람직하게는 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수되지만, 분비 신호 없이 직접 생성된 경우에는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수도 있다. Apo-2 리간드가 막에 결합되어 있는 경우, 이를 적합한 계면활성제 용액(예를 들어, Triton-X 100)을 사용하여 막으로부터 방출시키거나, 또는 그의 세포외 영역을 효소 절단에 의해 방출시킬 수 있다.

Apo-2 리간드가 인간 기원이 아닌 재조합 세포에서 생성된 경우, Apo-2 리간드는 인간 기원의 단백질 또는 폴리펩티드를 포함하지 않는다. 그러나, 통상적으로 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 Apo-2 리간드를 회수 또는 정제하여 Apo-2 리간드와 실질적으로 동질성의 제제를 수득할 필요가 있다. 제1 단계에서, 배양 배지 또는 세포 용해물을 원심분리하여 미립자 세포 잔해물을 제거할 수 있다. 이어서, Apo-2 리간드를 적합한 정제 절차에 따라 가용성 단백질 오염원 및 폴리펩티드로부터 정제하며, 이 때 상기 적합한 정제 절차의 예로는 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온-교환 수지(예컨대, DEAE 또는 CM) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전법, 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용하는 겔 여과법, 오염원(예컨대, IgG)을 제거하기 위한 투석여과법 및 단백질 A 세파로스 컬럼이 있다.

바람직한 실시양태에서, Apo-2 리간드는 친화성 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 잔기가 결실, 삽입 또는 치환된 Apo-2 리간드 단편 또는 변이체는 천연 Apo-2 리간드와 동일한 방식으로 회수되며, 이들은 변이에 의해 야기된 임의의 실질적인 특성 변화를 설명한다. 예를 들어, 다른 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 항원과 융합된 Apo-2 리간드를 제조하여 정제를 용이하게 할 수 있으며, 상기 항원에 대한 항체를 함유하는 면역친화성 컬럼을 사용하여 융합된 폴리펩티드를 흡착시킬 수 있다.

또한, 프로테아제 억제제, 예컨대 페닐 메틸 술폰일 플루오라이드(PMSF)가 정제 단계 동안 단백질 분해를 억제하는데 유용할 수 있으며, 외부 오염물질의 증식을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다. 당업자는 재조합 세포 배양액에서 발현시켰을 때의 Apo-2 리간드 또는 그의 변이체 특성 변화를 설명하기 위해 천연 Apo-2 리간드에 적합한 정제 방법을 변형시킬 필요가 있을 수 있음을 이해할 것이다.

이러한 임의의 정제 단계 동안, 회수된 Apo-2L을 2가 금속 이온-함유 용액 또는 하나 이상의 2가 금속 이온을 함유하는 정제 물질(예컨대, 크로마토그래피 배지 또는 지지체)에 노출시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 2가 금속 이온 및/또는 환원제는 Apo-2L의 회수 또는 정제 단계 중에 사용된다. 임의로는, 2가 금속 이온 및 환원제, 예컨대 DTT 또는 BME 모두가 Apo-2L의 회수 또는 정제 단계 중에 사용될 수 있다. 회수 또는 정제 단계 동안 2가 금속 이온을 사용하는 것이 Apo-2L 삼량체를 안정하게 하거나 또는 세포를 배양하는 동안 형성된 Apo-2L 삼량체를 보존시킬 것으로 여겨진다.

하기 기재는 하나 이상의 화합물 기에 공유결합에 의해 부착된(이하, "접합된") Apo-2 리간드의 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명의 Apo-2L 접합체에 사용하기 적합한 화합물 기는 유의하게 독성 또는 면역원성이 아닌 것이 바람직하다. 화합물 기는 보관하기 적합한 조건하에 보관하여 사용할 수 있는 Apo-2L 접합체가 생성되도록 임의로 선택될 수 있다. 폴리펩티드에 접합될 수 있는 화합물 기의 다수의 예가 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 탄수화물, 예컨대 당단백질 상에서 자연적으로 발생하는 탄수화물, 폴리글루타메이트, 및 비-단백질원성 중합체, 예컨대 폴리올이 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,245,901호 참조).

폴리올은, 예를 들어 상기 WO 93/00109에 개시된 바와 같이, 리신 잔기를 비롯한 하나 이상의 아미노산 잔기에서 폴리펩티드 (예컨대, Apo-2L)에 접합될 수 있다. 사용되는 폴리올은 임의의 수용성 폴리(알킬렌 옥사이드) 중합체일 수 있으며, 선형 또는 분지형 쇄를 가질 수 있다. 적합한 폴리올은 하나 이상의 히드록실 위치에서 화합물 기, 예컨대 1 내지 4개의 탄소를 갖는 알킬기로 치환된 것을 포함한다. 전형적으로, 폴리올은 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이며, 따라서 기재상 편이를 위해 사용되는 폴리올이 PEG이며 이 폴리올을 폴리펩티드에 접합시키는 과정에 대한 예시 실시양태와 관련된 나머지 논의에서는 상기 과정을 "PEG화"로 명명한다. 그러나, 당업자라면 다른 폴리올, 예를 들어 폴리(프로필렌 글리콜) 및 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜 공중합체가 PEG에 대해 본원에 기재된 접합 기술을 이용하여 사용될 수 있음을 인식하고 있다.

Apo-2L의 PEG화에 사용되는 PEG의 평균 분자량은 달라질 수 있으며, 전형적으로는 약 500 내지 약 30,000 달톤(D) 범위일 수 있다. 바람직하게는, PEG의 평균 분자량은 약 1,000 내지 약 25,000 D이고, 보다 바람직하게는 약 1,000 내지 약 5,000 D이다. 한 실시양태에서, PEG화는 평균 분자량이 약 1,000 D인 PEG를 사용하여 수행한다. 임의로는, PEG 동중중합체는 비치환되지만, 한 말단에서 알킬기로 치환될 수도 있다. 바람직하게는, 알킬기는  $C_1$ - $C_4$  알킬기이고, 가장 바람직하게는 메틸기이다. PEG 제제는 시판되며, 전형적으로 본 발명에 사용하기 적합한 PEG 제제는 평균 분자량에 따라 시판되는 비균질한 제제이다. 예를 들어, 시판되는 PEG(5000) 제제는 전형적으로 분자량이 약간 다른 분자들, 통상적으로는 분자량이  $\pm 500$  D인 분자들을 함유한다.

본 발명의 Apo-2 리간드는 다양한 형태, 예컨대 단량체 형태 또는 삼량체 형태 (3개의 단량체를 포함)일 수 있다. 임의로는, Apo-2L 삼량체는 이를 구성하는 3개의 단량체 중 하나, 둘 또는 셋 각각에 PEG 분자가 연결 또는 접합되는 방식으로 PEG화될 것이다. 이와 같은 실시양태에서, 사용되는 PEG의 평균 분자량은 약 1,000 내지 약 5,000 D인 것이 바람직하다. Apo-2L 삼량체가 "부분적으로", 즉 상기 삼량체를 구성하는 3개의 단량체 중 하나 또는 둘에만 PEG가 연결 또는 접합되어 "PEG화"될 수도 있음도 고려된다.

단백질을 PEG화시키는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. PEG에 접합된 단백질을 생성하는 구체적인 방법으로는 미국 특허 제4,179,337호, 동 제4,935,465호 및 동 제5,849,535호에 기재된 방법이 있다. 전형적으로, 단백질은 주로 반응 조건, 중합체의 분자량 등에 따라 단백질의 하나 이상의 아미노산 잔기를 통해 중합체 상의 말단 반응기에 공유결합한다. 반응기(들)을 갖는 중합체를 본원에서는 활성화된 중합체로 지칭한다. 반응기는 단백질 상의 유리 아미노기 또는 다른 반응기에 선택적으로 반응한다. PEG 중합체는 무작위적으로 또는 부위-특이적인 방식으로 단백질 상의 아미노기 또는 다른 반응기에 커플링될 수 있다. 그러나, 최상의 결과를 수득하기 위해 선택되는 반응기의 유형 및 양 뿐만 아니라 사용되는 중합체의 유형이 사용되는 특정 단백질 또는 단백질 변이체에 따라 선택될 수 있어, 반응기가 단백질 상에서 특히 활동적인 다수의 기와 반응하는 것을 방지할 것으로 이해된다. 그러나, 이를 완전하게 방지하지 못할 가능성이 있기 때문에, 단백질의 농도에 따라 일반적으로는 단백질 1 몰 당 활성화된 중합체 약 0.1 내지 1000 몰, 바람직하게는 2 내지 200 몰을 사용할 것이 제안된다. 단백질 1 몰 당 활성화된 중합체의 최종 양은 동일한 최적화 시간 동안, 가능하다면 단백질의 순환 반감기 동안 최적 활성을 유지하는 양과 균형을 이룬다.

본원에 기재된 Apo2L이 당업계에 공지된 기술을 이용하여 류신 지퍼 서열에 연결 또는 융합될 수도 있음이 또한 고려된다.

사멸 수용체 항체 및 CD20 항체의 제조 방법도 본원에 기재되어 있다. 항체 생산 또는 항체 스크리닝에 사용될 항원은, 예를 들어 목적하는 에피토프를 함유하는 항원 또는 그의 부분의 가용성 형태일 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 세포 표면에서 항원을 발현시키는 세포는 항체 제조 또는 스크리닝에 사용될 수 있다. 항체 제조에 유용한 항원의 다른 형태는 당업자에게 명백할 것이다.

#### (i) 폴리클로날 항체

폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 면역보강제를 다수회 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사함으로써 동물에서 생성된다. 관련 항원을 면역화시킬 종에서 면역원성인 단백질 (예를 들어, 열쇠구멍 낫갓조개 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 2관능성 또는 유도체화 제제를 사용하는 대두 트립신 억제제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신 이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통해 접합됨), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통해 접합됨), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물,  $SOCl_2$ , 또는  $R^1N=C=NR$  (여기서, R 및  $R^1$ 은 상이한 알킬기임))에 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

동물은, 예를 들어 단백질 또는 접합체 100  $\mu\text{g}$  또는 5  $\mu\text{g}$  (각각, 토끼 또는 마우스의 경우임)을 3배 부피의 프로인트 완전 면역보강제와 합하여, 이 용액을 다양한 부위에서 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화된 다. 한 달 후, 프로인트 완전 면역보강제 중의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 다양한 부위에 피하 주사함으로써 동물에게 추가접종을 수행한다. 7 내지 14일 후, 동물로부터 채혈하고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 역가가 정제 상태에 이를 때까지 동물에게 추가접종한다. 바람직하게는, 동일한 항원의 접합체이지만, 상이한 단백질과 접합되고/거나 상이한 가교 시약을 통해 접합된 접합체를 동물에게 추가접종한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양액에서 단백질 융합에 의해 제조될 수 있다. 또한, 응집제 (예컨대, 알루미늄 (alum))가 면역 반응을 증대시키는데 적합하게 사용된다.

## (ii) 모노클로날 항체

모노클로날 항체는 실질적으로 동질적인 항체 집단, 즉 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 변이체를 제외하는 집단을 구성하는 개별 항체가 동일한 집단 으로부터 얻는다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 서로 다른 항체들의 혼합물이 아닌 항체의 특징을 나타낸다.

예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조하거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)으로 제조할 수 있다.

하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물 (예컨대, 햄스터)을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 별법으로, 림프구는 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 림프구를 적합한 융합제 (예컨대, 폴리에틸렌 글리콜)를 사용하여 골수종 세포와 융합시킴으로써 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).

위와 같이 생성된 하이브리도마 세포를 시딩하여, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종세포의 성장 또는 생존을 억제시키는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 증식시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)) 효소가 없는 경우, 하이브리도마 배양용 배지는 전형적으로 HGPRT-결핍 세포의 증식을 방지하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 함유할 것이다.

바람직한 골수종 세포는, 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생성 세포에 의해 항체가 안정하게 높은 수준으로 생성되도록 하고, 배지 (예컨대, HAT 배지)에 민감한 세포이다. 이들 중, 바람직한 골수종 세포주는, 예컨대 살크 인스티튜트 세포 분배센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양에서 유래한 것과 같은 쥐과동물 골수종 세포주, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스 소재)에서 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체 제조용으로 기재되어 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

하이브리도마 세포가 증식하고 있는 배양 배지를 항원에 대한 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법 또는 시험관내 분석법 (예컨대, 방사면역 검정법(RIA) 또는 효소-연결 면역흡착법(ELISA))으로 결정된다.

모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)]의 스캐트차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.

하이브리도마 세포가 바람직한 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생성하는 것으로 확인된 후에, 이 클론을 제한 회석 절차에 의해 서브클로닝하여, 표준 방법으로 증식시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지로는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 있다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로 생체내에서 증식시킬 수 있다.

상기 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는, 적합하게는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스 (Sepharose), 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리한다.

모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 종래의 절차를 이용하여 (예를 들어, 쥐과동물 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리되어 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 작용한다. 단리된 후에, DNA는 발현 벡터 내에 위치할 수 있으며, 이 벡터는 이후에 숙주 세포 (예컨대, 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포)로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성할 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA를 박테리아에서 재조합 발현시키는 것에 대한 고찰 문헌으로는 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992)]이 있다.

추가 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]은 각각 파지 라이브러리를 이용하는 쥐과동물 및 인간 항체의 단리에 대해 기재하고 있다. 후속 간행물들은 선택 서플링에 의해 높은 친화도 (nM 범위)의 인간 항체 제조에 대해 기재하고 있고 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)]), 또한 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합에 대해 기재하고 있다 (문헌 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)]). 따라서, 이 기술들은 모노클로날 항체를 단리하기 위한 종래의 모노클로날 항체 하이브리도마 기술을 대체할 있는 방안이다.

DNA는 또한, 예를 들어 동종 쥐과동물 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄의 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시킴으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 개질시킬 수 있다.

전형적으로 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나, 또는 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환됨으로써, 한 항원에 대해 특이성을 갖는 한 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 2가의 키메라 항체를 생성한다.

### (iii) 인간화 항체

비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "임포트" 잔기로 언급되며, 이는 "임포트" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 추가변 영역 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 보다 적은 온전한 인간 가변 도메인이 비-인간 종의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 제4,816,567호). 실제로는, 인간화 항체는 전형적으로 일부 추가변 영역 잔기 및 가능하다면 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

인간화 항체를 제조하는데 사용되는 인간 가변 도메인의 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성을 감소시키는데 있어서 매우 중요하다. 소위 "가장-적합한 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열과 가장 관련성이 높은 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로 채택한다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)]). 다른 방법은, 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역의 특정 하위집단에 속하는 모든 인간 항체의 동일 서열로부터 유래한 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 동일한 프레임워크가 몇몇의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).

또한, 항체가 항원과의 높은 친화력 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 유지한 채로 인간화되는 것도 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 서열 및 다양한 개념상의 인간화 생성물을 이들의 3차원 모델을 이용하여 분석하는 과정으로 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수할 수 있고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체구조를 도시하여 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 입수가능하다. 이들 디스플레이의 정밀검사는 후보 면역글로불린 서열이 기능함에 있어 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방법으로 FR 잔기를 수용자 및 임포트 서열로부터 선택하여 조합함으로써 바람직한 항체 특징 (예컨대, 표적 항원(들)에 대한 친화도가 증가함)이 달성될 수 있다. 일반적으로, 추가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는 작용에 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여한다.

#### (iv) 인간 항체

인간화에 대한 대안으로, 인간 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 면역화시, 내인성 면역글로불린을 생성하지 않으면서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성하는 것이 가능한 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 만드는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포주 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 ( $J_H$ ) 유전자의 동형접합성 결실이 내인성 항체 생성의 완전한 억제를 야기한다는 것이 기술되어 있다. 그러한 생식세포주 돌연변이 마우스에 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 어레이를 전달하면, 항원 투여시 인간 항체의 생성을 야기할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제5,591,669호, 동 제5,589,369호 및 동 제5,545,807호를 참조한다.

별법으로, 파지 디스플레이 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990)])은 면역화되지 않은 공여자의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트성 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 부차적 코트 단백질 유전자로 프레임에 맞게 클로닝되어, 파지 입자의 표면상에서 기능성 항체 단편으로 디스플레이된다. 필라멘트성 입자가 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 그러한 특성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자의 선별을 야기한다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성 중 몇 가지를 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 형식으로 수행될 수 있는데, 이에 대한 고찰을 위해서는 예를 들어, 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 세그먼트의 다양한 공급원이 파지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장에서 유래한 V 유전자의 작은 무작위 조합형 라이브러리로부터 매우 다양한 항-옥사졸론 항체를 단리하였다. 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자 레퍼토리를 구성하고, 매우 다양한 항원 (자가-항원을 포함)에 대한 항체를 본질적으로 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)] 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 동 제5,573,905호를 참조한다.

인간 항체는 또한 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 동 제5,229,275호).

#### (v) 항체 단편

항체 단편을 제조하는 다양한 기술이 개발되었다. 관습적으로는, 이들 단편은 온전한 항체의 단백질분해성 분해에 의해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 언급한 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되어, 화학적 커플링에 의해  $F(ab')_2$  단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)]). 다른 접근법에 따르면,  $F(ab')_2$  단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리할 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한, 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기술된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 그러한 선형 항체 단편은 단일특이성이거나 이중특이성이다.

#### (vi) 이중특이성 항체

이중특이성 항체는 2개 이상의 다른 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 대표적인 이중특이성 항체는 CD20, DR4 또는 DR5 수용체의 2개의 다른 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이성 항체는 또한 B 세포에 세포독성제를 위치하게 하는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 B 세포 마커-결합 아암, 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론- $\alpha$ , 빈카알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토타렉세이트 또는 방사성 동위원소 함텐)에 결합하는 아암을 갖는다. 이중특이성 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어,  $F(ab')_2$  이중특이성 항체)로서 제조될 수 있다.

이중특이성 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이성 항체의 통상적인 제조는 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현에 기초한다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 조합으로 인하여, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재

적 혼합물로 제조되고, 이들 중 하나만이 정확한 이중특이성 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계로 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거로우며, 생성물의 수득률도 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

다른 접근법에 따르면, 바람직한 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합된다. 바람직하게는, 적어도 힌지의 일부, CH2, 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과 융합된다. 경쇄 결합에 필수적인 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)이 하나 이상의 융합체에 존재하도록 하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 경우에 따라 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터로 삽입되어, 적합한 숙주 유기체로 동시-형질감염된다. 이는, 구성에 사용된 3개의 폴리펩티드쇄의 동일하지 않은 비율이 최적 수득률을 제공하는 경우, 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 상당한 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2개 이상의 폴리펩티드쇄의 발현이 높은 수득률을 야기하거나 비율이 특별히 중요하지 않은 경우, 하나의 발현 벡터에 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드쇄에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것도 가능하다.

이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 한 아암에 있는 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 아암에 있는 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 이중특이성 분자의 한쪽 반에서만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것이 분리의 쉬운 방법을 제공하기 때문에, 이 비대칭 구조가 원치않는 면역글로불린쇄 조합으로부터 바람직한 이중특이성 화합물의 분리를 촉진한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 접근은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이성 항체의 생성에 대한 추가의 상세한 설명은 예를 들어, 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)]을 참조한다. 미국 특허 제5,731,168호에 기술된 다른 접근법에 따르면, 1쌍의 항체 사이의 경계면을 조작하여, 재조합 세포 배양액으로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화시킬 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 C<sub>H</sub>3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 측쇄(들)과 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "공동 (cavity)"은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 치환시킴으로써 제2 항체 분자의 경계면에 생성된다. 이는 다른 원치않은 최종-생성물 (예컨대, 동종이량체)보다 이중이량체의 수득률을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

이중특이성 항체로는 가교 또는 "이중접합" 항체가 있다. 예를 들어, 이중 접합 항체 중 한 항체는 아비딘과 커플링되고 다른 항체는 비오틴과 커플링될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어, 면역계 세포를 원치않는 세포로 표적화시키고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료용인 것으로 제안된 바 있다 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 유럽특허 제03089호). 이중접합 항체는 임의의 편리한 가교법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에서 널리 공지되어 있고, 많은 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 기술되어 있다.

항체 단편으로부터 이중특이성 항체를 생성하는 기술은 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 이중특이성 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조될 수 있다. (문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]; [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]).

재조합 세포 배양액으로부터 직접 이중특이성 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기술도 기재되어 있다. 예를 들어, 이중특이성 항체는 류신 지퍼를 이용하여 제조된다 (문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]). 포스 (Fos) 및 준 (Jun) 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합으로 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성하고, 이어서 재산화시켜 항체 이중이량체를 형성하였다. 이 방법은 또한 항체 동종이량체의 제조에 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이중특이성 항체 단편을 제조하는 다른 방법을 제공하였다. 그 단편은 동일한쇄에서 2개의 도메인 사이에 페어링이 일어나지 않을 만큼 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V<sub>H</sub>)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인은 다른 단편의 상보성 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인과 쌍을 이루으로써, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 이용하여 이중특이성 항체 단편을 제조하는 다른 전략도 또한 보고되어 있다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)]을 참조한다.

2가 이상의 항체도 고려된다. 예를 들어, 삼중특이성 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)]). 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 항체는 WO 01/77342 (Miller and Presta)에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 이 거명을 통해 본원에 명백히 포함된 것으로 간주한다.

본원의 방법에서 사용되거나 제조 물품 중에 포함되는 항체는 임의로 세포독성제와 접합될 수 있다.



그러한 항체-세포독성제 접합체의 생성에서 유용한 화학요법제는 상기 기술되었다.

항체와 1종 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 마이탄신 (미국 특허 제5,208,020호), 트리코텐, 및 CC1065의 접합체도 본원에서 고려된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 마이탄신 분자와 접합된다 (예를 들어, 항체 분자 하나당 마이탄신 분자 약 1 내지 약 10개). 마이탄신은 예를 들어, May-SS-Me로 전환될 수 있고, May-SS-Me는 May-SH3로 환원되어, 변형된 항체와 반응함으로써 마이탄신노이드-항체 접합체를 생성할 수 있다 (문헌 [Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)]).

별법으로, 항체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된다. 항생제의 칼리케아미신류는 피코몰농도 이하의 농도에서 이중-가닥 DNA에 절단부(break)를 형성할 수 있다. 본원에서 사용되는 칼리케아미신의 구조적 유사체로는  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-아세틸- $\gamma_1^I$ , PSAG 및  $\Theta_1^I$ 가 있으나, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993)] 및 [Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)]).

사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편으로는 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A쇄 (슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의), 리신 A쇄, 아브린(abrin) A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 어메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotonin), 사파오나리아 오퍼시날리스(*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌(gelolin), 미토겔린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin) 및 트리코테세네스(tricothecenes)가 있다. 예를 들어, WO 93/21232 (1993년 10월 28일자로 공개됨)를 참조한다.

본 발명은 추가로 핵융해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 데옥시리보뉴클레아제 (DNase)와 같은 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제)과 접합된 항체를 고려한다.

다양한 방사성 동위원소가 방사성접합 항체의 생성에 사용될 수 있다. 그 예로는 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, 및 Lu의 방사성 동위원소가 있다.

항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987)]에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지 1-이소티오시아네이트 벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키는 대표적 킬레이트화제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포에서 세포독성 물질의 방출을 촉진하는 "절단가능 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰아이드-함유 링커 (문헌 [Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)])가 사용될 수 있다.

별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질이 예를 들어, 재조합 기술 또는 펩티드 합성으로 제조될 수 있다.

본 발명의 항체는 또한, 전구약물을 활성 항암제로 전환시키는 전구약물-활성화 효소와 접합될 수 있다 (예를 들어, 펩티드 화학요법제, WO 81/01145 참조). 예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호를 참조한다.

그러한 접합체의 효소 성분은 전구약물이 더욱 활성이 높은 세포독성 형태로 전환되도록 하는 방식으로 전구약물에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.

본 발명의 방법에서 유용한 효소로는 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술폰아이드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 아릴술폰아타제; 비-독성 5-플루오로시토신을 항암제인 5-플루오로우라실로 전환하는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 프로테아제, 예컨대 세라타아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신 (예컨대, 카텝신 B 및 L); D-아미노

산 치환기를 함유하는 전구약물을 전환하는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 탄수화물-절단 효소 (예컨대,  $\beta$ -갈락토시다제 및 뉴라미니다제);  $\beta$ -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한  $\beta$ -락타마제; 및 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 각각 유리 약물로 전환하는데 유용한 페니실린 아마이드제 (예컨대, 페니실린 V 아마이드제 또는 페니실린 G 아마이드제)가 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 별법으로, 당업계에서 "아브자임(abzyme)"으로도 공지된, 효소 활성을 갖는 항체가 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시키는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 접합체는 아브자임을 종양 세포 집단으로 전달하는 것에 대해 본원에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

본 발명의 효소는 당업계에 널리 공지된 기술에 의해, 예컨대 상기 언급된 헤테로 2관능성 가교 시약을 사용하여 항체에 공유결합될 수 있다. 별법으로, 적어도 본 발명의 효소의 기능적 활성 부분에 연결된, 적어도 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger *et al.*, *Nature*, 312: 604-608 (1984)] 참조).

항체의 다른 변형도 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다.

상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프가 항체 (특히, 항체 단편)에 혼입될 수 있는데, 이는 예를 들어, 미국 특허 제5,739,277호에 기술되어 있다. 본원에서 사용되는 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자 (예를 들어, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>)의 혈청 반감기를 증가시키는, IgG 분자의 Fc 영역에 있는 에피토프를 의미한다. 별법으로, 즉 추가로 혹자는 항체의 Fc 영역의 아미노산 서열을 변경시켜서 FcRn 결합력이 변경된 변이체를 생성시킴으로써 혈청 반감기를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. FcRn 결합력 및 혈청 반감기가 변경된 항체는 WO 00/42072 (Presta, L.)에 기재되어 있다.

본 발명은 또한 Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및/또는 CD20 항체를 포함하는 제제를 제공한다. 이러한 제제는 보관 뿐만 아니라 치료 투여에 특히 적합할 것으로 생각된다. 제제는 공지된 기술에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 제제는 겔 투과 컬럼 상에서 완충제 교환에 의해 제조할 수 있다.

전형적으로, 적절량의 허용되는 염 또는 담체를 제제 중에 사용하여 제제가 등장성이 되게 한다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액이 있다. 제제의 pH는 바람직하게는 약 6 내지 약 9, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 당업자에게는 특정 담체가, 예를 들어 투여 경로, 및 Apo-2 리간드, 사멸 수용체 항체 및/또는 CD20 항체의 농도에 따라 보다 바람직하게는 달라질 수 있음이 명백할 것이다.

치료 조성물은 적절한 순도의 목적 분자를 임의의 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합 (문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)])함으로써 동결 제제, 수용액 또는 수성 현탁액 형태로 제조할 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 바람직하게는 사용하는 투여량 또는 농도에서 투여자에게 비독성이며, 그 종류로는 완충제, 예컨대 트리스, HEPES, PIPES, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN(상표명)), 플루로닉스(PLURONICS(상표명)) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 있다.

이러한 담체의 추가적인 예로는 이온 교환제, 알루미늄, 스테아르산알루미늄, 렉시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충제 물질, 예컨대 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질, 예컨대 황산프로타민, 인산수소이온나트륨, 인산수소이온칼륨, 염화나트륨, 콜로이드성 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈 및 셀룰로스-기재 물질이 있다. 국소용 또는 겔-기재 형태를 위한 담체로는 다당류, 예컨대 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 또는 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 나무 왁스 알콜이 있다. 모든 투여를 위해, 통상적인 저장형이 적합하게는 사용된다. 이러한 형태로는, 예를 들어 마이크로캡슐제, 나노-캡슐제, 리포솜, 고약, 흡입형 제제, 비강 스프레이, 설하 정제 및 지속-방출형 제제가 있다.

생체내 투여에 사용하는 제제는 멸균해야 한다. 이는 용이하게는 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 멸균 여과 막을 통해 여과하여 달성한다. 전신 투여의 경우, 제제는 동결건조 형태 또는 용액으로 보관할 수 있다. 동결건조 형태의 경우, 전형적으로 사용할 때 재구성을 위해 다른 성분과 조합하여 적절한 희석제와 함께 배합한다. 액체 제제의 예로는, 피하 주사용의 단일-투여량 바이알에 충전된 멸균 투명 무색의 비보존 용액제가 있다.

치료용 제제는 일반적으로 살균 진입구를 갖는 용기, 예를 들어 정맥내 용액 주머니, 또는 피하주사용 바늘로 뚫을 수 있는 스탑퍼(stopper)가 있는 바이알에 넣는다. 제제는 바람직하게는 반복되는 정맥내 (i.v.), 피하 (s.c.), 근육내 (i.m.) 주사제 또는 주입제로, 또는 비강내 또는 폐내 전달에 적합한 에어로졸 제제로 (폐내 전달의 경우, 예를 들어 유럽 특허 제257,956호 참조) 투여한다.

Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체는 또한 지속-방출형 제제 형태로 투여할 수 있다. 적합한 지속-방출형 제제의 예로는, 단백질을 함유한 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 있으며, 이는 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형품 형태이다. 지속-방출형 매트릭스의 예로는, 문헌 [Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981)] 및 [Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)]에 기재된 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호, 유럽 특허 제58,481호), L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (문헌 [Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)]), 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 (상기 문헌 [Langer et al.]), 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대, 루프론 데포 (Lupron Depot) (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사용 미세구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (유럽 특허 제133,988호)이 있다.

본원에 기재되는 Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체는 다양한 치료 적용에 사용할 수 있다. 이들 적용 중에 다양한 암 및 면역 관련 질환의 치료 방법이 있다. 숙련된 진료의는 본원에 기재되는 다양한 병리 상태의 포유동물을 진단할 수 있다. 예를 들어 포유동물의 암 또는 면역 관련 질환의 진단 또는 검출을 고려하여 당업계의 진단 기술을 이용할 수 있다. 예를 들어, 암은 비체관적으로 촉진(palpation), 혈액 분석, x-선, NMR 등을 포함하는 기술을 통해 확인할 수 있다. 면역 관련 질환도 용이하게 확인할 수 있다. 전신성 홍반성 루푸스에서, 질환의 주요 매개자는 자가 단백질/조직에 대한 자가-반응성 항체의 생성 및 후속적인 면역-매개 염증의 발생이다. 신장, 폐, 근육격계, 점막 피부, 안구, 중추 신경계, 심혈관계, 위장관, 골수 및 혈액을 비롯한 다중 장기 및 시스템에 임상적으로 침범한다. 류마티스성 관절염(RA)은 만성 전신성 자가면역 염증성 질환이며, 이는 주로 관절 연골이 손상된 다중 관절의 윤활막과 관련된다. 병인론은 의존성 T 림프구이며, 자가 IgG에 대한 직접 자가-항체인 류마티스성 인자의 생성과 관련되며, 상기 인자의 생성은 관절 체액 및 혈액 중에 고 수준의 면역 복합체를 형성시킨다. 관절 공간/유액 다수의 호중구의 침가와 함께 유사 세포에 의해 침윤된 경우에 관절 중의 이들 복합체는 림프구 및 단핵세포의 윤활막으로의 현저한 침윤 및 후속적으로 현저한 윤활 변화를 유도시킬 수 있다. 침범된 조직은, 종종 비대칭 패턴의 관절이 대부분이다. 그러나, 외부-관절 질환이 2가지의 주요 유형으로 발생한다. 제1 유형은 전진 진행성 관절 질환을 갖는 외부-관절 병변, 및 폐 섬유증, 혈관염 및 피부 궤양의 국소 병변의 발병이다. 외부-관절 질환의 제2 유형은, RA 질환 과정 중 후기에, 종종 관절 질환이 정지된 후에 발생하며 호중구 감소증, 혈소판 감소증 및 비종대의 존재와 연관되는 소위 펠트 증후군이다. 이는 경색증, 피부 궤양 및 괴저가 발생하는 다중 장기에서 혈관염을 수반할 수 있다. 또한, 환자는 종종 침범된 관절과 겹쳐진 피하 조직에서 류마티스성 결절을 발전시키며; 결절 후기 단계는 혼합 염증성 세포 침윤물에 의해 둘러싸인 괴사 중심을 갖는다. RA에서 발생할 수 있는 다른 징후는 심낭염, 흉막염, 관상 동맥염, 폐 섬유증을 갖는 간질성 폐렴, 건성 각결막염 및 류마티스성 결절을 포함한다.

Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체는 공지된 방법, 예컨대 일정 시간을 통한 볼루스 또는 지속 주입에 의한 정맥내 투여로, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 윤활내, 수막강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로로 투여할 수 있다. 임의로는, 투여는 다양한 시판 장치를 이용하는 미니-펌프 주입을 통해 수행할 수 있다.

Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체를 투여하는데 유효한 투여량 및 스케줄은 경험적으로 결정될 수 있으며, 당업계의 기술 내에서 결정된다. 단일 또는 다중 투여량을 사용할 수 있다. 단독 사용시에 Apo2L/TRAIL의 유효 투여량 또는 유효량은 1일당 약 1  $\mu$ g/kg 내지 약 100 mg/kg (체중) 이상일 수 있는 것으로 현재 생각된다. 투여량의 중간 증감은, 예를 들어 문헌 [Mordenti et al., *Pharmaceut. Res.*, 8:1351 (1991)]에 개시된 바와 같이 당업계에 공지된 방식으로 수행될 수 있다.

Apo2L/TRAIL의 생체내 투여가 사용될 경우, 정상 투여량은 투여 경로에 따라 1일당 약 10 ng/kg 내지 100 mg/kg (포유동물 체중) 이상, 바람직하게는 약 1  $\mu$ g/kg/일 내지 10 mg/kg/일일 수 있다. 특정 투여량 및 전달 방법에 대한 지침은 문헌에 제시되어 있다: 예를 들어, 미국 특허 제4,657,760호; 동 제5,206,344호; 또는 동 제5,225,212호를 참조한다. 상이한 제제가 상이한 치료 화합물 및 상이한 질환에 대해 효과적이고, 예를 들어 한 장기 또는 조직을 표적으로 하는 투여는 다른

장기 또는 조직과 상이한 방식으로 전달될 것을 필요로 할 것으로 예상된다. 투여해야 하는 Apo2L/TRAIL의 투여량은, 예를 들어 Apo2L/TRAIL를 복용하는 포유동물, 투여 경로 및 포유동물에 투여되는 다른 약물 또는 치료제에 따라 달라질 것이다.

CD20 항체는, 세포 독성제에 접합되지 않은 리툽시맙 또는 인간화 2H7과 같은 항체일 수 있다. 비접합 항체에 적합한 투여량은, 예를 들어 약 20 mg/m<sup>2</sup> 내지 약 1000 mg/m<sup>2</sup> 범위이다. 한 실시양태에서, 상기 항체의 투여량은 현재 리툽시맙에 대한 권장량과는 상이하다. CD20 항체에 대한 예시적인 투여량 요법은 375 mg/m<sup>2</sup>씩 주당 4회 또는 8회; 또는 1000 mg씩 2회(예를 들어, 제1일 및 제15일)를 포함한다.

추가적 요법을 본 발명의 방법에 사용할 수 있음이 고려된다. 하나 이상의 다른 요법제는 당업계에 공지되고 특히 상기 섹션 I에서 추가로 정의된 방사선요법, 사이토카인(들), 성장억제제(들), 화학요법제(들), 세포독성제(들), 티로신 키나제 억제제, ras 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 혈관 형성 억제제 및 사이클린 의존성 키나제 억제제를 포함할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

예시적인 치료 항체로는 rhuMAb 4D5 (HERCEPTIN.)를 비롯한 항-HER2 항체 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)], 미국 특허 제5,725,856호); 항-IL-8 (문헌 [St John et al., Chest, 103:932 (1993)] 및 WO 95/23865); 인간화 및/또는 친화성 성숙 항-VEGF 항체, 예컨대 인간화 항-VEGF 항체 huA4.6.1 아비틴 (AVASTIN.)을 비롯한 항-VEGF 항체 (문헌 [Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992)], WO 96/30046, 및 WO 98/45331 (1998년 10월 15일에 공개됨)); 항-PSCA 항체 (WO 01/40309); S2C6 및 그의 인간화 변이체를 비롯한 항-CD40 항체 (WO 00/75348); 랩티바(Raptiva(상표명))를 비롯한 항-CD11a 항체 (미국 특허 제5,622,700호, WO 98/23761, 문헌 [Stepe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991)] 및 [Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)]); 항-IgE 항체 (문헌 [Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)] 및 WO 95/19181; 미국 특허 제5,714,338호 (1998년 2월 3일에 허여됨) 또는 미국 특허 제5,091,313호 (1992년 2월 25일에 허여됨), WO 93/04173 (1993년 3월 4일에 공개됨) 또는 국제 출원 번호 PCT/US98/13410 (1998년 6월 30일일 출원됨), 미국 특허 제5,714,338호); 항-CD18 항체 (미국 특허 제5,622,700호 (1997년 4월 22일) 또는 WO 97/26912 (1997년 7월 31일에 공개됨)); 항-Apo-2 수용체 항체 항체 (WO 98/51793 (1998년 11월 19일에 공개됨)); cA2 (REMICADE.) CDP571 및 MAK-195를 비롯한 항-TNF- $\alpha$  항체 (미국 특허 제5,672,347호 (1997년 9월 30일에 허여됨), 문헌 [Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646-1653 (1996)] 및 [Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461-1469 (1995)] 참조); 항-조직 인자 (TF) 항체 (유럽 특허 제0 420 937 B1호 (1994년 11월 9일에 특허됨)); 항-인간  $\alpha 4$ - $\beta 7$  인테그린 항체 (WO 98/06248 (1998년 2월 19일에 공개됨)); 항-EGFR 항체 (WO 96/40210 (1996년 12월 19일에 공개됨)의 키메라화 또는 인간화 225 항체); 항-CD3 항체, 예컨대 OKT3 (미국 특허 제4,515,893호 (1985년 5월 7일에 허여됨)); 항-CD25 또는 항-Tac 항체, 예컨대 CHI-621 (SIMULECT.) 및 ZENAPAX. (미국 특허 제5,693,762호 (1997년 12월 2일에 허여됨) 참조); 항-CD4 항체, 예컨대 cM-7412 항체 (문헌 [Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)]); 항-CD52 항체, 예컨대 CAMPATH-1H (문헌 [Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)]); 항-Fc 수용체 항체, 예컨대 Fc.RI에 대한 M22 항체 (문헌 [Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995)]); 항-암배아 항원 (CEA) 항체, 예컨대 hMN-14 (문헌 [Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)]; huBrE-3, hu-Mc 3 및 CHL6를 비롯한 유방 상피 세포에 대한 항체 (문헌 [Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995)]; 및 [Richman et al. Cancer Res. 55(23 Suppl): 5916s-5920s (1995)]); 결장 암종 세포에 결합하는 항체, 예컨대 C242 (문헌 [Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996)]); 항-CD38 항체, 예를 들어 AT 13/5 (문헌 [Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)]); 항-CD33 항체, 예컨대 Hu M195 (문헌 [Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)] 및 CMA-676 또는 CDP771; 항-CD22 항체, 예컨대 LL2 또는 림포시드(LymphoCide) (문헌 [Juweid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)]); 항-EpCAM 항체, 예컨대 17-1A (PANOREX.); 항-GpIIb/IIIa 항체, 예컨대 아브식시맙 또는 c7E3 Fab (REOPRO.); 항-RSV 항체, 예컨대 MEDI-493 (SYNAGIS.); 항-CMV 항체, 예컨대 PROTOVIR.; 항-HIV 항체, 예컨대 PRO542; 항-간염 항체, 예컨대 항-Hep B 항체 OSTAVIR.; 항-CA 125 항체 오바렉스(OvaRex); 항-개별특이형 GD3 에피토프 항체 BEC2; 항-v.3 항체 VITAXIN.; 항-인간 신장 세포 암종 항체, 예컨대 ch-G250; ING-1; 항-인간 17-1A 항체 (3622W94); 항-인간 직장결장 종양 항체 (A33); GD3 강글리시옴에 대한 항-인간 흑색종 항체 R24; 항-인간 편평-세포 암종 (SF-25); 및 항-인간 백혈구 항원 (HLA) 항체, 예컨대 스마트(Smart) ID10 및 항-HLA DR 항체 옹콜림(Oncolym) (Lym-1)이 있다.

화학요법을 위한 제제 및 투여 스케줄은 제작자의 지시서에 따르거나 숙련 진료의 경험상으로 결정하여 사용할 수 있다. 이러한 화학요법을 위한 제제 및 투여 스케줄은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다. 화학요법제는 Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및/또는 CD20 항체의 투여 전 또는 후에 투여될 수 있거나, 동시에 투여될 수 있다.

종종, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 억제제를 투여하는 것이 유리할 수 있다.

Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및 CD20 항체 (및 하나 이상의 다른 치료제)를 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 투여 후에, 시험관내에서 치료한 세포를 분석할 수 있다. 생체내에서 치료하는 경우에, 치료한 포유동물은 숙련된 의사에게 공지된 다양한 방식으로 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포는 괴사를 분석하기 위해 병리학적으로 조사할 수 있거나 또는 혈청을 면역계 반응에 대해 분석할 수 있다.

RA 및 다른 자가면역 질환의 경우, Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및/또는 CD20 항체는, 상기의 정의 섹션에 나열된 임의의 하나 이상의 면역억제제, 화학요법제 및/또는 사이토카인과 조합할 수 있다; 임의의 하나 이상의 질환-개선 항류마티스성 약물(DMARD), 예컨대 히드록시클로로퀸, 술파살라진, 메토타렉세이트, 레플루노마이드, 아자티오프린, D-페니실라민, 금(Gold) (경구), 금 (근육내), 미노시클린, 시클로스포린, 스타필로코쿠스(Staphylococcal) 단백질 A 면역흡착; 정맥내 이뮤노글로불린 (IVIG); 비스테로이드성 소염제 (NSAID); 글루코코르티코이드 (예를 들어, 관절 주사를 통해); 코르티코스테로이드 (예를 들어, 메틸프레드니솔론 및/또는 프레드니손); 폴레이트; 항-종양 괴사 인자 (TNF) 항체, 예를 들어 에타네르셉트/엔브렐(ENBREL(상표명)), 인플릭시맵/레미케이드(REMICADE(상표명)), D2E7 (놀(Knoll)) 또는 CDP-870 (셀텍(Celltech)); IL-1R 항체 (예를 들어, 키네레트(Kineret)); IL-10 항체 (예를 들어, 일로데카킨(Ilodecakin)); 혈액 응고 조절제 (예를 들어, 윈로(WinRho)); IL-6 항체/항-TNF (CBP 1011); CD40 항체 (예를 들어, IDEC 131); Ig-Fc 수용체 항체 (MDX33); 면역조절제 (예를 들어, 탈리도마이드(탈리도마이드) 또는 이뮤딘(ImmuDyn)); 항-CD5 항체 (예를 들어, H5g1.1); 대식세포 억제제 (예를 들어, MDX 33); 동시자극 차단제 (예를 들어, BMS 188667 또는 텔레리맵(Tolerimab)); 보체 억제제 (예를 들어, h5G1.1, 3E10 또는 항-붕괴 촉진 인자 (DAF) 항체); 또는 IL-2 항체 (zxSMART).

B 세포 악성 종양의 경우, 예를 들어 Apo2L/TRAIL, 사멸 수용체 항체 및/또는 CD20 항체는 화학요법제; 사이토카인, 예를 들어 림포카인, 예컨대 IL-2, IL-12, 또는 인터페론, 예컨대 인터페론  $\alpha$ -2a; 다른 항체, 예를 들어, 방사선표지된 항체, 예컨대 리브리투모맵 티옥세탄 (제바린(ZEVALIN(등록상표))), 요오드  $^{131}$  토시투모맵 (벡사르(BEXXAR(상표명))),  $^{131}$ I 림(Lym)-1 (웅콜림(상표명)),  $^{90}$ Y-림포사이드(LYMPHOCIDE(상표명)); 항-CD52 항체, 예컨대 알렘투부맵 (캠패스(CAMPATH)-1H(상표명)), 항-HLA-DR- $\beta$  항체, 예컨대 아폴리주맵, 항-CD80 항체 (예를 들어, IDEC-114), 에프라투주맵, Hu1D10 (SMART 1D10(상표명)), CD19 항체, CD40 항체 또는 CD22 항체; 면역조절제 (예를 들어, 탈리도마이드 또는 이뮤딘); 혈관신생 억제제 (예를 들어, 항-혈관 내피 증식 인자 (VEGF) 항체, 예컨대 아바스틴(AVASTIN(상표명)) 또는 탈리도마이드); 개별특이형 백신 (EPOCH); ONCO-TCS(상표명); HSPPC-96 (웅코파지(ONCOPHAGE(상표명))); 리포솜 요법 (예를 들어, 다우루비신 시트레이트 리포솜) 등과 조합할 수 있다.

본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기재된 암 또는 면역 관련 질환의 치료에 유용한 물질을 함유한 제조 물품을 제공한다. 한 측면에서, 제조 물품은 (a) CD20 항체를 포함하는 용기 (바람직하게는 용기는 용기내에 항체 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함함); (b) Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체를 포함하는 용기 (바람직하게는 용기는 용기내에 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함함); 및 (c) 환자의 암 또는 면역 관련 질환을 치료하기 위한 지시가 기재된 패키지 설명서 (여기서, 지시는 상기 질환을 치료하는데 있어 상승적 활성을 제공하기에 효과적인 CD20 항체 및 Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체의 양을 환자에게 투여한다는 것을 나타냄)를 포함한다.

이들 모든 측면에서, 패키지 설명서는 용기 상에 또는 용기에 부착되어 있다. 적합한 용기로는, 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등이 있다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 암 또는 면역 관련 질환을 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하거나 함유하고, 살균 진입구 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 주머니, 또는 피하주사용 바늘로 뚫을 수 있는 스태퍼가 있는 바이알일 수 있음)를 가질 수 있다. 조성물 중 1종 이상의 활성 제제는 CD20 항체, Apo2L/TRAIL 또는 사멸 수용체 항체이다. 표지 또는 패키지 설명서는, 제공되는 항체 및 임의의 다른 의약의 투여량 및 투여 간격에 대한 특정 지도와 함께 조성물이 치료에 적합한 환자 또는 대상체에서 암 또는 면역 관련 질환을 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 제조 물품은 제약상 허용되는 희석 완충제, 예컨대 정균성(bacteriostatic) 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거 용액 및/또는 텍스트로스 용액을 추가로 포함할 수 있다. 제조 물품은 다른 완충제, 희석제, 여과기, 바늘 및 시린지를 비롯하여 상업적 견지 및 사용자의 견지에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

하기 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되며, 임의의 방식으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 참조문헌은 그 전체가 그 거명으로써 명백히 본원에 포함된다.

## 실시예

실시에에서 언급하는 시판 시약은, 달리 나타내지 않았다면 제작자의 지시서에 따라 사용하였다. 하기 실시예 및 명세서 전반에서 ATCC로 나타내어 확인되는 세포의 공급처는 버지니아주 매나서스 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션이다.

## 실시예 1

### B 림프종 세포주에서의 Apo2L/TRAIL 수용체 발현 분석

인간 림프종 세포주에서 Apo2L/TRAIL 수용체 (DR4, DR5, DcR1 및 DcR2)의 세포-표면 발현을 조사하기 위해, DR4 (mAb 4H6.17.8; ATCC HB-12455), DR5 (mAb 3H3.14.5; HB-12534), DcR1 (mAb 6G9; 제넨테크 인크.(Genentech, Inc.)) 또는 DcR2 (mAb 1G9, 제넨테크 인크.)에 특이적인 모노클로날 항체를 사용하여 B 림프종 세포주 Ramos, Daudi, Raji 및 BJAB (ATCC)를 FACS로 분석하였다. Ramos 세포의 경우, 재현성을 확실히 하기 위해 분석을 2회 수행하였다 (Ramos A 및 B).

도 4에 예시되는 바와 같이, DR4 및 DR5는 4종의 모든 세포주에서 유의적인 수준 (대략 0.5 - 1.7 유닛의 평균 형광 이동)으로 발현된 반면, DcR1 및 DcR2는 보다 낮은 수준 또는 최소 수준 (대략 0 - 0.3 유닛의 평균 형광 이동)으로 발현되었다.

## 실시예 2

### B 림프종 세포주에서의 CD20 발현 분석

인간 림프종 세포주에서 CD20의 세포-표면 발현을 조사하기 위해, B 림프종 세포주 Ramos, Daudi, Raji 및 BJAB (ATCC)를 CD20 (리툭산(등록상표), 제넨테크 인크.)에 특이적인 모노클로날 항체를 사용하여 FACS로 분석하였다. Ramos 세포의 경우, 재현성을 확인하기 위해 분석을 2회 수행하였다 (Ramos A 및 B).

도 5에 예시되는 바와 같이, 4종의 모든 세포주는 대략 5 - 15 유닛의 평균 형광 이동으로 나타나는 높은 수준의 CD20를 발현하였다.

## 실시예 3

### SCID 마우스에서 미리-확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식의 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리툭산(등록상표) 또는 병용 치료의 효과

SCID 마우스에 인간 B-세포 비-호지킨 BJAB 림프종 세포 (ATCC) (마우스 1마리 당 2000만개 세포)를 피하 주사하여 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>으로 증식시켰다. 이어서, 상기 마우스를 4개의 연구군 (1군당 8마리의 마우스)로 나누고, 비히클 (0.5 M Arg-숙시네이트/20 mM 트리스/0.02% 트윈 20 pH =7.2), Apo2L/TRAIL (도 1의 아미노산 114 내지 281) (60 mg/kg)을 2주에 걸쳐 1주당 5회 (즉, 제0일 내지 제4일 및 제7일 내지 제11일) 복막내 (IP) 투여하거나, 또는 리툭산(등록상표) (4 mg/kg, 제넨테크 인크.) 또는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표) 치료제의 조합을 2주에 걸쳐 1주당 1회 IP 투여 처리하였다 (도 6).

비히클-처리 마우스에서 종양은 급속히 증식한 반면, 단일-제제 Apo2L/TRAIL 또는 리툭산(등록상표) 처리는 현저히 종양 증식을 지연시켰다. Apo2L/TRAIL 군의 1마리 마우스에서 완전한 종양 제거가 나타나서, 7/8의 종양 발생률 (TI)을 보였다. 리툭산(등록상표) 처리는 어떠한 종양도 제거하지 못했지만, 보다 연장된 효과를 나타냈다. 중요하게는, Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표)으로의 조합 처리는 모든 마우스에서 종양 부피를 현저하게 감소시켰으며, 8마리의 마우스 중 5마리에서 종양이 완전히 제거되었고, 8마리 중 3마리에서 28일 이상 동안 최소 종양 증식을 보였다. 이러한 결과는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표)이 림프종 이종이식에 대해 상승적 항-종양 활성을 제공할 수 있음을 나타낸다.

## 실시예 4

### SCID 마우스에서 증식된 미리-확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식의 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리툭산(등록상표) 또는 병용 치료의 효과

실시에 3에 기재된 연구와 유사한 연구를 수행하였다. SCID 마우스에 인간 B-세포 비-호지킨 BJAB 림프종 세포 (ATCC) (마우스 1마리 당 2000만개 세포)를 피하 주사하여 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>으로 증식시켰다. 이어서, 상기 마우스를 4개의 연구군 (1군당 8마리의 마우스)로 나누고, 비히클 (0.5 M Arg-숙시네이트/20 mM 트리스/0.02% 트윈 20 pH=7.2), Apo2L/TRAIL ("Apo2L.0"; 도 1의 아미노산 114 내지 281) (60 mg/kg)을 2주에 걸쳐 1주당 5회 (즉, 제0일 내지 제4일 및 제7일 내지 제11일) 복막내 (IP) 투여하거나, 또는 리툭산(등록상표)(4 mg/kg, 제넨테크 인크.) 또는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표) 치료제의 조합을 2주에 걸쳐 1주당 1회 IP 투여 처리하였다.

결과를 도 7에 나타냈다. 비히클-처리 마우스에서 종양은 급속히 증식한 반면, 단일-제제 Apo2L/TRAIL 또는 리툭산(등록상표) 처리는 현저히 종양 증식을 지연시켰다. Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표) 단독은 완전 퇴행을 전혀 야기시키지 못했지만, 리툭산(등록상표)은 보다 연장된 효과를 나타냈다. 실시예 3에 기재된 연구에서와 같이, Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표)으로의 조합 처리는 모든 마우스에서 종양 부피를 현저하게 감소시켰으며, 7마리의 마우스 중 6마리에서 종양이 완전히 제거되었다. 이러한 결과는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표)이 림프종 이중이식에 대해 상승적 항-종양 활성을 제공할 수 있음을 나타낸다.

#### 실시예 5

##### SCID 마우스에서 증식된 미리-확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이중이식의 카스파제 프로세싱에 대한 Apo2L/TRAIL, 리툭산(등록상표) 또는 병용 치료의 효과

처리 종양에서 아파토시스-매개 카스파제의 프로세싱을 조사하기 위해 (단백질분해 카스파제 프로세싱에 의해 나타남), SCID 마우스에 인간 B-세포 비-호지킨 BJAB 림프종 세포 (ATCC) (마우스 1마리 당 2000만개 세포)를 피하 주사하여 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>으로 증식시켰다. 이어서, 상기 마우스를 비히클 (0.5 M Arg-숙시네이트/20 mM 트리스/0.02% 트윈 20 pH=7.2) (n=1)로 처리하거나, Apo2L/TRAIL (60 mg/kg) (n=1)로 1회 IP 투여 처리하거나, 또는 리툭산(등록상표)(4 mg/kg, 제넨테크 인크.) (n=2) 또는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표) 치료제의 조합 (n=2)으로 1회 IP 투여 처리하였다. 처리 2일 후에, 종양을 수확하고, 용해 완충제로 용해시키고, 카스파제 8, 3, 9 및 7에 대해 특이적인 항체로 이뮤노블롯하여 (로딩 대조군으로서 항-β 액틴 항체 사용) 카스파제 프로세싱을 가시화시켰다 (도 8).

Apo2L/TRAIL 처리 (A)는 비히클 대조군 (V)에 비해 카스파제 8, 3, 9 및 7의 프로세싱 증가를 유도한 반면, 리툭산(등록상표)(R)은 카스파제 프로세싱을 유도하지 못했다. 현저하게, Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표)으로의 조합 처리 (AR)는 Apo2L/TRAIL 단독에 비해 카스파제 프로세싱을 더 증가시키지 못했다. 이러한 결과는 Apo2L/TRAIL과 리툭산(등록상표) 사이의 상승적 항-종양 활성이 아파토시스의 증대에 의해 반드시 매개되는 것은 아니며, Apo2L/TRAIL에 의해 매개되는 아파토시스 활성화와 리툭산(등록상표)에 의해 매개되는 ADCC와의 보체-의존성 용해의 조합이, 관찰되는 항-종양 상승작용의 근간이 될 수 있음을 시사한다.

#### 실시예 6

##### SCID 마우스에서 미리-확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이중이식의 증식에 대한 아고니스트 DR5 항체, 리툭산(등록상표) 또는 병용 치료의 효과

SCID 마우스에 인간 B-세포 비-호지킨 BJAB 림프종 세포 (ATCC) (마우스 1마리 당 2000만개 세포)를 피하 주사하여 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>으로 증식시켰다. 이어서, 상기 마우스를 4개의 연구군 (1군당 7마리의 마우스)로 나누고, 비히클 (0.5 M Arg-숙시네이트/20 mM 트리스/0.02% 트윈 20 pH=7.2), 아고니스트 DR5 모노클로날 항체 ("Apomab") (10 mg/kg) 또는 리툭산(등록상표)(4 mg/kg), 또는 DR5 항체와 리툭산(등록상표) 치료제의 조합으로 2주에 걸쳐 1주당 1회 (즉, 제0일 및 제7일) 복막내 (IP) 투여 처리하였다 (도 9). 비히클-처리 마우스에서 종양은 급속히 증식한 반면, 단일-제제 DR5 항체 또는 리툭산(등록상표) 처리는 현저히 종양 증식을 지연시켰다. 중요하게는, DR5 항체와 리툭산(등록상표)으로의 조합 처리는 모든 마우스에서 종양 부피를 현저하게 감소시켰으며, 7마리의 마우스 중 5마리에서 종양이 완전히 제거되었고, 7마리 중 2마리에서 35일 이상 동안 최소 종양 증식을 보였다. 이러한 결과는 아고니스트 DR5 항체와 리툭산(등록상표)이 림프종 이중이식에 대해 상승적 항-종양 활성을 제공할 수 있음을 나타낸다.

#### 실시예 7



SCID 마우스에서 미리-확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식의 카스파제 프로세싱에 대한 아고니스트 DR5 항체, 리톡산(등록상표) 또는 병용 치료의 효과

처리 종양에서 아팍토시스-매개 카스파제의 프로세싱을 조사하기 위해 (단백질분해 카스파제 프로세싱에 의해 나타남), SCID 마우스에 인간 B-세포 비-호지킨 BJAB 림프종 세포 (ATCC) (마우스 1마리 당 2000만개 세포)를 피하 주사하여 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>으로 증식시켰다. 이어서, 상기 마우스를 비히클 (0.5 M Arg-숙시네이트/20 mM 트리스/0.02% 트윈 20 pH=7.2) (n=1)로 처리하거나, 또는 리톡산(등록상표)(4 mg/kg) (n=2)로 1회 IP 투여 처리하거나, 또는 아고니스트 DR5 항체 (60 mg/kg) (n=2) 또는 DR5 항체와 리톡산(등록상표) 치료제의 조합 (n=2)으로 1회 IP 투여 처리하였다. 처리 2일 후에, 종양을 수확하고, 용해 완충제로 용해시키고, 카스파제 8, 3, 9 및 7에 대해 특이적인 항체로 이뮤노블롯하여 (로딩 대조군으로서 항-β 액틴 항체 사용) 카스파제 프로세싱을 가시화시켰다 (도 10).

아고니스트 DR5 항체 처리 (A)는 비히클 대조군 (V)에 비해 카스파제 8, 3, 9 및 7의 프로세싱의 증가를 유도한 반면, 리톡산(등록상표) (R)은 카스파제 프로세싱을 유도하지 못했다. 현저하게, DR5 항체와 리톡산(등록상표)으로의 조합 처리 (AR)는 DR5 항체 단독에 비해 카스파제 프로세싱을 더 증가시키지 못했다. 이러한 결과는 DR5 항체와 리톡산(등록상표) 사이의 상승적 항-종양 활성이 아팍토시스의 증대에 의해 반드시 매개되는 것이 아니지만, 아고니스트 DR5 항체에 의해 매개되는 아팍토시스 활성화와 리톡산(등록상표)에 의해 매개되는 ADCC와의 보체-의존성 용해의 조합이, 관찰되는 항-종양 상승작용의 근간이 될 수 있음을 시사한다.

NHL 세포주에서 CD20 및 Apo2L/TRAIL 수용체의 발현, 및 암 세포에 대한 리톡시맙, Apo2L/TRAIL 및 이들의 조합의 효과를 예시하는 추가 데이터를 도 11 내지 16에 제공하였다.

### 도면의 간단한 설명

도 1A는 인간 Apo-2 리간드 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 (서열 2) 및 그의 유도된 아미노산 서열 (서열 1)을 도시한 것이다. 뉴클레오타이드 위치 447에서의 "N"은 해당 뉴클레오타이드 염기가 "T" 또는 "G"일 수 있다는 것을 표시하기 위해 사용된다.

도 2A 및 2B는 전장 인간 DR4에 대한 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 (서열 4) 및 그의 유도된 아미노산 서열 (서열 3)을 도시한 것이다. 인간 DR4에 대한 각각의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열이 또한 문헌 [Pan et al., *Science*, 276:111 (1997)]에 보고되어 있다.

도 3A는 1998년 11월 19일자로 WO 98/51793에 공개된 바와 같은 인간 DR5의 411개 아미노산 서열 (서열 5)을 도시한 것이다. 인간 DR5의 전사 스플라이스 변이체는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 DR5 스플라이스 변이체는 1998년 8월 20일자로 WO 98/35986에 공개된 바와 같은, 도 3B 및 도 3C에 나타난 인간 DR5의 440개 아미노산 서열 (서열 6)을 코딩한다.

도 4는 B 림프종 세포주 중의 Apo2L/TRAIL 수용체의 발현을 나타낸다.

도 5는 B 림프종 세포주 중의 CD20의 발현을 나타낸다.

도 6은 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡산(등록상표) 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 7은 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡산(등록상표) 또는 Apo2L/TRAIL 및 리톡산(등록상표)의 조합 처리의 영향에 대한 결과를 추가로 나타낸다.

도 8은 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식 증식 중의 카스파제 프로세싱에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡산(등록상표) 또는 Apo2L/TRAIL 및 리톡산(등록상표)의 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 9는 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식 증식에 대한 DR5 아고니스트 항체, 리톡산(등록상표) 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.



도 10은 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 BJAB 림프종 종양 이종이식 증식 중의 카스파제 프로세싱에 대한 DR5 아고니스트 항체, 리톡산(등록상표) 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 11은 NHL 세포주 중의 CD20 및 Apo2L/TRAIL 수용체의 발현을 나타낸다.

도 12는 SCID 마우스 중의 이전 확립된 피하 Ramos RA1 종양 이종이식 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡시맙, 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 13은 SCID 마우스 중의 이전 확립된 DOHH-2 여포성 림프종 이종이식 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡시맙, 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 14는 BJAB 세포에 대한 Apo2L/TRAIL 및 리톡시맙 또는 조합 처리에 의해 사멸시키는 세포의 영향 및 메커니즘을 나타낸다.

도 15는 SCID 마우스 중의 Ramos T1 종양 이종이식 증식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡시맙, 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

도 16은 SCID 마우스 중의 BJAB-Luc 종양 이종이식에 대한 Apo2L/TRAIL, 리톡시맙, 또는 조합 처리의 영향을 나타낸다.

## 도면

### 도면1

```

1 TTTCTCTACTGACTATATAAAGAATAGAGAAGGAAGGGCTTCAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGCGTGCTGATCGTGATCTTCACAGTGCTCCTGCAGTCTCTCTGT
1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
181 GTGGCTGTAACCTACGTGTAACCTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTGTCTTCTTAAAGAA
31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGTATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTGAGCTCGTTAGAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCCAGAGGAAGAAGCAACACATTGTCTTCTCCAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTTCCTCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAATGGTGAAGTGGTCATCCATGAAAAAGGG
151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
631 TTTTACTACATCTATCCCAACATACCTTTCGATTTTCAGGAGGAAATAAAGAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCAATATATT
181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAAATACACAAAGTTATCCTGACCCATATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTATCAAGGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAATTTTGTCTGTAACAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGGCCTTTTGTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStop
991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAATCTGACCAAAACAACAAACAGAAA

```

도면2A

1 ATGGCGCCAC CACCAGCTAG AGTACATCTA GGTGCGTTCC TGGCAGTGAC  
TACCGCGGTG GTGGTCGATC TCATGTAGAT CCACGCAAGG ACCGTCACTG  
1 MetAlaProP roProAlaAr gValHisLeu GlyAlaPheL euAlaValTh

51 TCCGAATCCC GGGAGCGCAG CGAGTGGGAC AGAGGCAGCC GCGGCCACAC  
AGGCTTAGGG CCTTCGCGTC GCTCACCCCTG TCTCCGTCGG CCGCGGTGTG  
rProAsnPro GlySerAlaA laSerGlyTh rGluAlaAla AlaAlaThrPro

101 CCAGCAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATTGAACC ACGAGGCGGG  
GGTCGTTTCA CACCCCGAGA AGGCGCCCTT CTTAACTTGG TGCTCCGCCC  
35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCG  
CGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCCT GTCGTGCCTG GGTACGCGGC  
GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

201 GGCCCGGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCCGGCGCGG GAAGCCAGCC  
CCGGGCGCGT CCGCGCGCGG GTCCTGGGTC CCGCCGCGCC CTTCGGTCGG  
68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerP

251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCGT CGGGGTCCTG  
GAGCCGAGGC CCAGGTGTTT TGGAGTTTCA AACAGCAGCA GCCCAGGAC  
roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

301 CTGCAAGTGC TACCTAGCTC AGCTGCAACC ATGATCAATC AATTGGCACA  
GACGTCCAGC ATGGATCGAG TCGACGTTGG TAGTTTGAAG TACTAGTTAG  
101 LeuGlnValV alProSerSe rAlaAlaThr ileLysLeuH isAspGlnSe

351 AATTGGCACA CAGCAATGGG AACATAGCCC TTTGGGAGAG TTGTGTCCAC  
TTAACCGTGT GTCGTTACCC TTGTATCGGG AAACCTCTC AACACAGGTG  
rIleGlyThr GlnGlnTrpG luHisSerPr oLeuGlyGlu LeuCysProPro

401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCCTGGAG CCTGTAACCG GTGCACAGAG  
GTCCTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GGACATTGGC CACGTGTCTC  
135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

451 GGTGTGGGTT ACACCAATGC TTCCAACAAT TTGTTTGCTT GCCTCCCATG  
CCACACCCAA TGTGGTTACG AAGGTGTGTA AACAAACGAA CCGAGGGTAC  
GlyValGlyT yrThrAsnAl aSerAsnAsn LeuPheAlaC ysLeuProCys

501 TACAGCTTGT AAATCAGATG AAGAAGAGAG AAGTCCCTGC ACCACGACCA  
ATGTCGAACA TTTAGTCTAC TTCTTCTCTC TTCAGGGACG TGGTGCTGGT  
168 ThrAlaCys LysSerAspG luGluGluAr gSerProCys ThrThrThrA

551 GGAACACAGC ATGTCAGTGC AAACCAGGAA CTTTCCGGAA TGACAATTCT  
CCTTGTGTCTG TACAGTCACG TTTGGTCCTT GAAAGGCCTT ACTGTTAAGA  
rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgAs nAspAsnSer

601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA  
CGACTCTACA CGGCCTTCAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACCAATT  
201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetVally

651 GGTCAAGGAT TGTACGCCCT GGAGTGACAT CGAGTGTGTC CACAAAGAAT  
CCAGTTCCTA ACATGCGGGA CCTCACTGTA GCTCACACAG GTGTTTCTTA  
sValLysAsp CysThrProT rpSerAspIl eGluCysVal HisLysGluSer

도면2B

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATTT TGGTTGTGAC TTTGGTTGTT  
 GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AAACCAACAA  
 235 GlyAsnGly yHisAsnIle TrpValIleL euValValTh rLeuValVal

751 CCCTTGCTGT TGGTGGCTGT GCTGATGTG TGTGTGTGCA TCGGCTCAGG  
 GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACAACGT AGCCGAGTCC  
 ProLeuLeuL euValAlaVa lLeuIleVal CysCysCysI leGlySerGly

801 TTGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTTC TGGCGCTTGG  
 AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCAGACAAAG ACCGCGAACC  
 268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG

851 GTCTCCTACG AGGGCCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACA CGAGATCTCTG  
 CAGAGGATGC TCCCGGACCC CGACTCCTGT TACGAGTGT GCTCTAAGAC  
 lyLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspA snAlaHisAs nGluIleLeu

901 AGCAACGCAG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AAATGGAAAG  
 TCGTTGCGTC TGAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTACCTTTTC  
 301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe

951 CCAGGAGCCG GCAGATTGA CAGGTGTGAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG  
 GGTCTCTGGC CGTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCTCTCC  
 rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAGCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG  
 GTGTCACAGA CGACCCCTGGC CGTCTTCGAC TTCCAGAGT CTCCTCTCTCC  
 335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerGl nArgArgArg

1051 CTGCTGGTTC CAGCAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT  
 GACGACCAAG GTCCGTTTACC ACGACTGGGG TGACTCTGAG ACTACGACAA  
 LeuLeuValP roAlaAsnGl yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTTTGACAAG TTTGCAAACA TCGTGCCCTT TGAATCCTGG GACCACTCA  
 GAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGGTCGAGT  
 368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

1151 TGAGGCAGCT GGACCTCAGC AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT  
 ACTCCGTCGA CCTGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA  
 etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly

1201 ACAGCAGGCC CAGGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA  
 TGTGCTCCGG GTCCCTTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT  
 401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aLeuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs

1251 CAAAACTGGA CGGAACGCCT CGATCCACAC CCTGCTGGAT GCCTTGGAGA  
 GTTTTGACCT GCCTTGCGGA GCTAGGTGTG GGACGACCTA CGGAACCTCT  
 nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg

1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC  
 CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTCTCT AAGTCCTGGA GAACCACTG  
 435 MetGluGl uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTCT  
 AGACCTTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA  
 SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAGTGA  
 CCTCACT  
 468 GluOP\*

도면3A

1 MEQRGQNAAPASGARKRHGPGPREARGARPGRLVLPKTLVLVVAVLLVSAESALITQQD  
 61 LAPQQRAPQQRSSPSEGLCPPGHHSIEDGRDCISCKYQDYSTHWNDLLFLRCTRCD  
 121 SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPENCRKCRGTGCPRGMVKGVDCTPWSDECVH  
 181 KE~~SGIIIGVTVA~~AVLVAVFVCKSLWKKVLPLYLKGICSGGGDPERVDSSQRPGEAD  
 241 NVLNEIVSILQPTQVPEQEMEVOEPAEPTGVNMLSPGESEHLLPEAEARSQRRRLVPA  
 301 NEGDPTETLRQCFDDFADLVFPD~~SWEP~~LMRKLGLMDNEIKVAKAEAAAGHRDTLYTMLIKW  
 361 VNKTGRDASVHTLLDALETTLGERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

도면3B

```

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1           5           10           15
Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
 20           25           30
Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35           40           45
Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50           55           60
Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65           70           75           80
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85           90           95
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
100           105           110
Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
115           120           125
Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
130           135           140
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
145           150           155           160
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
165           170           175
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro
180           185           190
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro
195           200           205
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
210           215           220
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
225           230           235           240
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu
245           250           255
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu
260           265           270
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu
275           280           285

```

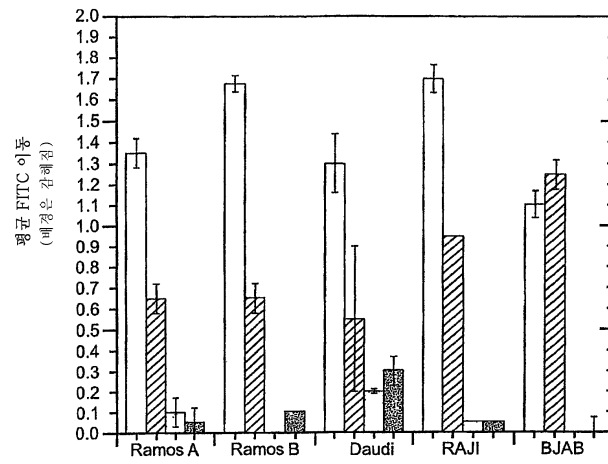
도면3C

```

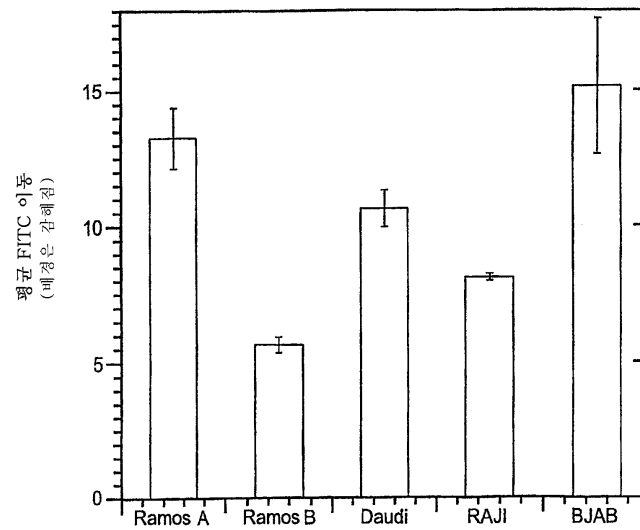
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
290           295           300
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser
305           310           315           320
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu
325           330           335
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp
340           345           350
Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile
355           360           365
Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr
370           375           380
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His
385           390           395           400
Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln
405           410           415
Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
420           425           430
Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser *
435           440

```

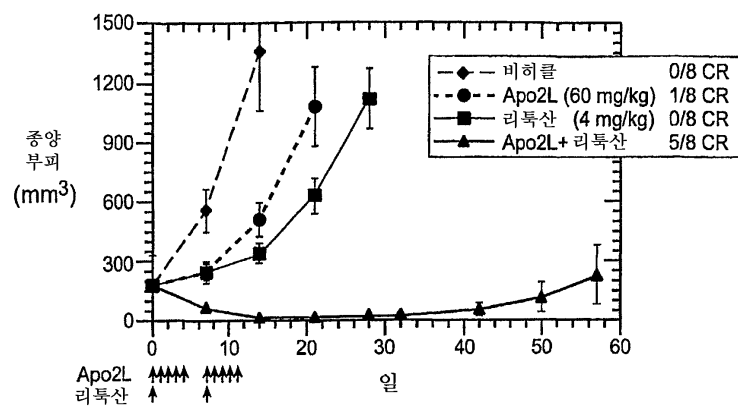
도면4



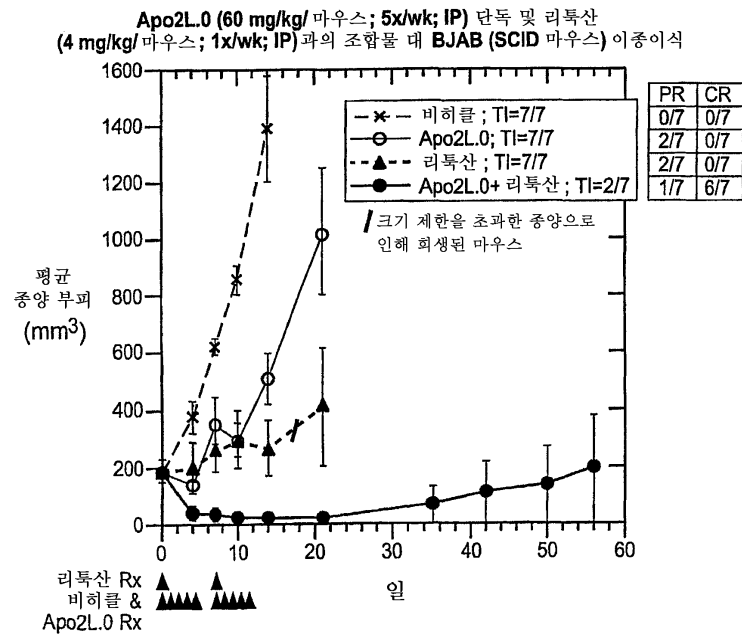
도면5



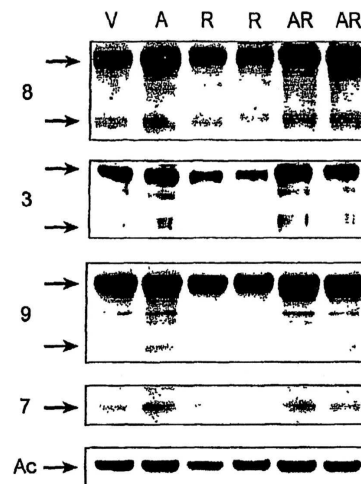
도면6



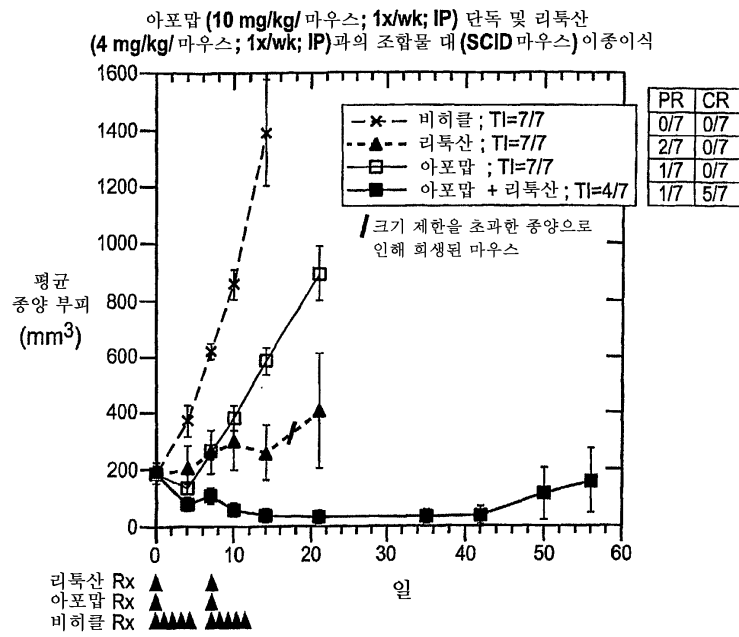
도면7



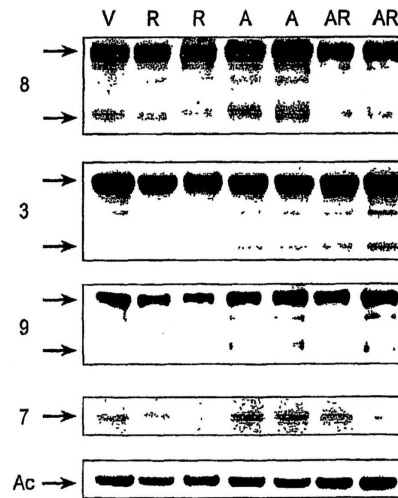
도면8



도면9

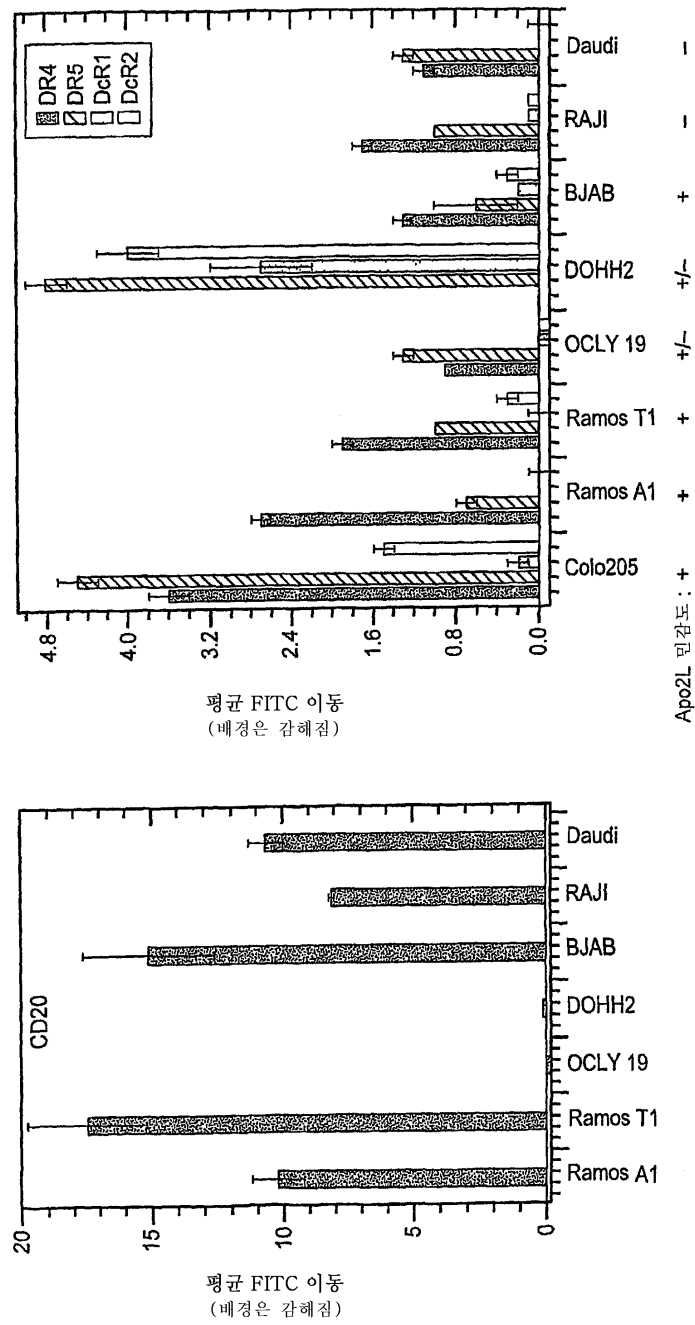


도면10



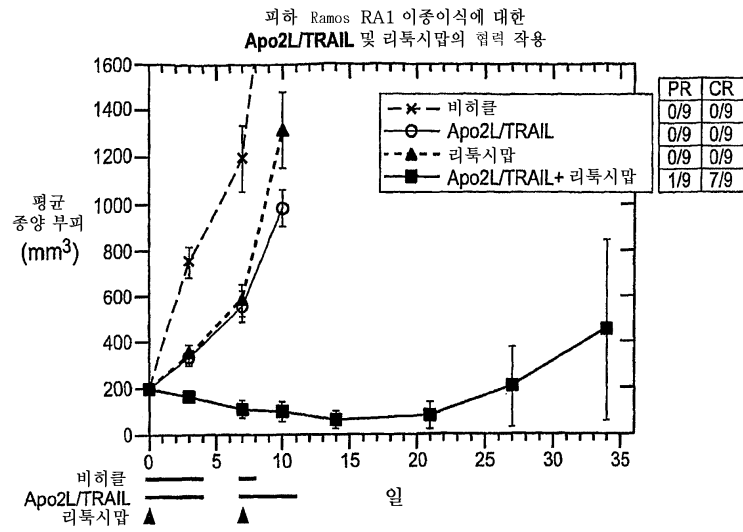
도면11

NHL 세포주 상에서의 Apo2L / TRAIL 수용체의 발현

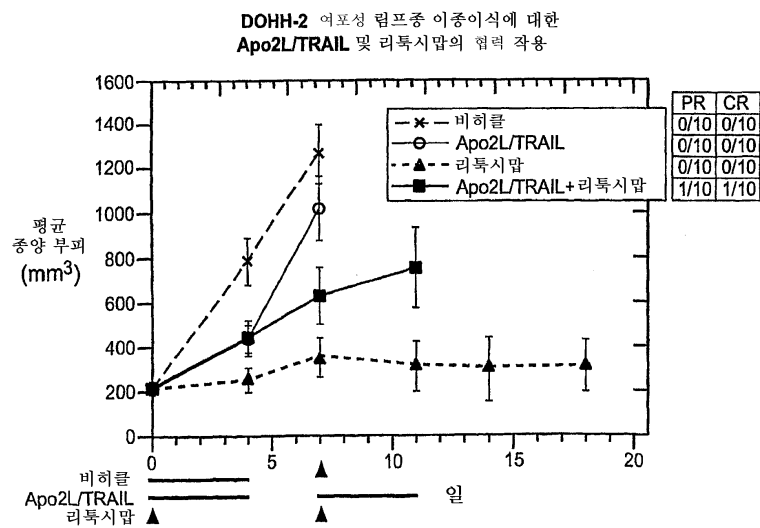




도면12

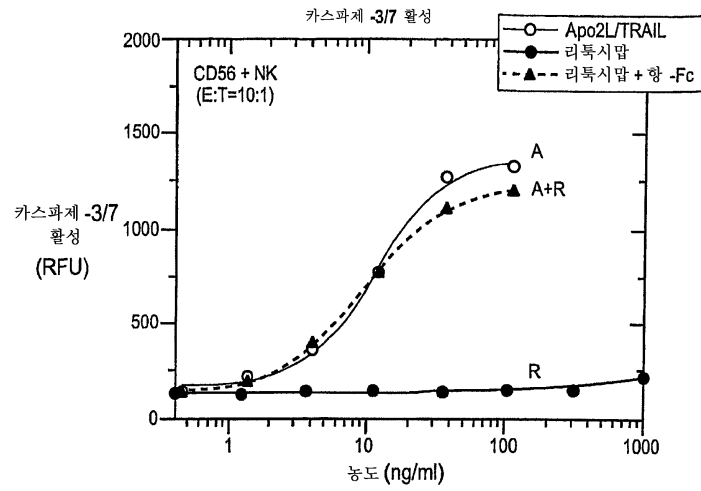


도면13

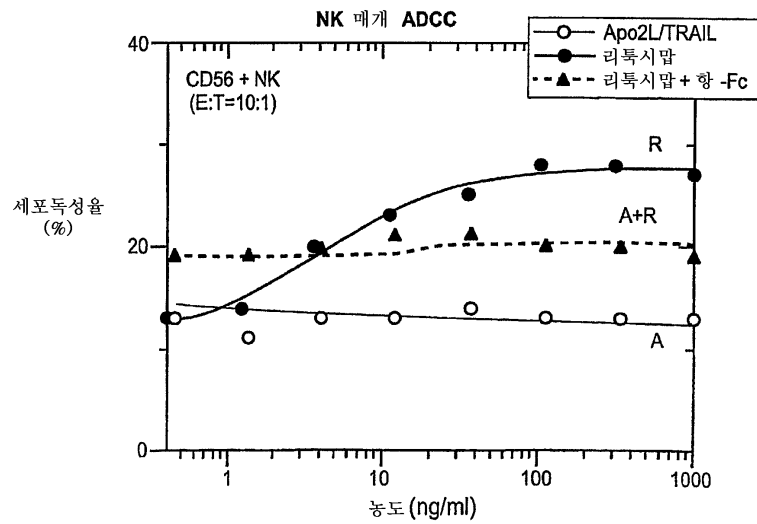


### 도면14A

독립적 메커니즘에 의해 BJAB 세포를  
사멸시키는 리톡시맵 및 Apo2L/TRAIL

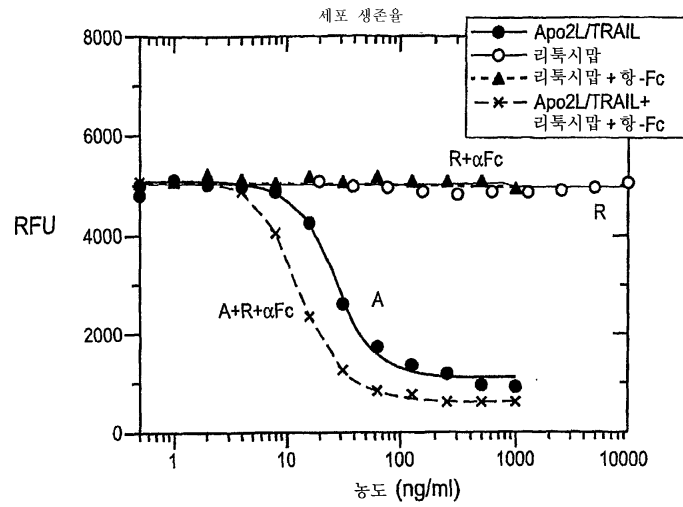


### 도면14B



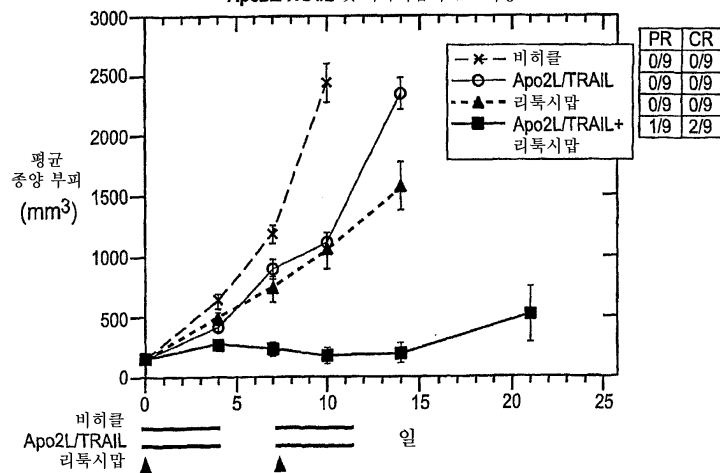
도면14C

독립적 메카니즘에 의해 BJAB 세포를  
사멸시키는 리톡시맙 및 Apo2L/TRAIL

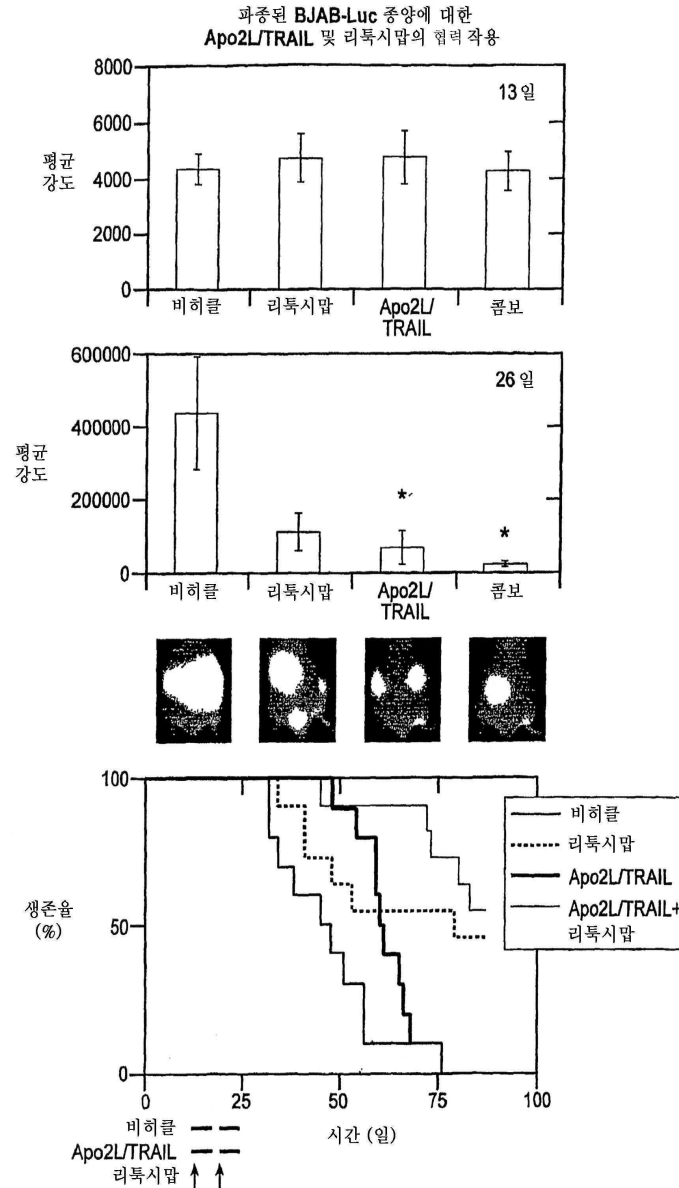


도면15

Ramos T1(리톡시맙-저항성) 종양에 대한  
Apo2L/TRAIL 및 리톡시맙의 협력 작용



도면16



## 서열목록

- <110> Genentech, Inc.
- <120> METHODS OF USING DEATH RECEPTOR LIGANDS AND CD20 ANTIBODIES
- <130> P2031R1A PCT
- <140> PCT/US2005/031907
- <141> 2005-09-07
- <150> US 60/607,909
- <151> 2004-09-08
- <150> US 60/666,553

<151> 2005-03-30

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala  
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys  
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr  
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val  
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser  
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro  
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly  
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu  
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly  
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile  
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe  
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln  
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys

210	215	220
Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr		
225	230	235 240
Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile		
	245	250 255
Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala		
	260	265 270
Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly		
	275	280

<210> 2  
 <211> 1042  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> mutation  
 <222> (447)  
 <223> N may be T or G

<400> 2	
tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggcct cagtgaccgg ctgcctggct	60
gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga tggagggtcca ggggggaccc	120
agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt	180
gtggctgtaa cttacgtgta ctttaccac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc	240
aaaagtggca ttgcttggtt cttaaaagaa gatgacagtt attggggaccc caatgacgaa	300
gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct cgtagaag	360
atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc aagaaaagca acaaaatatt	420
tctcccctag tgagagaaaag aggtccncag agagtagcag ctacacataac tgggaccaga	480
ggaagaagca acacattgtc ttctccaaac tccaagaatg aaaagggtct gggccgcaaa	540
ataaactcct gggaatcatc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg	600
aatggtgaac tggatcatcca tgaaaaaggg ttttactaca tctattccca aacatacttt	660
cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca aacaaatggg ccaatatatt	720
tacaaataca caagttatcc tgaccctata ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt	780

tgggtctaaag atgcagaata tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt 840  
aaggaaaatg acagaatttt tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggaccat 900  
gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga aaaagcaata 960  
acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat gaagatgttt caaaaaatct 1020  
gacccaaaaca aacaaacaga aa 1042

<210> 3  
<211> 468  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15  
Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala  
20 25 30  
Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile Glu Pro Arg  
35 40 45  
Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly Gln His Gly Pro  
50 55 60  
Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg  
65 70 75 80  
Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val  
85 90 95  
Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys  
100 105 110  
Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu  
115 120 125  
Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala  
130 135 140  
Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn  
145 150 155 160  
Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu  
165 170 175  
Arg Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro  
180 185 190

Gly Thr Phe Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser  
195 200 205

Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp  
210 215 220

Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile  
225 230 235 240

Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val Ala  
245 250 255

Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asp Pro  
260 265 270

Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu Leu Arg Gly  
275 280 285

Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu Ser Asn Ala Asp  
290 295 300

Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met Glu Ser Gln Glu Pro  
305 310 315 320

Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys  
325 330 335

Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu  
340 345 350

Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe  
355 360 365

Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met  
370 375 380

Arg Gln Leu Asp Leu Thr Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly  
385 390 395 400

Thr Ala Gly Pro Gly Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val  
405 410 415

Asn Lys Thr Gly Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu  
420 425 430

Glu Arg Met Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu  
435 440 445

Val Asp Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Gly Ser Ala  
450 455 460

Val Ser Leu Glu  
465



<210> 4  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 atggcgccac caccagctag agtacatcta ggtgcgttcc tggcagtgac tccgaatccc 60  
 gggagcgcag cgagtgggac agaggcagcc gcggccacac ccagcaaagt gtggggctct 120  
 tccgcgggga ggattgaacc acgaggcggg ggccgaggag cgctccctac ctccatggga 180  
 cagcacggac ccagtgcccg ggcccgggca gggcgcgccc caggacccag gccggcgcg 240  
 gaagccagcc ctcggtcccg ggtccacaag accttcaagt ttgtcgtcgt cggggtcctg 300  
 ctgcaggtcg tacctagctc agctgcaacc atgatcaatc aattggcaca aattggcaca 360  
 cagcaatggg aacatagccc tttgggagag ttgtgtccac caggatctca tagatcagaa 420  
 cgtcctggag cctgtaaccg gtgcacagag ggtgtgggtt acaccaatgc ttccaacaat 480  
 ttgtttgctt gcctcccatg tacagcttgt aaatcagatg aagaagagag aagtcctctg 540  
 accacgacca ggaacacagc atgtcagtgc aaaccaggaa ctttccggaa tgacaattct 600  
 gctgagatgt gccggaagtg cagcacaggg tgccccagag ggatgggtcaa ggtcaaggat 660  
 tgtacgccct ggagtgacat cgagtgtgtc cacaaagaat caggcaatgg acataatata 720  
 tgggtgattt tggttgtgac tttggttggt ccgttgctgt tgggtggctgt gctgattgtc 780  
 tgttgttgca tcggctcagg ttgtggaggg gaccccaagt gcatggacag ggtgtgtttc 840  
 tggcgcttgg gtctcctacg agggcctggg gctgaggaca atgctcaca cgagattctg 900  
 agcaacgcag actcgtgtc cactttcgtc tctgagcagc aaatggaaag ccaggagccg 960  
 gcagatttga caggtgtcac tgtacagtcc ccaggggagg cacagtgtct gctgggaccg 1020  
 gcagaagctg aagggtctca gaggaggagg ctgctgggtc cagcaaattg tgctgacccc 1080  
 actgagactc tgatgctgtt ctttgacaag tttgcaaaca tcgtgccctt tgactcctgg 1140  
 gaccagctca tgaggcagct ggacctcacg aaaaatgaga tcgatgtggt cagagctggt 1200  
 acagcaggcc caggggatgc cttgtatgca atgctgatga aatgggtcaa caaaactgga 1260  
 cggaacgcct cgatccacac cctgctggat gccttgagga ggatggaaga gagacatgca 1320

aaagagaaga ttcaggacct cttggtggac tctggaaagt tcacttactt agaagatggc 1380

acaggctctg ccgtgtcctt ggagtga 1407

<210> 5  
<211> 411  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys  
1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Leu  
20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu  
35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln  
50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu  
65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser  
85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe  
100 105 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro  
115 120 125

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe  
130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys  
145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile  
165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala  
180 185 190

Ala Val Val Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp  
195 200 205

Lys Lys Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly  
210 215 220

Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp  
 225 230 235 240

Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro  
 245 250 255

Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn  
 260 265 270

Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala  
 275 280 285

Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp  
 290 295 300

Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val  
 305 310 315 320

Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp  
 325 330 335

Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr  
 340 345 350

Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala  
 355 360 365

Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu  
 370 375 380

Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met  
 385 390 395 400

Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Leu Ser  
 405 410

<210> 6  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys  
 1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro  
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu  
 35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln  
50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu  
65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser  
85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe  
100 105 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro  
115 120 125

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe  
130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys  
145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile  
165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro  
180 185 190

Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro  
195 200 205

Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val  
210 215 220

Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val  
225 230 235 240

Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu  
245 250 255

Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu  
260 265 270

Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu  
275 280 285

Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser  
290 295 300

Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser  
305 310 315 320

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

325 330 335  
 Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp  
 340 345 350  
 Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile  
 355 360 365  
 Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr  
 370 375 380  
 Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His  
 385 390 395 400  
 Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln  
 405 410 415  
 Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu  
 420 425 430  
 Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser  
 435 440  
  
 <210> 7  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic  
  
 <400> 7  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 8  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic

<400> 8  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 9  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic

<400> 9  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

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

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 10  
<211> 452  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> synthetic

<400> 10  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

20	25	30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
160		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
240		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300



Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 11  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic

<400> 11  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

50	55	60																	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70				75						80				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
			85						90					95					
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp				
			100					105					110						
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro				
		115					120					125							
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr				
	130					135					140								
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr				
145					150				155						160				
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro				
			165						170					175					
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr				
			180					185					190						
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn				
	195						200					205							
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser				
	210					215					220								
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu				
225					230				235						240				
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu				
			245					250					255						
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser				
			260					265					270						
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu				
		275					280					285							
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr				
	290					295					300								
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn				
305					310				315						320				
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro				
			325					330					335						

Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
			340					345					350			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
		355					360					365				
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370					375					380					
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
385					390					395					400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
			405						410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
		420						425					430			
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
	435					440						445				
Ser	Pro	Gly	Lys													
	450															