



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0086705
(43) 공개일자 2011년07월29일

(51) Int. Cl.

A61K 47/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011124

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년11월16일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년05월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/064610

(87) 국제공개번호 WO 2010/057107

국제공개일자 2010년05월20일

(30) 우선권주장

61/115,441 2008년11월17일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 임크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

로보, 브라이언

미국 92009 캘리포니아주 칼스배드 에메랄드 플레
이스 2956

LO, Sabrina

미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 아파트먼
트 1 테네시 스트리트 1122

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

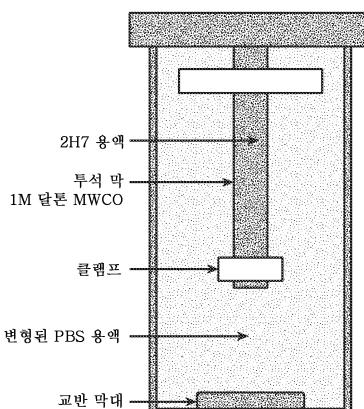
전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 생리학적 조건 하에 거대분자의 응집을 감소시키는 방법 및 제제

(57) 요 약

특정의 시클로텍스트린 (CD)을 부가함으로써, 생리학적 조건 하에 거대분자, 예를 들어 단백질의 응집을 감소시키고 엉김을 억제시키는 방법이 기재되어 있다. 또한, 거대분자 및 피하 투여용 제약 제제를 피하 투여하는 동안 주사 부위에서의 염증을 최소화시키는 방법이 제공된다. 추가로, 본 발명의 제약 제제 중의 인간화 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, CD20 양성 암 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 추가로, 생리학적 조건 하에 항체 또는 기타 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 부형제의 능력을 평가하기 위한 시험관내 투석 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자
왕, 유창 준
미국 94022 캘리포니아주 로스 알토스 카멜 애비뉴
832

웡, 리타
미국 94062 캘리포니아주 레드우드 시티 웨스트 서
및 드라이브 15

특허청구의 범위

청구항 1

거대분자를 함유하는 제제에 2% 내지 30% 시클로덱스트린을 부가하는 단계를 포함하는, 상기 거대분자의 피하 투여 동안 주사 부위에서의 염증을 최소화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 시클로덱스트린이 HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 및 SBE-시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 제제가 5% 내지 30% HP-베타 또는 HP-감마 시클로덱스트린을 함유하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 제제가 5% 내지 30% HP-베타 시클로덱스트린을 함유하는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 제제가 5% 내지 20% HP-감마 시클로덱스트린을 함유하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 제제가 50 mM 내지 200 mM 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 제제가 2% 내지 9% SBE-시클로덱스트린을 함유하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 거대분자가 단백질인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체가 치료용 항체인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 항체가 진단용 항체인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 항체가 항-CD20 항체인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 항체가 표 1에 제시된 바와 같은 항체 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 항체가 서열 1 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 항체가 서열 1의 경쇄 가변 도메인 및 서열 2의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 항체가 서열 3의 경쇄 가변 도메인 및 서열 4의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 항체가 서열 3의 경쇄 가변 도메인 및 서열 5의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 항체가 서열 6의 전장 경쇄 및 서열 7의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제12항에 있어서, 항체가 서열 6의 전장 경쇄 및 서열 15의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제12항에 있어서, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 10의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제12항에 있어서, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 11의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제12항에 있어서, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 12의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제12항에 있어서, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 13의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제12항에 있어서, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 14의 전장 중쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

10 mg/ml 내지 200 mg/ml 농도 범위의 항체, 및 2% 내지 30% 시클로텍스트린을 포함하는, 항체를 피하 투여하기 위한 제약 제제.

청구항 26

제25항에 있어서, 시클로텍스트린이 HP-베타 시클로텍스트린, HP-감마 시클로텍스트린 및 SBE-시클로텍스트린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제제.

청구항 27

제26항에 있어서, 5% 내지 30% HP-베타 또는 HP-감마 시클로텍스트린을 함유하는 제제.

청구항 28

제27항에 있어서, 5% 내지 30% HP-베타 시클로텍스트린을 함유하는 제제.

청구항 29

제27항에 있어서, 5% 내지 20% HP-감마 시클로텍스트린을 함유하는 제제.

청구항 30

제29항에 있어서, 50 mM 내지 200 mM 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함하는 제제.

청구항 31

제26항에 있어서, 2% 내지 9% SBE-시클로덱스트린을 함유하는 제제.

청구항 32

제25항에 있어서, 항체가 30 mg/ml 내지 150 mg/ml의 농도 범위로 존재하는 것인 제제.

청구항 33

제25항에 있어서, 항체가 100 mg/ml 내지 150 mg/ml의 농도 범위로 존재하는 것인 제제.

청구항 34

제27항에 있어서, 100 mg/ml의 인간화 2H7 항체 및 15% 내지 30% HP-베타 시클로덱스트린을 포함하는 제제.

청구항 35

제27항에 있어서, 150 mg/ml의 인간화 2H7 항체 및 30% HP-베타 시클로덱스트린을 포함하는 제제.

청구항 36

제27항에 있어서, 150 mg/ml의 인간화 2H7 항체 및 10% HP-감마 시클로덱스트린을 포함하는 제제.

청구항 37

제36항에 있어서, 50 mM 내지 200 mM 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함하는 제제.

청구항 38

제37항에 있어서, 인간화 2H7 항체가 표 1에 제시된 바와 같은 항체 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I를 포함하는 것인 제제.

청구항 39

제37항에 있어서, 30 mM 나트륨 아세테이트; 5% 트레할로스 이수화물; 및 0.03% 폴리솔베이트 20 (pH 5.3)을 추가로 포함하는 제제.

청구항 40

제39항에 있어서, 인간화 2H7 항체가 표 1에 제시된 바와 같은 항체 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I를 포함하는 것인 제제.

청구항 41

제27항에 있어서, 100 mg/ml 내지 150 mg/ml 농도 범위의, 표 1에 제시된 바와 같은 인간화 2H7 항체 변이체 A, 15% 내지 30% HP-감마 시클로덱스트린, 및 50 mM 내지 100 mM 아르기닌 숙시네이트를 포함하는 제제.

청구항 42

HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 및 SBE-시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로덱스트린을 2% 내지 30% 포함하는 제약 제제 중의 표 1의 인간화 2H7 항체의 치료 유효량을 CD20 양성 B 세포 암 환자에게 투여하는 것을 포함하는, CD20 양성 B 세포 암의 치료 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, CD20 양성 B 세포 암이 B 세포 림프종 또는 백혈병인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, CD20 양성 B 세포 암이 비호지킨 림프종 (NHL), 재발된 무통성 NHL 및 리툭시맙 (rituximab)-

난치성 무통성 NHL, 림프구 우위형 호지킨병 (LPHD), 소 림프구성 림프종 (SLL), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 인간화 2H7 항체가 표 1로부터의 변이체 A, B, C, D 또는 H인 방법.

청구항 46

HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 및 SBE-시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로덱스트린을 2% 내지 30% 포함하는 제약 제제 중의 표 1의 인간화 2H7 항체의 치료 유효량을 자가면역 질환 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환의 치료 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 자가면역 질환이 류마티스 관절염 (RA) 및 연소성 류마티스 관절염, 예를 들어 메토트렉세이트 (Mtx)-부적합 반응자 및 TNF α -길항체 부적합 반응자, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 예를 들어 루푸스 신염, 다발성 경화증 (MS), 예를 들어 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS), 베게너병 (Wegener's disease), 염증성 장질환, 케양성 대장염, 특발성 혈소판감소성 자반병 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, ANCA 관련 혈관염, 진성 당뇨병, 레이노 증후군 (Reynaud's syndrome), 쇼그伦 증후군 (Sjogren's syndrome), 시신경 척수염 (NMO) 및 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 인간화 2H7 항체가 표 1로부터의 변이체 A, B, C, D 또는 H인 방법.

청구항 49

HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 및 SBE-시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로덱스트린 2% 내지 30%를 항체를 포함하는 수성 피하 제제에 부가하는 단계를 포함하는, 환자의 주사 부위에서 주사시 수성 피하 제제 중의 항체의 가용화를 개선 또는 유지시키거나 또는 항체의 침전을 최소화시키는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 항체가 표 1에 제시된 바와 같은 인간화 항-CD20 항체 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I인 방법.

청구항 51

HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 및 SBE-시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 시클로덱스트린 2% 내지 30%를, 항체를 포함하는 수성 피하 제제에 부가하는 단계를 포함하는, 피하 투여될 항체의 생체이용률을 증가시키는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 항체가 표 1에 제시된 바와 같은 인간화 항-CD20 항체 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I인 방법.

청구항 53

(a) 시험 부형제가 존재하는 거대분자 제제 및 시험 부형제가 존재하지 않는 거대분자 제제를 일정하게 교반시키면서 37°C에서 변형된 PBS 용액 (167 mM 나트륨, 140 mM 염화물, 17 mM 인산염, 4 mM 칼륨)에 대하여 투석하는 단계;

(b) 이와 같이 변형된 PBS 용액의 시험 샘플을 취하는 단계; 및

(c) 시험 샘플에 존재하는 단백질의 양 및 혼탁도를 측정하는 단계

를 포함하며, 여기서 시험 부형제가 결여된 대조군과 비교해서 시험 부형제를 함유하는 검정용 샘플 중의 단백

질 농도가 증가하고 혼탁도가 감소한다는 것은 이러한 시험 부형제가 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 능력이 있다는 것을 나타내는 것인, 생리학적 조건 하에 항체 또는 기타 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 부형제의 능력을 평가하기 위한 시험관내 투석 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 제제를 1백만 달톤 분자량 컷-오프를 갖는 투석용 투빙에서 투석시키는 방법.

청구항 55

제53항에 있어서, 시험 샘플 중의 단백질 농도 및 혼탁도가 UV 분광분석법을 이용하여 측정되는 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 침전을 알아보기 위해 투석용 투빙 내부 용액 및 변형된 PBS 용액을 가시적으로 검사하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 시험 부형제가 결여된 대조군과 비교해서 시험 부형제를 함유하는 투석용 투빙 내에서의 침전이 감소한다는 것은 시험 부형제가 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 능력이 있다는 나타내는 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 거대분자의 피하 투여를 위한 주사 부위에서 생리학적 조건 하에 응집을 감소시킴으로써 염증을 최소화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

과거 이십여 년간, 재조합 DNA 기술로 인해 생체 분자, 특히 단백질에 관한 의약품 수가 상당히 증가하게 되었다. 생체 분자 약물 상의 증가로 인해, 약물 제제 분야에서 새로운 도전 과제가 제기되었다. 고 용량의 단백질 치료제 (예를 들어, 항체)는 정맥내 주입에 의해 환자에게 전달될 수 있지만, 이러한 약물 투여 경로는 불편하고, 가능한 한 피하 주사용 단백질 치료제로 제제화하는 것이 일반적으로 바람직하다. 그러나, 피하 주사용 약물 용제는 정맥내 주입용 용제보다 용량이 훨씬 더 적기 때문에, 해당 단백질을 보다 고 농도로 제시하는 것이 필요하다. 1 밀리리터당 수십 밀리그램의 높은 치료용 단백질 농도에서는, 이러한 치료용 단백질을 장기간 동안 안정적으로 용해된 상태로 유지시키는 것이 중요하다. 고 농도의 단백질 용액은 단백질-단백질 상호 작용 가능성을 증가시켜 응집을 촉진시키는데, 이러한 응집을 방지시키는 것이 단백질 약물 제제 분야에서 주요 쟁점이 되어 왔다. 응집은 활성 단백질의 생체이용률 저하, 약동학 변경 및 불필요한 면역원성을 포함한 수많은 문제점을 유발시킨다 [참고: Frokjaer, S. and Otzen, D. E., Nat. Rev. Drug. Discov. 4: 298-306 (2005); Jiskoot, W. and Crommelin, D.J.A., EJHP Practice 12:20-21 (2006)].

[0003]

응집을 방지시키는 것은 여전히 상당 부분 실험에 의거하고 있는데, 이는 응집 과정에 관한 분자상의 상세 내역이 일반적으로 공지되어 있지 않기 때문이다. 전형적인 전략은 안정화제를 단백질 용액에 부가하는 것이다. 흔히 사용되고 있는 안정화제에는 당, 염, 자유 아미노산, 예를 들어 L-아르기닌 및 L-글루타민 [참고: Golovanov, A.P. et al., J. Am. Chem. Soc. 126:8933-8939 (2004)], 폴리올 [참고: Singh, S. and Singh, J., AAPS Pharm. Sci. Tech 4: 1-9 (2003); Mishra, R. et al., J. Biol. Chem. 280:15553-15560 (2005)], 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 단백질-단백질 상호 작용을 감소시킬 수 있는 기타 중합체, 예를 들어 폴리솔베이트 또는 폴록사며 [참고: Frokjaer and Otzen, 상기 참고; Lee, R.C. et al., Ann. Biomed. Eng. 34: 1190-1200 (2006); (Nema, S. et al., PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 51: 166-171 (1997)]가 포함된다.

[0004]

시클로덱스트린 (CD)은 알파-(1,4) 글리코시드성 결합과 연결된 d-글루코파라노스 단위를 갖는 시클릭 올리고당 류이다. CD는 아밀라제인 시클로덱스트린 트랜스글루코실라제의 작용을 통하여 옥수수 또는 기타 전분으로부터 생성된다. 가장 흔한 천연 발생적 시클로덱스트린은 6, 7 및 8개 글루코파라노스 단위로 각각 이루어진 알파-시클로덱스트린, 베타-시클로덱스트린 및 감마-시클로덱스트린이다. 천연 시클로덱스트린, 특히 베타-시클로덱스트린은 수 용해도가 낮기 때문에, 용해도와 기타 물리화학적 특성이 개선된 수많은 유도체가 합성되어 왔다. 시판용 CD 유도체에는 메틸화 CD, 2-히드록시프로필화 CD, 아세틸화 CD, 분지형 CD 및 술포부틸 CD가 포함된다.

시클로덱스트린에 대한 동의어에는 카비트론 (Cavitron), 시클리 올리고당류, 시클로아물로스 및 시클로글루칸이 포함된다 [참고: Loftsson, T., and Brewster, M. E., *J. Pharm. Sci.* 85:101- (1996); Uekama, K. et al., *Chem. Rev.* 98:2045-2076 (1998); Irie, T. and Uekama, K., *Advanced Drug Delivery Reviews* 36:101-123 (1999); and Szjetli, J., *Pure Appl. Chem.* 76:1825-1845 (2004)]. 시클로덱스트린은 분자량이 25,000 달톤 미만이므로, 사구체 여과에 의한 전신 순환으로부터 제거할 수 있고 체내에 축적되지 않는 것으로 예상된다. 천연 시클로덱스트린 뿐만 아니라 수많은 제약상 관련 유도체, 예를 들어 히드록시프로필-베타-CD 및 술포부틸-베타-CD에는 독성이 없는 것으로 널리 확인되었다 [Uekama et al., 상기 참고; Szjetli, 상기 참고].

[0005]

시클로덱스트린은 그 외형이 절단된 원뿔체인데, 내부는 소수성이고 외부는 친수성이다. 소수성 공동 (cavity)은 적당한 크기의 비극성 화합물을 그 안으로 봉입시켜 복합체를 형성시킬 수 있는 환경을 제공해준다. CD 및 그의 유도체는 거의 불용성인 약물에 대한 안정화제로서 사용되어 왔다. 예를 들어, 이트라코나졸 [itraconazole (SporanoxTM)]은 히드록시프로필 베타-CD를 이용하여 가용화시키고, 지프라시돈 메실레이트 [ziprasidone mesylate (GeodonTM)]는 술포부틸 에테르 베타-CD를 이용하여 가용화시킨다. CD의 기타 용도에는 약물 안정화, 미각 차폐, 및 필수 오일에 대한 흡착제가 포함된다. 시클로덱스트린을 함유하고 있는 것으로 현재 시판중인 의약품에는 스포라노스 [SporanoxTM (Janssen, Belgium)], 프로스타바신 [ProstavasinTM (Ono, Japan; Schwarz, Germany)], 프로스탄딘 [Prostandin] 500TM (Ono, Japan), 제오돈 [GeodonTM (Pfizer, USA)], VFENDTM (Pfizer, USA), 미토엑스트라 미토지트렉스 [MitoExtra MitozytrexTM (Novartis, Switzerland)], 및 볼타렌 [VoltarenTM (Novartis, Switzerland)]이 포함된다 [Szjetli의 표 1 참고; 상기 참고]. 이들 제제는 모두 소분자 화합물로만 제한된다.

[0006]

펩티드 및 단백질과 같은 대형 약물 분자는 시클로덱스트린과 복합체를 형성할 수도 있다. CD와 복합체를 형성한 펩티드 약물의 생체이용률이 개선되는 것은 부분적으로, 세포성 유출 펌프 상에서의 CD의 억제 효과에 기인하는 것으로 여겨진다 [참고: Challa, R. et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6:E329-357 (2005)]. 단백질 및 펩티드에 대한 안정화 기전은 또한, 소분자 약물의 경우에서 보다 정성적으로 상이하다. CD가 소분자 약물과 봉입 복합체를 형성할 수 있긴 하지만, CD는 단백질 또는 펩티드의 특이적 용매-노출된 아미노산 잔기와 결합하는 것으로 여겨진다 [참고: Aachmann, F. L. et al., *Protein Engineering* 16:905-912 (2003)]. 최대 이득은 저농도의 시클로덱스트린에서 통상적으로 수득되고, 이러한 이득은 종종 단지 부분적으로만 농도 의존적이다. 예를 들어, IL-2의 응집은 0.5% HP-베타-시클로덱스트린에 의해 최적으로 억제되었다 [Loftsson and Brewster, 상기 참고]. 인간 성장 호르몬의 용해도는 약 2 내지 6%로 존재하는 CD에 의해 개선되었는데, 알파 및 감마 CD는 베타 CD 보다 수배 덜 유효한 것으로 밝혀졌다 [참고: Otzen, D. E. et al., *Protein Sci.* 11:1779-1787 (2002)].

[0007]

CD20 항원 (인간 B-림프구-제한된 분화 항원, Bp35로 지칭되기도 함)은 B 전구 및 성숙한 B 림프구 상에 위치하고 분자량이 대략 35 kD인 소수성 막관통 단백질이다 [참고: Valentine et al., *J. Biol. Chem.* 264(19): 11282-11287 (1989); and Einfeld et al., *EMBO J.* 7(3):711-717 (1988)]. 상기 항원은 또한, 90% 초파의 B 세포 비호지킨 림프종 [non-Hodgkin's lymphomas (NHL)] 상에서 발현되지만 [참고: Anderson et al., *Blood* 63(6): 1424-1433 (1984)], 조혈 줄기 세포, 프로-B 세포, 정상 혈장 세포 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 [참고: Tedder et al., *J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985)]. CD20은 세포 주기 개시 및 분화에 대한 활성화 과정 중의 초기 단계 (들)를 조절하는 것으로 여겨지고 [Tedder et al., 상기 참고], 칼슘 이온 채널로서 기능하는 것으로 예상된다 [참고: Tedder et al., *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990)].

[0008]

CD20이 B 세포 림프종에서 발현된다고 가정하면, 이 항원은 이러한 림프종을 치료하기 위한 유용한 치료용 표적이었다. 예를 들어, 인간 CD20 항원에 대하여 유도된, 유전 공학적으로 처리한 키메라 뮤린/인간 모노클로날 항체인 리툭시맙 [rituximab (RITUXAN[®], MABTHERA[®])] 항체 [시판처: Genentech, Inc., South San Francisco, California, U.S. 및 F.Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland]는 재발되거나 난치성의 저 악성도 또는 소포성이고 CD20 양성인 B 세포 비호지킨 림프종 환자를 치료하는 데 사용되고 있다. 리툭시맙은 미국 특허 제5,736,137호 (1998년 4월 7일자로 허여됨) (Anderson et al.) 및 미국 특허 제5,776,456호에서 "C2B8"로서 지칭된 항체이다. NHL의 치료에 적응시킨 기타 항-CD20 항체에는 방사성 동위원소 이트륨-90과 연결되는 뮤린 항체 제발린 (ZevalinTM) (공급처: IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA), 및 I-131과 접합된 또 다른 완전한 뮤린 항체인 벡사르 (BexxarTM) (공급처: Corixa, WA)가 포함된다.

[0009]

CD20은 또한, 자가면역 질환을 치료하는 데 유용한 표적 항원이다. 리툭시맙은 또한, 각종 비-악성 자가면역 장애에서도 연구되어 왔는데, 이러한 장애에서는 B 세포와 자가항체가 질병 병리생리학에서 일정 역할을 하는

것으로 여겨진다 [참고: Edwards et al., *Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002)]. 리툭시맙은, 예를 들어 류마티스 관절염 (RA) [참고: Leandro et al., *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Edwards et al., *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery et al., *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)], 루푸스 [참고: Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Leandro et al. *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al., *Lupus*, 13: 312-316 (2004)], 면역 저혈소판성 자반병 [참고: D'Arena et al., *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi et al., *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh et al., *Semin. Oncol.*, 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaja et al., *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn et al., *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)], 진성 적혈구계 무형성증 [참고: Auner et al., *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)]; 자가면역성 빈혈 [참고: Zaja et al., *Haematologica* 87: 189-195 (2002) (erratum appears in *Haematologica* 87:336 (2002))], 저온 응집소 질병 [참고: Layios et al., *Leukemia*, 15: 187-8 (2001); Berentsen et al., *Blood*, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen et al., *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090 (2001); Damiani et al., *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001)], 중증 인슐린 내성의 유형 B 증후군 [참고: Coll et al., *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004)], 혼합 한랭글로불린혈증 [참고: DeVita et al., *Arthritis Rheum.* 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002)], 중증 근무력증 [참고: Zaja et al., *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam et al., *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)], 베게너 (Wegener) 육아종증 [참고: Specks et al., *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)], 난치성 심상성 천포창 [참고: Dupuy et al., *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004)], 피부근염 [참고: Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)], 쇼그伦 증후군 (Sjogren's syndrome) [참고: Somer et al., *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)], 활동성 유형-II 혼합 한랭글로불린혈증 [참고: Zaja et al., *Blood*, 101 : 3827-3834 (2003)], 심상성 천포창 [참고: Dupay et al., *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)], 자가면역성 신경병증 [참고: Pestronk et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485-489 (2003)], 종양연관성 안진전-간대성 근경련증 [참고: Pranzatelli et al. *Neurology* 60(Suppl. 1) P05.128:A395 (2003)], 및 재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS) [참고: Cross et al. (abstract) "Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS" Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003)]의 징후 및 증상을 잠재적으로 구제하는 것으로 보고되었다.

[0010]

본 발명은 생리학적 조건 하에 거대분자 (예를 들어, 항체)의 응집을 방지하기 위한 방법 및 제제를 제공한다. 본 발명의 방법은 본 명세서에 기재된 항-CD20 항체와 같은 치료용 단백질의 제제를 제조하는 데에 있어서 이점을 제공해준다. 이러한 이점에는 치료용 항체의 생체이용률을 증가시켜 주고 주사 부위에서의 염증을 감소시켜 줄 피하 주사용 제제를 제조할 수 있는 능력 뿐만 아니라 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 부가의 이점이 포함된다.

발명의 내용

[0011]

<발명의 요약>

[0012]

시클로덱스트린은 거의 불용성인 약물에 대한 가용화제로서 생화학자들에 의해 사용되어 왔다. 상이한 유형의 시클로덱스트린 (예를 들어, 술포-부틸 에테르, 히드록시 프로필 감마, 히드록시 프로필 베타)이 단백질, 특히 항체의 응집과 엉김 (flocculation)을 억제하였다는 본 발명자들의 발견은 항체가 고도로 수용성이기 때문에 예상치 못한 것이다. 따라서, 시클로덱스트린이 고 농도에서 항체의 응집과 엉김을 억제하였다는 발견은 시클로덱스트린에 대한 신규 용도를 나타낸다. 본 발명자들은 또한, 한정된 분자량 (MW) 컷-오프 (cut-off)와 주문설계된 방출 매질 (둘 다는 주사 부위에서의 생리학적 조건을 모방하고 있다)을 수반한 투석용 튜빙을 사용하는 것을 포함하는 신규한 시험관내 스크리닝 방법을 개발하였다.

[0013]

본 발명자들은 2% 내지 30% 시클로덱스트린 (CD)을 부가함으로써, 생리학적 조건 하에 거대분자 (예를 들어, 단백질)의 응집을 감소시키고 엉김을 억제시키는 방법을 제공하는데, 상기 시클로덱스트린은 히드록시 프로필 베타 (HP-베타), 히드록시 프로필 감마 (HP-감마) 및 술포-부틸 에테르 (SBE) 시클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. CD를 부가함으로써 응집과 엉김이 상당히 저하되는 것은 또한, 래트에서 피하 주사 부위에서의 염증이 상당히 저하된 것과 상관이 있었다. 본 발명은 추가로, 2% 내지 30% HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 또는 SBE-시클로덱스트린을 피하 제제에 부가함으로써, 거대분자 (예를 들어, 단백질)의 피하 투여 동안 주사 부위에서의 염증을 최소화시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 각종 실시양태에서, 거대분자는 항체이다. 본 발명의 추가 실시양태에서, 항체는 치료용 항체 또는 진단용 항체이다.

[0014]

본 발명의 각종 실시양태에서, 거대분자는 항-CD20 항체이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 항-CD20 항체는 인간화 항체이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 항-CD20 항체는 표 1로부터의 변이체 A, B, C, D, F, G, H 또는 I 중의 하나를 포함한다. 본 발명은 추가로, 항-CD20 항체가 서열 1 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 방법 및 제제를 제공한다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 항체는 서열 1의 경쇄 가변 도메인 및 서열 2의 중쇄 가변 도메인, 또는 서열 3의 경쇄 가변 도메인 및 서열 4의 중쇄 가변 도메인, 또는 서열 3의 경쇄 가변 도메인 및 서열 5의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 본 발명은 추가로, 항체가 서열 6의 전장 경쇄 및 서열 7, 서열 8 또는 서열 15의 전장 중쇄를 포함하는 방법 및 제제를 제공한다. 본 발명은 추가로, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 10, 서열 11, 서열 12, 서열 13 또는 서열 14의 전장 중쇄를 포함하는 방법 및 제제를 제공한다.

[0015]

추가의 측면에서, 본 발명은 2% 내지 30% HP-베타 시클로텍스트린, HP-감마 시클로텍스트린 또는 SBE-시클로텍스트린을 포함하는, 거대분자 (예를 들어, 단백질)을 피하 투여하기 위한 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 10 mg/ml 내지 200 mg/ml 농도 범위의 항체, 및 2% 내지 30% HP-베타 시클로텍스트린, HP-감마 시클로텍스트린 또는 SBE-시클로텍스트린을 포함하는, 항체를 피하 투여하기 위한 제약 제제를 제공한다. 특정의 실시양태에서, 항체 농도 범위는 30 내지 150 mg/ml이다. 추가의 실시양태에서, 항체 농도 범위는 100 내지 150 mg/ml이다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로텍스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 2% 내지 9% 농도의 SBE-시클로텍스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 약 100 mg/ml 농도의 항체 및 15% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로텍스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 약 150 mg/ml 농도의 항체 및 약 30% 농도의 HP-베타 시클로텍스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 구체적 실시양태에서, 제약 제제는 100 mg/ml 내지 150 mg/ml 농도 범위의 인간화 2H7 항체, 15% 내지 30% 농도의 HP-감마 시클로텍스트린, 및 50 mM 내지 100 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 제약 조성물은 30 mM 나트륨 아세테이트; 5% 트레할로스 이수화물; 및 0.03% 폴리솔베이트 20 (pH 5.3)을 추가로 포함한다.

[0016]

본 발명은 추가로, 표 1에 열거된 항체로 이루어진 인간화 항-CD20 항체를 포함하는 상기 제제를 제공한다. 본 발명은 추가로, 항-CD20 항체가 서열 1 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 제제를 제공한다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 상기 항체는 서열 1의 경쇄 가변 도메인 및 서열 2의 중쇄 가변 도메인, 또는 서열 3의 경쇄 가변 도메인 및 서열 4의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 본 발명은 추가로, 항체가 서열 6의 전장 경쇄 및 서열 7, 서열 8 또는 서열 15의 전장 중쇄를 포함하는 방법 및 제제를 제공한다. 본 발명은 추가로, 항체가 서열 9의 전장 경쇄 및 서열 10, 서열 11, 서열 12, 서열 13 또는 서열 14의 전장 중쇄를 포함하는 방법 및 제제를 제공한다.

[0017]

본 발명은 추가로, 2% 내지 30% HP-베타 시클로텍스트린, HP-감마 시클로텍스트린 또는 SBE-시클로텍스트린을 포함하는 제약 제제 중의, 표 1의 인간화 항-CD20 항체 중의 어느 하나를 투여하는 것을 포함하는, CD20 발현성 B 세포의 암을 치료하는 방법을 제공한다. CD20 양성 B 세포 암은 바람직하게, B 세포 림프종 또는 백혈병이다. 구체적 실시양태에서, 인간 CD20 (hCD20)과 결합하는 인간화 2H7 항체 및 그의 기능적 단편을 포함하는 제제를 사용하여 비호지킨 림프종 (NHL), 무통성 NHL (재발된 무통성 NHL 및 리툭시맙-난치성 무통성 NHL 포함), 림프구 우위형 호지킨병 (LPHD), 소 림프구성 림프종 (SLL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 치료한다. 구체적 실시양태에서, 인간화 CD20 결합성 항체, 특히 표 1로부터의 변이체 A, B, C, D 또는 H, 또는 그의 기능적 단편을 포함하는 제제를 사용하여 상기 열거된 CD20 양성 B 세포 암을 치료한다.

[0018]

본 발명은 또한, 2% 내지 30% HP-베타 시클로텍스트린, HP-감마 시클로텍스트린 또는 SBE-시클로텍스트린을 포함하는 제약 제제 중의, 치료 유효량의 표 1의 인간화 2H7 항체를 자가면역 질환으로 인해 고통받고 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 구체적 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염 (RA) 및 연소성 류마티스 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되고, RA 환자는 메토트렉세이트 (Mtx)-부적합 반응자 및 TNF α -길항체 부적합 반응자, 리툭시맙-난치성 또는 재발 환자이다. 한 실시양태에서, RA 환자는 또 다른 항-CD20 치료용 항체에 대하여 난치성이거나 재발된다. 기타 실시양태에서, 자가면역 질환은 전신 홍반성 루푸스 (SLE) (루푸스 신염 포함), 다발성 경화증 (MS) [재발 완화형 다발성 경화증 (RRMS) 포함], 베게너병 (Wegener's disease), 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 특발성 혈소판감소성 자반병

(ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신증, IgM 다발 신경병증, 중증 근무력증, ANCA 관련 혈관염, 진성 당뇨병, 레이노 증후군 (Reynaud's syndrome), 쇼그렌 증후군, 시신경 척수염 (NMO) 및 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, 인간화 CD20 결합성 항체, 특히 표 1로부터의 변이체 A, B, C, D 또는 H, 또는 그의 기능적 단편을 포함하는 제제를 사용하여 상기 열거된 자가면역 질환을 치료한다.

[0019] 전술된 질환을 치료하는 방법의 특정의 실시양태에서, 이러한 질환으로 인해 고통받고 있는 대상체 또는 환자는 영장류, 바람직하게 인간이다.

[0020] 본 발명은 추가로, 2% 내지 30% HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 또는 SBE-시클로덱스트린을 수성 피하 제제에 부가하는 단계를 포함하는, 환자의 주사 부위로의 주사시 수성 피하 제제 중의 항체의 가용화를 개선 또는 유지시키거나 또는 항체의 침전을 최소화시키는 방법을 제공한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 20% 농도의 HP-감마 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 2% 내지 9% 농도의 SBE-시클로덱스트린을 포함한다.

[0021] 본 발명은 추가로, 2% 내지 30% HP-베타 시클로덱스트린, HP-감마 시클로덱스트린 또는 SBE-시클로덱스트린을, 항체를 포함하는 수성 피하 제제에 부가하는 단계를 포함하는, 피하 투여하고자 하는 항체의 생체이용률을 증가시키는 방법을 제공한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 20% 농도의 HP-감마 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 2% 내지 9% 농도의 SBE-시클로덱스트린을 포함한다.

[0022] 본 발명은 추가로, 일정하게 교반시키면서 37°C 하의 생리학적 조건을 모의 실험하기 위한 시험 매질에 대항하여 시험 부형제가 존재하는 거대분자 제제 및 시험 부형제가 존재하지 않는 거대분자 제제를 투석하는 단계; 이와 같이 변형된 매질 용액을 샘플링하는 단계; 및 방출 매질에 존재하는 단백질의 양 및 샘플의 혼탁도와 같은 외관을 측정하는 단계 (이는 UV 측광 스캔과 같은 방법에 의해 측정한다)를 포함하며, 여기서 시험 부형제가 결여된 대조군과 비교해서 시험 부형제를 함유하는 검정용 방출 매질 중의 단백질 농도가 증가하고 혼탁도가 감소한다는 것은 이러한 시험 부형제가 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 능력이 있다는 것을 나타내는 것인, 생리학적 조건 하에 항체 또는 기타 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 부형제의 능력을 평가하기 위한 시험관내 투석 방법을 제공한다. 구체적 실시양태에서, 매질은 167 mM 나트륨, 140 mM 염화물, 17 mM 인산염, 4 mM 칼륨을 함유하는 것과 같은 변형된 PBS 용액에 관한 것이다. 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 투석용 튜빙은 1백만 달톤 분자량 컷오프를 갖는다. 상기 방법의 추가의 구체적 실시양태에서, 시험 샘플 중의 단백질 농도 및 혼탁도는 UV 분광분석법을 이용하여 측정한다. 상기 방법의 추가의 실시양태에서, 이 방법은 침전을 알아보기 위해 투석용 튜빙 내부 용액 및 변형된 방출 매질을 가시적으로 검사하는 단계를 포함하는데, 시험 부형제가 결여된 대조군과 비교해서 이러한 부형제를 함유하는 투석용 튜빙 내에서의 침전이 감소한다는 것은 시험 부형제가 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 능력이 있다는 지표이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 생리학적 조건 하에서의 2H7의 응집을 도시한 것이다. 150 mg/ml의 2H7을 37°C 하에 2일 동안 PBS 내로 투석하였다.

도 2는 생리학적 조건 하에 2H7 응집에 대한 부형제의 효과를 평가하기 위해 사용된 시험관내 투석 모델을 도시한 것이다. 250 ml용 유리 항아리에 220 ml의 변형된 PBS 용액 (167 mM 나트륨, 140 mM 염화물, 17 mM 인산염, 4 mM 칼륨)을 37°C 하에 충전시켰다. 6 cm 길이의 12 mm 투석용 튜빙을 한쪽 말단에서 클램핑하고, 이에 대략 1 ml의 시험 샘플을 충전시키며, 과량의 공기를 제거하고, 튜빙의 다른 말단을 클램핑하여 밀봉시킨다. 상기 항아리를 일정하게 교반시키면서 37°C 하에 놓아둔다.

도 3은 시험관내 투석 모델에서의 대조군의 행동을 도시한 것이다. 2H7과 rhuMAb CD11a 둘 다를 도 2에 도시된 모델에서 시험하였다. PBS 용액 내로 방출된 단백질의 누적율을 2.5, 6, 12, 24, 33 및 48 시간 시점에서 측정하였다.

도 4는 시험관내 모델에서 2H7의 방출에 대한 2 내지 9% SBE-시클로덱스트린의 효과를 도시한 것이다.

도 5는 시험관내 모델에서 2H7의 방출에 대한 5 내지 20% HP-감마-시클로텍스트린의 효과를 도시한 것이다.

도 6은 시험관내 모델에서 2H7의 방출에 대한 5 내지 20% HP-베타-시클로텍스트린의 효과를 도시한 것이다.

도 7은 시험관내 모델에서 2H7의 방출에 대한 HP-감마-시클로텍스트린 및 아르기닌 숙시네이트의 효과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

[발명의 상세한 설명]

[0025]

각종 형태의 동사 "응집시키는"이란 개개의 단백질 분자 또는 복합체가 연합하여 응집체를 형성하는 과정을 지칭한다. "응집체"는 단백질 분자 또는 복합체를 포함하는 중합체성 어셈블리이다. 응집은 가시적 침전물이 형성되는 정도까지 진행될 수 있다. 이러한 가시적 침전물의 형성은 본원에서 "엉김"으로서 지칭되기도 한다.

[0026]

거대분자의 상대적 침전 양은, 예를 들어 시각적 대조군과 비교함으로써 결정할 수 있다. 침전을 검정하는 부가의 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 다음에 기재되어 있는데, 예를 들어 실시예 2에 상세히 기재된 시험관내 투석 방법 또는 실시예 3에 기재된 생체내 모델이 있다.

[0027]

용어 "생체이용률"은 특정 약물 또는 기타 물질이 투여 후 생리학적 활성 부위에서 흡수되거나 이용 가능하도록 되는 정도 또는 이와 같이 흡수되거나 이용 가능하게 되는 비율을 지칭한다. 거대분자의 생체이용률은 당해 분야에 공지된 생체내 약동학적 방법에 의해 검정할 수 있다.

[0028]

용어 "거대분자"는 분자량이 10,000 달톤 이상인 분자를 지칭하고, 이에는 항체와 같은 단백질이 포함될 수 있다.

[0029]

용어 "부형제" 또는 "제약 부형제"는 거대분자의 응집을 감소시킬 수 있는 화합물을 지칭한다. 부형제에는 당, 염, 자유 아미노산, 예를 들어 L-아르기닌 및 L-글루타민, 폴리올, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 기타 중합체, 예를 들어 폴리솔베이트, 폴록사며 또는 폴리비닐파롤리돈이 포함될 수 있다.

[0030]

용어 "시클로텍스트린" (또는 "CD")은 알파-(1,4) 글리코시드성 결합과 연결된 d-글루코파라노스 단위를 갖는 시클릭 올리고당류를 지칭한다. 가장 흔한 천연 발생적 시클로텍스트린은 6, 7 및 8개 글루코파라노스 단위로 각각 이루어진 알파-시클로텍스트린, 베타-시클로텍스트린 및 감마-시클로텍스트린이다. 시클로텍스트린에 대한 동의어에는 카비트론, 시클릭 올리고당류, 시클로아물로스 및 시클로글루칸이 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "시클로텍스트린"에는 시클로텍스트린 유도체가 추가로 포함될 수 있고, 이에는 메틸화 CD, 2-히드록시프로필화 CD, 아세틸화 CD, 분지형 CD 및 술포부틸 CD가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0031]

용어 "치료용 항체"는 질병을 치료하는 데에 사용되는 항체를 지칭한다. 치료용 항체는 각종 작용 기전을 가질 수 있다. 치료용 항체는 표적과 결합하여 그의 정상적인 기능을 중화시킬 수 있다. 예를 들어, 암 세포의 생존에 필요한 단백질의 활성을 차단시키는 모노클로날 항체는 암 세포의 사멸을 유발시킨다. 또 다른 치료용 모노클로날 항체는 표적과 결합하여 그의 정상적인 기능을 활성화시킬 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 세포 상의 단백질과 결합하여 아폽토시스 (apoptosis) 신호를 촉발시킬 수 있다. 최종적으로, 모노클로날 항체가 단지 병든 조직 상에서만 발현된 표적과 결합하는 경우, 독성 페이로드 (payload) (유효한 작용제), 예를 들어 화학요법제 또는 방사성 작용제를 상기 모노클로날 항체와 접합시키면, 독성 페이로드를 병든 조직으로 특이적으로 전달해 주는 작용제가 창출되어 건강한 조직에 해를 끼치는 일이 감소할 수 있다.

[0032]

용어 "진단용 항체"는 질병에 대한 진단 시약으로서 사용되는 항체를 지칭한다. 진단용 항체는 특별한 질병과 특이적으로 연합되거나, 또는 특별한 질병에서만 발현 증가를 나타내는 표적과 결합할 수 있다. 진단용 항체는, 예를 들어 환자로부터의 생물학적 샘플 중의 표적을 탐지하거나, 또는 환자 중의 질병 부위 (예를 들어, 종양)에 관한 진단 영상화 중의 표적을 탐지하기 위해 사용될 수 있다.

[0033]

"CD20" 항원은 말초혈 또는 림프계 기관으로부터 B 세포의 90% 초과 표면 상에서 발견되는, 분자량이 대략 35 kD인 비-글리코실화 막관통 인단백질이다. CD20은 초기 B 전구 세포 발생 동안 발현되고 혈장 세포 분화까지 유지되는데, 인간 줄기 세포, 림프계 전구 세포 또는 정상 혈장 세포 상에서는 발견되지 않는다. CD20은 정상적인 B 세포 뿐만 아니라 악성 B 세포 상에도 존재한다. 당해 분야의 문헌에 보고된 CD20에 대한 다른 명칭에는 "B-림프구-제한된 분화 항원" 및 "Bp35"가 포함된다. CD20 항원은, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Clark and Ledbetter, *Adv. Can. Res.* 52:81-149 (1989) and Valentine et al. *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989)].

[0034] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 이에는 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 다중-특이적 항체 (예를 들어, 이중-특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 항체 단편이 포함된다.

[0035] 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체의 생물학적 활성에는 인간 CD20에 대한 항체의 최소한 결합성, 보다 바람직하게 인간 및 기타 영장류 CD20 (시노몰구스 원숭이, 붉은털 원숭이, 침팬지 포함)에 대한 결합성이 포함될 것이다. 상기 항체는 1×10^{-8} 이하의 K_d 값, 바람직하게 약 1×10^{-9} 이하의 K_d 값으로 CD20과 결합할 것이고, 바람직하게는 이러한 항체로 처리하지 않은 적당한 음성 대조군과 비교해서 20% 이상 정도로 생체 내에서 B 세포를 사멸 또는 고갈시킬 수 있다. B 세포 고갈은 ADCC, CDC, 아폽토시스, 또는 기타 기전 중의 한 가지 이상의 결과일 수 있다. 본원에서 질병 치료의 일부 실시양태에서, 특히 특이적 효과기 기능 또는 기전이 요망될 수 있고, 인간화 2H7의 특정 변이체가 이들 생물학적 기능 (예를 들어, ADCC)을 달성하는 데에 바람직하다.

[0036] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합성 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아보디 (diabody); 선형 항체; 단일 쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체가 포함된다.

[0037] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다. 이를 두 도메인의 풀딩으로부터, 아미노산 잔기가 항원과 결합하는 데에 기여하고 항원 결합 특이성을 항체에 부여해 주는 6개의 초가변 루프 (H 쇄 및 L 쇄 각각으로부터 3개의 루프)가 방사된다. 그러나, 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화도이긴 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 CDR 만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 지니고 있다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 모노클로날 항체의 생성 동안 유발될 수 있는 가능한 변이체 (이러한 변이체는 일반적으로 미량으로 존재한다)를 제외하고는 동일하고/하거나 동일한 에피토프(들)와 결합하는 집단으로부터 수득한 항체를 지칭한다. 이러한 모노클로날 항체에는 전형적으로, 표적과 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체가 포함되는데, 표적-결합성 폴리펩티드 서열은 복수 개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합성 폴리펩티드 서열을 선별하는 것을 포함하는 공정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 이러한 선별 공정은 복수 개의 클론, 예를 들어 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀 (pool)로부터 독특한 클론을 선별하는 것일 수 있다. 선별된 표적 결합성 서열을 추가로 변경시켜, 예를 들어 표적에 대한 친화성을 개선시키고, 표적 결합성 서열을 인간화시키며, 세포 배양액 중에서의 그의 생성을 개선시키며, 생체 내에서의 그의 면역원성을 저하시키고, 다중-특이적 항체를 창출시킬 수 있으며, 상기와 같이 변경된 표적 결합성 서열을 포함하는 항체가 또한 본 발명의 모노클로날 항체이기도 하다는 것을 인지해야 한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 모노클로날 항체 제제는 그의 특이성 이외에도, 전형적으로 기타 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 형질을 표시하고, 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 추론되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 [참고: 예를 들어, Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)], 재조합 DNA 방법 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호], 파지 디스플레이 (phage display) 기술 [참고: 예를 들어, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)]을 포함한 각종 기술, 및 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 유전자 또는 인간 면역글로불린 유전자 자리의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성시키는 기술 [참고: 예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,591,669호 (GenPharm); 제5,545,807호; WO 1997/17852; 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 5,661,016호;

Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)]에 의해 만들 수 있다.

[0039] 본 발명의 CD20 결합성 항체의 "기능적 단편"은 시험관내 또는 생체내 검정, 예를 들어 본원에 기재된 검정에 의해 측정된 바와 같이, B 세포의 고갈을 포함한 생물학적 활성을 나타내고 그들이 유래되는 본래의 전장 분자와 실질적으로 동일한 친화도로 CD20에 대한 결합성을 유지하고 있는 단편이다.

[0040] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편이 항체들 간의 서열에 있어 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합성을 매개하고, 그의 특별한 항원에 대한 특별한 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 전반에 걸쳐 균등한 수준으로 분포되지는 않는다. 대신, V 영역은 각각 9 내지 12개 아미노산 길이인 "초가변 영역"으로 불리우는 보다 짧은 극도의 가변성 영역에 의해 분리된 15 내지 30개 아미노산의 골격 영역 (FR)으로 지정된 비교적 불변인 연장물로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR을 포함하는데, 이는 β -시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에는 이러한 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 β -시트 입체 배치를 상당 부분 채택하고 있다. 각 쇄 내의 초가변 영역은 상기 FR에 의해 아주 근접하게 함께 묶여 있고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역은 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 각종의 효과기 기능, 예를 들어 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체 참여를 나타낸다.

[0041] 본원에 사용된 경우의 용어 "초가변 영역"은 항원 결합에 책임이 있는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로, "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 [예를 들면, V_L 내의 잔기 약 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3); 및 V_H 내의 잔기 약 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); 참고: 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 아미노산 잔기 [예를 들면, V_L 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3); 및 V_H 내의 잔기 26-32 (H1), 52A-55 (H2) 및 96-101 (H3); 참고: Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)]를 포함한다.

[0042] 본원에 지칭된 바와 같은 "컨센서스 서열" 또는 컨센서스 V 도메인 서열은 공지된 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 아미노산 서열들을 비교함으로써 유래된 인공 서열이다. 이러한 비교에 근거하여, 인간 κ 및 인간 H 쇄 아군 III V 도메인으로부터 유래된 서열의 컨센서스인 V 도메인 아미노산을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 제조하였다. 컨센서스 V 서열은 공지된 어떠한 항체 결합 특이성 또는 친화성을 지니고 있지 않다.

[0043] "키메라" 항체 (면역글로불린)은 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄 일부를 갖는 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이며, 이에는 또한 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다 [참고: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)]. 본원에서 사용된 바와 같은 인간화 항체는 키메라 항체의 일부이다.

[0044] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류로부터의 초가변 영역 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더우기, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능, 예를 들어 결합 친화성을 추가로 정련시키기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이긴 하지만, FR 영역에는 결합 친화성을 개선시켜 주는 하나 이상의 아미노산 치환이 포함될 수 있다. FR에서의 이들 아미노산 치환 수는 전형적으로, H 쇄에서는 6개 이하이고, L 쇄에서는 3개 이하이다. 인간화 항체는 임의로, 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전

형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세 내역에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)].

[0045] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적 세포를 용해시키는 것을 지칭한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (Clq)을, 그의 동족 항원과 결합하는 (적당한 아부류의) 항체와 결합시킴으로써 개시시킨다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [참고: Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0046] 본 명세서와 특허청구범위 전반에 걸쳐 달리 표시하지 않는 한, 면역글로불린 중쇄의 불변 도메인 내의 잔기에 관한 넘버링은 문헌 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] (본원에 참고로 도입된다)에서와 같은 EU 인덱스에 따른 것이다. "카바트 문헌에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. V 영역 내의 잔기는 순차적 또는 기타 넘버링 시스템이 구체적으로 표시되지 않는 한은 카바트 넘버링에 따라 넘버링된다.

[0047] CD20 항체에는 현재 "리툭시맙" ("RITUXAN®")으로 불리우는 "C2B8" [참고: 미국 특허 제5,736,137호]; "Y2B8" 또는 "이브리투모마브 티وخ세탄 (Ibritumomab Tiuxetan)" (ZEVALIN®)으로 명명된 이트륨-[90]-표지된 2B8 뮤린 항체 (시판처: IDEC Pharmaceuticals, Inc.) [참고: 미국 특허 제5,736,137호; 1993년 6월 22일자로 ATCC에 기탁번호 HB11388로 기탁됨]; "131I-B1" 또는 "요오드 I131 토시투모마브 (tositumomab)" 항체를 생성시키기 위해 ¹³¹I로 임의로 표지시킨 뮤린 IgG2a "B1" (또한, "토시투모마브"로 불리우기도 한다) [BEXXARTM, 공급처: GlaxoSmithKline; 참고: 미국 특허 제5,595,721호]; 뮤린 모노클로날 항체 "1F5" [참고: Press et al. *Blood* 69 (2): 584-591 (1987)] 및 그의 변이체 (이에는 "골격 폐치되거나" 또는 인간화 1F5가 포함된다) [참고: WO 03/002607, Leung, S.; ATCC 기탁번호 HB-96450]; 뮤린 2H7 및 키메라 2H7 항체 [참고: 미국 특허 제5,677,180호]; 인간화 2H7 [참고: WO 2004/056312 (Lowman et al.) 및 하기 제시된 바와 같음]; HuMax-CD20TM (완전한 인간 항체) (Genmab, Denmark) [참고: 예를 들어, Glennie and van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) and Cragg et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003)]; WO 2004/035607 (Teeling et al.)에 제시된 인간 모노클로날 항체; US 2004/0093621 (Shitara et al.)에 기재된 Fc 영역과 결합된 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄를 갖는 항체; CD20 결합성 분자, 예를 들어 AME 항체 시리즈, 예를 들어 WO 2004/103404 (Watkins et al., Applied Molecular Evolution)에 제시된 바와 같은 AME-133TM 항체; A20 항체 또는 그의 변이체, 예를 들어 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각 cA20, IMMU-106 a.k.a. ha20) [참고: US 2003/0219433, US 2005/0025764; Immunomedics]; 및 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 (공급처: International Leukocyte Typing Workshop) [참고: Valentine et al., In: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))에 포함된다. 본원에서 바람직한 CD20 항체는 인간화, 키메라, 또는 인간 CD20 항체, 보다 바람직하게 인간화 2H7 항체, 리툭시맙, 키메라 또는 인간화 A20 항체 (Immunomedics), 및 HuMAX-CD20TM 인간 CD20 항체 (Genmab)이다.

[0048] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 특정 구성분으로 확인되어, 이러한 환경으로부터 분리 및/또는 회수시킨 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단적 또는 치료적 용도를 방해할 수도 있는 물질인데, 이에는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질이 포함될 수 있다. 바람직한 실시양태에서는, 항체를 (1) 로리 (Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로 정제시키거나, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제시키거나, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게 은 염료 (silver stain)를 이용하여 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하도록 정제할 것이다. 단리된 항체에는 재조합 세포 내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 한 가지 이상의 정제 단계에 의해 제조할 것이다.

본 발명의 조성물 및 방법

[0049] 본 발명은 2% 내지 30% HP-베타 시클로렉스트린, HP-감마 시클로렉스트린 또는 SBE-시클로렉스트린을 포함하는, 거대분자 (예를 들어, 단백질)를 피하 투여하기 위한 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 10 mg/ml 내지 200 mg/ml 농도 범위의 항체, 및 2% 내지 30% HP-베타 시클로렉스트린, HP-감마 시클로렉스트린

또는 SBE-시클로덱스트린을 포함하는, 항체를 피하 투여하기 위한 제약 제제를 제공한다. 특정의 실시양태에서, 항체 농도 범위는 30 내지 150 mg/ml이다. 추가의 실시양태에서, 항체 농도 범위는 100 내지 150 mg/ml이다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 5% 내지 20% 농도의 HP-감마 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 2% 내지 9% 농도의 SBE-시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 약 100 mg/ml 농도의 항체 및 15% 내지 30% 농도의 HP-베타 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 약 150 mg/ml 농도의 항체 및 약 30% 농도의 HP-베타 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 약 150 mg/ml 농도의 항체 및 약 10% 농도의 HP-감마 시클로덱스트린을 포함한다. 특정의 실시양태에서, 제약 제제는 50 mM 내지 200 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 추가로 포함한다. 구체적 실시양태에서, 제약 제제는 100 mg/ml 내지 150 mg/ml 농도 범위의 인간화 2H7 항체, 15% 내지 30% 농도의 HP-감마 시클로덱스트린, 및 50 mM 내지 100 mM 농도의 아르기닌 숙시네이트를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 제약 조성물은 30 mM 나트륨 아세테이트; 5% 트레할로스 이수화물; 및 0.03% 폴리솔베이트 20 (pH 5.3)을 추가로 포함한다.

[0051] 각종 실시양태에서, 본 발명은 인간화 2H7 항체 (본원에서 hu2H7로서 지칭되기도 함)를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 구체적 실시양태에서, 인간화 2H7 항체는 표 1에 열거된 항체이다.

표 1

인간화 항-CD20 항체 및 그의 변이체

2H7 변이체	V _L 서열	V _H 서열	완전한 L 쇄 서열	완전한 H 쇄 서열
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

[0052] 표 1의 항체 변이체 A, B 및 I 각각은 경쇄 가변 서열 (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (서열 1) ;

[0055] 및 중쇄 가변 서열 (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLVTV
SS (서열 2)

[0057] 를 포함한다.

[0058] 표 1의 항체 변이체 C, D, F 및 G 각각은 경쇄 가변 서열 (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (서열 3) ;

[0060] 및 중쇄 가변 서열 (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSASYWYFDVWGQGTLVTV
SS (서열 4)

[0062] 를 포함한다.

[0063] 표 1의 항체 변이체 H는 서열 3의 경쇄 가변 서열 (V_L) (상기) 및 중쇄 가변 서열 (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
NQFKGKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRYWYFDVWGQGTLVTV
SS (서열 5)

[0064] 를 포함한다.

[0065] 표 1의 항체 변이체 A, B 및 I 각각은 전장 경쇄 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 6)

[0066] 을 포함한다.

[0067] 표 1의 변이체 A는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
NQFKGKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYNSYWYFDVWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 7)

[0068] 을 포함한다.

[0069] 표 1의 변이체 B는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
NQFKGKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYNSYWYFDVWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 8)

[0070] 을 포함한다.

[0071] 표 1의 변이체 I는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
NQFKGKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYNSYWYFDVWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 15)

[0072] 를 포함한다.

[0073] 표 1의 항체 변이체 C, D, F, G 및 H 각각은 전장 경쇄 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 9)

[0074] 를 포함한다.

[0081]

표 1의 변이체 C는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWGQGTLVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQ
 SSGLYSLSSVTVPTVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
 GGPSPVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 10)

[0082]

을 포함한다.

[0083]

표 1의 변이체 D는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWGQGTLVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQ
 SSGLYSLSSVTVPTVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
 GGPSPVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 11)

[0084]

을 포함한다.

[0085]

표 1의 변이체 E는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWGQGTLVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQ
 SSGLYSLSSVTVPTVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
 GGPSPVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 12)

[0086]

을 포함한다.

[0087]

표 1의 변이체 F는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSASYWYFDVWGQGTLVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQ
 SSGLYSLSSVTVPTVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
 GGPSPVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 13)

[0088]

을 포함한다.

[0089]

표 1의 변이체 G는 전장 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFKGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSSARYWYFDVWGQGTLVTV
 SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQ
 SSGLYSLSSVTVPTVSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
 GGPSPVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 14)

[0090]

를 포함한다.

[0091]

특정의 실시양태에서, 본 발명의 인간화 2H7 항체는 IgG Fc 내에서의 아미노산 변경을 추가로 포함하고, 야생형 IgG Fc를 갖는 항체에 비해 인간 FcRn에 대한 결합 친화도가 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 보다 바람직하게 100배 이상, 바람직하게 125배 이상, 보다 더 바람직하게 150배 이상 내지 약 170배 이상 증가된다.

[0092]

IgG에서의 N-글리코실화 부위는 CH2 도메인 내의 Asn297이다. 본 발명의 인간화 2H7 항체 조성물에는 Fc 영역을 갖는 앞서의 인간화 2H7 항체의 조성물이 포함되는데, 이러한 조성물 중의 항체의 약 80 내지 100% (바람직

하게, 약 90 내지 99%)는 당단백질의 Fc 영역에 부착된, 푸코스가 결여된 성숙한 코어 탄수화물 구조를 포함한다. 이러한 조성물은 Fc γRIIA (F158) [이는 인간 IgG와 상호 작용하는 데에 있어서 Fc γRIIA (V158) 만큼 유효하지 않다]와의 결합성에 있어서 놀라운 개선을 나타내는 것으로 본원에서 입증되었다. Fc γRIIA (F158)은 정상적이고 건강한 아프리카계 미국인 및 백인에게서 Fc γRIIA (V158) 보다 더 흔하다 [참고: Lehrnbecher et al. *Blood* 94:4220 (1999)]. 전통적으로, 가장 흔히 사용되고 있는 산업용 숙주 중의 하나인 중국산 햄스터 난소 세포 (CHO)에서 생성된 항체는 비-푸코실화되는 집단 내에 약 2 내지 6%로 함유된다. 그러나, YB2/0 및 Lec13은 78% 내지 98% 비-푸코실화 종을 수반한 항체를 생성시킬 수 있다. 문헌 [참고: Shinkawa et al. *J Bio. Chem.* 278 (5), 3466-347 (2003)]에는 FUT8 활성이 덜한 YB2/0 및 Lec13 세포에서 생성된 항체가 시험관내에서 상당히 증가된 ADCC 활성을 나타낸다고 보고되었다. 푸코스 함량이 감소된 항체의 생성이 또한, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Li et al. (GlycoFi) "Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*" in *Nature Biology* online publication 22 Jan. 2006; Niwa R. et al. *Cancer Res.* 64(6):2127-2133 (2004); US 2003/0157108 (Presta); US 6,602,684 and US 2003/0175884 (Glycart Biotechnology); US 2004/0093621, US 2004/0110704, US 2004/0132140 (all of Kyowa Hakko Kogyo)].

[0098]

본원에서의 제제는 또한, 치료하고자 하는 특별한 적응증에 대해 필요한 만큼의 한 가지 초과의 활성 화합물을 함유할 수 있는데, 바람직하게는 이들 활성 화합물이 상보적 활성을 지녀 서로 불리한 효과를 나타내지 않는다. 예를 들어, 세포독성제, 화학요법제, 시토카인 또는 면역억제제 (예를 들어, T 세포 상에서 작용하는 작용제, 예를 들어 시클로스포린, 또는 T 세포와 결합하는 항체, 예를 들어 LFA-1과 결합하는 항체)를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 기타 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 질병 또는 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 요인들에 좌우된다. 이들은 일반적으로, 본원에 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로, 또는 기준에 이용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0099]

생체내 투여에 사용하고자 하는 제제는 멸균성이어야만 한다. 이는 멸균성 필터를 통하여 여과시킴으로써 용이하게 달성된다.

[0100]

항체 생성

[0101]

모노클로날 항체

[0102]

모노클로날 항체는 문헌 [참고: Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]에 의해 제조할 수 있다.

[0103]

하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적당한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터를 상기 언급된 바와 같이 면역시켜, 면역을 위해 사용된 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 생성시키거나 생성시킬 수 있는 림프구를 유도시킨다. 다르게는, 림프구를 시험관 내에서 면역시킬 수 있다. 면역시킨 후, 림프구를 단리시킨 다음, 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여, 림프구를 골수종 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 [참고: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].

[0104]

이로써 제조된 하이브리도마 세포를 시당하고, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포 (융합 파트너로서 지칭되기도 함)의 성장 또는 생존을 억제하는 한 가지 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우에는, 하이브리도마에 대한 선택적 배양 배지가 전형적으로, HGPRT-결핍성 세포의 성장을 방지시키는 물질인 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이다.

[0105]

바람직한 융합 파트너 골수종 세포는 효율적으로 융합시켜 주고, 선별된 항체 생산 세포에 의한 안정한 고 수준의 항체 생성을 뒷받침해주며, 융합되지 않은 모 세포에 대항하여 선택되는 선택적 배지에 대해 민감한 세포이다. 바람직한 골수종 세포주는 뮤런 골수종 세포주, 예를 들어 공급처 [Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA]로부터 입수 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것; 및 공급처 [American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA]로부터 입수 가능한 SP-2 및 유도체 (예를 들어, X63-Ag8-653) 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종-골수종 세포주 또한, 인간 모노클로날 항체를 생산하는 것으로 보고되었다 [참고: Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York,

1987)].

[0106] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 대상으로 하여, 항원에 대항하여 유도된 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법, 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들어 방사성 면역검정 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0107] 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 문헌 [참고: Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐챠드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.

[0108] 일단 목적하는 특이성, 친화성, 및/또는 활성의 항체를 생성시키는 하이브리도마 세포를 확인하면, 제한 희석 과정에 의해 클론을 서브클로닝시킨 다음, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 [참고: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. 이러한 목적에 적합한 배양 배지에는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포는, 이러한 세포를 마우스 내로 복강내 주사함으로써 동물 중에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0109] 상기 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를, 통상적인 항체 정제 과정, 예를 들어 친화 크로마토그래피 (예를 들면, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스를 이용한다) 또는 이온-교환 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 등에 의해 배양 배지, 복수 또는 혈청으로부터 적합하게 분리시킨다.

[0110] 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함)을 사용하여 용이하게 단리 및 서열 분석 한다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 제공된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 위치시킨 다음, 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜리 (*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포 (이들은 달리 항체 단백질을 생산하지 않는다) 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 획득할 수 있다. 항체를 암호화하는 DNA를 세균에서 재조합 발현시키는 것에 관한 고찰 문헌에는 다음이 포함된다 [참고: Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plueckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992)].

[0111] 추가의 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편은 문헌 [참고: McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리시킬 수 있다. 문헌 [참고: Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에는 파지 라이브러리를 사용하여 뮤린 및 인간 항체를 각각 단리시키는 방법이 기재되어 있다. 후속 공개 문헌에는 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합 [참고: Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)] 뿐만 아니라 연쇄 셔플링 [참고: Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)]에 의해 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 따라서, 이들 기술은 모노클로날 항체를 단리시키기 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행 가능한 대체 방안이다.

[0112] 항체를 암호화하는 DNA는, 예를 들어 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 (C_H 및 C_L) 서열로 치환시키거나 [참고: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)], 또는 면역글로불린 암호화 서열을 비-면역글로불린 폴리펩티드 (이종 폴리펩티드)에 대한 암호화 서열의 전부 또는 일부와 융합시킴으로써 변형시켜 키메라 또는 융합 항체 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드 서열을 항체의 불변 도메인 대신 사용하거나, 또는 항체의 하나의 항원 결합 부위의 가변 도메인 대신 사용하여, 항원에 대한 특이성을 지닌 하나의 항원 결합 부위와, 상이한 항원에 대한 특이성을 지닌 또 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 창출시킨다.

[0113] 인간화 항체

[0114] 비-인간 항체를 인간화시키기 위한 방법이 당해 분야에 보고되었다. 바람직하게, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입 (import)" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 필수적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써, 다음 문헌의 방법에 따라서 수행할 수 있다 [참고: Winter and co-workers (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 한 본래의 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 키메라 항체 [참고: 미국 특허

제4,816,567호]이다. 실제적으로, 인간화 항체는 전형적으로, 몇몇 초가변 영역 잔기와 가능하게는 몇몇 FR 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다.

[0115] 인간화 항체를 제조하는 데에 사용될, 경쇄 및 중쇄의 인간 가변 도메인의 선택이 항원성 및 HAMA 반응 (인간 항-마우스 항체) (해당 항체를 인간 치료용으로 사용하고자 하는 경우)을 저하시키는 데에 있어서 매우 중요하다. 소위 "최량 적합 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 V 도메인 서열을 확인하고, 그 내에 있는 인간 골격 영역 (FR)을 인간화 항체에 대해 허용한다 [참고: Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특별한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 골격 영역을 이용한다. 동일한 골격을 여러 개의 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 [참고: 예를 들어, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)].

[0116] 항원에 대한 높은 결합 친화도와 기타 바람직한 생물학적 특성을 유지하고 있는 항체로 인간화시키는 것이 추가로 중요하다. 이를 달성하기 위한 바람직한 방법에 따르면, 모 서열과 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열과 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업자에게 널리 알려져 있다. 선별된 후보 면역글로불린 서열의 추정상의 3차원적 입체 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있는데, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원과 결합할 수 있는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별하고, 이를 수용자로부터 유입 서열과 합하여, 목적하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성을 달성하도록 한다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합성에 영향을 미치는 데에 있어 직접적이면서도 가장 실재적으로 관여한다.

[0117] 인간화 항체는 면역접합체를 생성시키기 위해 하나 이상의 세포독성제(들)와 임의로 접합시킨 항체 단편, 예를 들어 Fab일 수 있다. 다르게는, 인간화 항체는 전장 항체, 예를 들어 전장 IgG1 항체일 수 있다.

인간 항체 및 파지 디스플레이 방법론

[0119] 인간화에 대한 대체 방안으로서, 인간 항체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역시 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 완전한 레퍼토리의 인간 항체를 생성시킬 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포계 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동형접합성 결실로 인해, 내인성 항체 생성이 완전히 억제되는 것으로 보고되었다. 이러한 생식세포계 돌연변이체 마우스 내로 인간 생식세포계 면역글로불린 유전자 어레이를 전이시키면, 항원 시험감염시 인간 항체가 생성될 것이다 [참고: 예를 들어, 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); 미국 특허 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,591,669호 (GenPharm), 제5,545,807호; 및 WO 97/17852].

[0120] 다르게는, 파지 디스플레이 기술 [참고: McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)]을 사용하여, 면역시키지 않은 공여자로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관 내에서 생성시킬 수 있다. 이러한 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자를 섬유상 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 외피 단백질 유전자 내로 동일 프레임 내에서 클로닝시키고, 파지 입자 표면 상에서 기능적 항체 단편으로서 디스플레이한다. 섬유상 입자는 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 카피 (copy)를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기준으로 하여 선별하게 되면, 이들 특성을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자를 선별할 수 있다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성들 중의 몇 가지 특성을 모방한다. 파지 디스플레이에는 각종 포맷으로 수행할 수 있으며, 이들에 대한 고찰은, 예를 들어 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)]. V-유전자 절편의 몇 가지 공급원을 파지 디스플레이를 위해 사용할 수 있다. 문헌 [참고: Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에서는 면역시킨 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 면역시키지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자 레퍼토리를 구축할 수 있고, 다양한 항원 (자기 항원 포함) 어레이에 대한 항체는 본질적으로, 문헌 [참고: Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라서 단리시킬 수 있다 [또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호 참고].

[0121] 앞서 논의된 바와 같이, 인간 항체는 시험관내 활성화 B 세포에 의해 생성시킬 수도 있다 [참고: 미국 특허 제

5,567,610호 및 제5,229,275호].

[0122] **항체 단편**

[0123] 특정 상황 하에서는 완전한 항체 보다 오히려 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편은 신속한 청소를 허용해 주고, 고형 종양에 대한 접근을 증진시킬 수 있다.

[0124] 항체 단편을 생성시키기 위한 각종 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 본래의 항체를 단백질 분해적 절단시킴으로써 유도되었다 [참고: 예를 들어, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]. 그러나, 이들 단편은 현재, 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성시킬 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜리에서 발현되어 이로부터 분비됨으로써, 이들 단편을 대량으로 생성시키는 것이 용이해진다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 다르게는, Fab'-SH 단편을 이. 콜리로부터 직접 회수하고, 이를 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성시킬 수 있다 [참고: Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]. 또 다른 접근 방식에 따르면, F(ab')₂ 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리시킬 수 있다. 재이용 (salvage) 수용체 결합성 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편을 생성시키기 위한 기타 기술은 전문가에게 명백할 것이다. 기타 실시양태에서, 선택되는 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다 [참조: WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호]. Fv 및 sFv는 불변 영역이 제거된 본래의 결합 부위를 수반한 유일한 종이므로, 이들은 생체내 사용 동안 비특이적 결합을 저하시키는 데에 적합하다. sFv 융합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 효과기 단백질의 융합물을 산출시키기 위해 구축될 수 있다 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 참고]. 항체 단편은, 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일-특이적 또는 이중-특이적일 수 있다.

[0125] **기타 아미노산 서열 변형**

[0126] 본원에 기재된 CD20 결합성 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 요망될 수 있다. 항-CD20 항체의 아미노산 서열 변이체는 항-CD20 항체 핵산 내로 적당한 뉴클레오티드 변화를 도입하거나, 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형에는, 예를 들어 항-CD20 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환이 포함된다. 모든 결실, 삽입 및 치환 조합을 만들어 최종 구조물에 도달시키는데, 단 이러한 최종 구조물은 목적하는 특징을 보유하고 있어야 한다. 아미노산 변화는 또한, 항-CD20 항체의 해독 후 프로세스를 변경시킬 수 있는데, 예를 들어 글리코실화 부위의 번호 또는 위치를 변화시킬 수 있다.

[0127] 돌연변이 유발을 위한 바람직한 위치인 항-CD20 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 데에 유용한 방법은 문헌 [참고: Cunningham and Wells in *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 소위 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이다. 여기서는 특정 잔기, 또는 표적 잔기 군을 확인하고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu 등의 전하를 띤 잔기), 이를 중성 또는 음전하를 띤 아미노산 (가장 바람직하게, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체시켜, 상기 아미노산과 CD20 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이어서, 이러한 치환물에 대한 기능적 민감도를 입증하는 아미노산 위치는 치환 부위에 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되긴 하였지만, 돌연변이 자체의 특성이 예정될 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항-CD20 항체 변이체를 대상으로 하여 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0128] 아미노산 서열 삽입물에는 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물 뿐만 아니라 1개 잔기에서부터 100개 또는 그 초과의 잔기를 함유하는 폴리웨პ티드까지 길이의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합물이 포함된다. 말단 삽입물의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 수반한 항-CD20 항체 또는 세포독성 폴리웨პ티드와 융합된 항체가 포함된다. 항-CD20 항체 분자의 기타 삽입형 변이체에는 항-CD20 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 융합물 (예를 들어, ADEPT), 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리웨პ티드와의 융합물이 포함된다.

[0129] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 항-CD20 항체 분자 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환형 돌연변이 유발을 위한 가장 관심 있는 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변화물도 또한 고려된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환물"이란 표제 하에 다음 표에 나타나 있다. 이러한 치환물로 인해 생물학적 활성 상의 변화가 생긴다면, 상기 표에서 "예시 치환물"로 명명되거나

또는 아미노산 부류를 참고로 하여 다음에 추가로 기재되는 바와 같은 보다 유의한 변화를 도입할 수 있고, 그 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 2

아미노산 치환

본래의 잔기	예시 치환물	바람직한 치환물
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)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	Leu

[0130]

[0131] 항체의 생물학적 특성에 있어서의 실재적인 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체 형태로서의, 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조를 유지시키거나, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지시키거나, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대한 그들의 효과에 있어서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 천연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 나눈다:

[0132] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0133] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0134] (3) 산성: asp, glu;

[0135] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0136] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0137] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0138] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류의 구성원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다.

[0139] 항-CD20 항체의 적당한 입체 형태를 유지시키는 데에 관여하지 않은 어떠한 시스테인 잔기도, 일반적으로 세린으로 치환시켜 분자의 산화적 안정성을 개선시키고 이상한 가교 결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합(들)을 항체에 가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

[0140] 특히 바람직한 유형의 치환형 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 이로써 생성된 추가의 개발을 위해 선택된 변이체(들)는,

이들을 생성시킨 모 항체와 비교해서 개선된 생물학적 특성을 지닐 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성시키기 위한 편리한 방식은 과지 디스플레이를 이용한 친화 돌연변이를 포함한다. 간략하게 언급하면, 몇 가지 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환을 생성시킨다. 이로써 생성된 항체 변이체를, 각 입자 내에 패키지된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 섬유상 과지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이한다. 이어서, 이와 같이 과지-디스플레이된 변이체를 대상으로 하여, 본원에 기재된 바와 같이 그들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형시키기 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행하여 항원 결합성에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 다르게는, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 인간 CD20 간의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이와 이웃하는 잔기는 본원에서 상세히 설명된 기술에 따라서 치환시키기 위한 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 대상으로 하여 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 결정에서 탁월한 특성을 지닌 항체를 추가 개발을 위해 선별할 수 있다.

[0141] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 본래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경시킨다는 것은 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 부분을 결실시키고/시키거나 항체에는 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가한다는 것을 의미한다.

[0142] 항체의 글리코실화는 전형적으로, N-연결 또는 O-연결된다. N-연결된 탄수화물 부분을 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시킨 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이다)은 탄수화물 부분을 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 어느 하나가 폴리펩티드에 존재하는 것은 잠재적 글리코실화 부위를 창출시켜 준다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈اكت오사민, 갈اكت오스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시 아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.

[0143] 글리코실화 부위를 항체에 부가하는 것은 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우에는) 상기 언급된 트리펩티드 서열 중의 하나 이상을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수행된다. 이러한 변경은 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래의 항체 서열에 부가하거나, 또는 이를 잔기에 의해 치환시킴으로써 만들 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0144] 항-CD20 항체의 아미노산 서열 변이체를 암호화하는 핵산 분자는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 제조한다. 이들 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 항-CD20 항체의 비-변이체 버전을 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위-지시된) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0145] 본 발명의 항체의 항원-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 증강시키도록 효과기 기능 측면에서 상기 항체를 변형시키는 것이 요망될 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성할 수 있다. 다르게는, 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역 내로 도입함으로써, 이러한 영역 내에 쇄간 디슬피드 결합을 형성시킬 수 있다. 이로써 생성된 동종-이량체성 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 지닐 수 있다 [참고: Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) and Shope, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)]. 항종양 활성이 증강된 동종-이량체성 항체는 다음 문헌에 기재된 바와 같이 이종-이관능성 가교 결합체를 사용하여 제조할 수도 있다 [참고: Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)]. 다르게는, 이중 Fc 영역을 갖도록 항체를 공학적으로 처리함으로써, 증강된 보체 매개된 용해성과 ADCC 능력을 지니도록 할 수 있다 [참고: Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)].

치료적 용도

[0147] 본 발명의 인간화 2H7 CD20 결합성 항체를 포함하는 본원에 기재된 조성물 및 방법은 수 많은 악성 및 비-악성 질환, 예를 들어 CD20 양성 B 세포 암, 예를 들면 B 세포 림프종 및 백혈병, 및 자가면역 질환을 치료하는 데에 유용하다. 골수 내의 줄기 세포 (B-세포 전구 세포)에는 CD20 항원이 결여되어 있으므로, 치료 후에 건강한 B 세포가 재생되기 시작하여 수 개월 내에는 정상 수준으로 돌아온다.

[0148] CD20 양성 B 세포 암은 세포 표면 상에 CD20을 발현하는 B 세포의 비정상적인 증식을 포함하는 것이다. CD20 양성 B 세포 신생물에는 CD20-양성 호지킨병 [림프구 우위형 호지킨병 (LPHD) 포함]; 비호지킨 림프종 (NHL);

소포 중심 세포 (FCC) 림프종; 급성 림프구성 백혈병 (ALL); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 모발 세포 백혈병이 포함된다.

[0149]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "비호지킨 림프종" 또는 "NHL"은 호지킨 림프종 이외의 림프계 암을 지칭한다. 호지킨 림프종은 일반적으로, 리드-슈테른베르크 (Reed-Sternberg) 세포가 호지킨 림프종에는 존재하고 비호지킨 림프종에는 존재하지 않는 것으로써, 비호지킨 림프종과 구별될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 상기 용어에 포함되는 비호지킨 림프종의 예에는 당해 분야에 공지된 분류 도식, 예를 들어 문헌 [참고: *Color Atlas of Clinical Hematology* (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd. 2000) (특히 도 11.57, 11.58 및 11.59 내의 목록)]에 기재된 바와 같은 개정 유럽-미국 림프종 [Revised European-American Lymphoma (REAL)] 도식에 따라서 당업자 (예를 들어, 종양학자 또는 병리학자)에 의해 그 자체로서 확인될 수 있는 것이 포함된다. 보다 구체적인 예에는 재발성 또는 난치성 NHL, 제일선 저 악성도 (front line low grade) NHL, 병기 III/IV NHL, 화학요법 내성 NHL, 전구체 B 림프아구성 백혈병 및/또는 림프종, 소 림프구성 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 프로-림프구성 백혈병 및/또는 소 림프구성 림프종, B-세포 프로-림프구성 림프종, 면역종 및/또는 림프형질세포성 림프종, 연변종 (marginal zone) B 세포 림프종, 비장 연변종 림프종, 림프절 이외 연변종 - MALT 림프종, 림프절 연변종 림프종, 모발 세포 백혈병, 형질세포종 및/또는 형질 세포 글수종, 저 악성도/소포성 림프종, 중간 악성도/소포성 NHL, 외투 세포 림프종, 소포 중심 림프종 (소포성), 중간 악성도 확산성 NHL, 확산성 대형 B-세포 림프종, 침습성 (공격성) NHL (침습성 제일선 NHL 및 침습성 재발 NHL 포함), 자기 유래 줄기 세포 이식 후에 재발하거나 이에 난치성인 NHL, 원발성 종격 (mediastinal) 대형 B-세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 고 악성도 면역모세포성 NHL, 고 악성도 림프아구성 NHL, 고 악성도 소 비-절단 세포 NHL, 거대 질환 NHL, 버키트 (Burkitt) 림프종, 전구체 (말초) 대형 과립상 림프구성 백혈병, 균상식육종 (mycosis fungoides) 및/또는 세자리 (Sezary) 증후군, 피부 림프종, 역형성 대형 세포 림프종, 혈관중심성 림프종이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0150]

구체적 실시양태에서, 인간화 CD20 결합성 항체 및 그의 기능적 단편을 포함하는 제약 조성물은 비호지킨 림프종 (NHL), 림프구 우위형 호지킨병 (LPHD), 소 림프구성 림프종 (SLL), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL) (이들 질환의 재발 포함)을 치료하는데 사용한다.

[0151]

무통성 림프종은 서서히 성장하는 불치병인데, 수차례의 차도와 재발을 반복한 후에 환자들은 평균 6 내지 10년 정도 생존한다. 한 실시양태에서, 인간화 CD20 결합성 항체 또는 그의 기능적 단편은 무통성 NHL, 예를 들어 재발성 무통성 NHL 및 리툭시맙-난치성 무통성 NHL을 치료하기 위해 사용한다. 재발성 무통성 NHL 환자는 기존에 리툭시맙을 이용한 치료 과정을 한번 거쳤고 6개월 초과 동안 이에 반응하였던 리툭시맙 반응자일 수 있다.

[0152]

본 발명의 인간화 2H7 항체 또는 그의 기능적 단편은, 예를 들어 재발성 또는 난치성 저 악성도 또는 소포성의 CD20-양성 B-세포 NHL에서 단일 작용제 치료 (단일제 요법)로서 유용할 수 있거나, 또는 기타 약물과 연계해서 다중-약물 섭생으로 환자에게 투여할 수 있다.

[0153]

본 발명의 인간화 2H7 항체 또는 그의 기능적 단편은 제일선 요법으로서 유용할 수 있다. 본 발명은 또한, 다음 약물들 중의 어느 하나를 이용한 치료에 대해 전혀 반응하지 않거나 부적당하게 반응하거나, 또는 다음 약물들을 이용한 치료 후에 재발한, CD20 양성 B 세포 신생물 환자를 치료하기 위한 상기 항체의 용도를 고려한다: 리툭시맙 (공급처: Genentech); 이브리투모마브 티옥세탄 (Zevalin™, 공급처: Biogen Idee); 토시투모마브 (Bexxar™, 공급처: GlaxoSmithKline); HuMAX-CD20™ (공급처: GenMAb); IMMU-106 (이는 인간화 항-CD20 a.k.a. hA20 또는 90Y-hL2이다, 공급처: Immunomedics); AME-133 (공급처: Applied Molecular Evolution/Eli Lilly); 젠투주마브 오조가미신 (gentuzumab ozogamicin) (Mylotarg™, 인간화 항-CD33 항체, 공급처: Wyeth/PDL); 알лем투주마브 (alemtuzumab) (Campath™, 항-CD52 항체, 공급처: Schering Plough/Genzyme); 에프라투주마브 (epratuzumab) (IMMU-103™, 인간화 항-CD22 항체, 공급처: Immunomedics).

[0154]

본 발명은 추가로, 본 발명의 인간화 2H7 항체를 이용하여, 플루다라빈 요법이 실패한 환자를 포함한 CLL 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0155]

본원에서의 "자가면역 질환"은 개개인 자신의 조직이나 그의 공동-분리물 또는 발현물로부터 유발되고 자신의 조직이나 그의 공동-분리물 또는 발현물에 대항하여 유도된 질병 또는 장애, 또는 이로부터 비롯되는 질환이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예에는 관절염 [류마티스 관절염, 예를 들어 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염 및 연소성 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형 관절염, 만성 원발성 다발성 관절염, 반응성 관절염, 및 강직성 척추염], 염증성 과증식성 피부 질환, 건선, 예

를 들어 반점상 건선, 물방울 건선, 농포성 건선, 및 손톱 건선, 아토피, 예를 들어 아토피성 질환, 예를 들면 건초열 및 줍스 증후군 (Job's syndrome), 피부염, 예를 들어 접촉성 피부염, 만성 접촉성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염, 포진성 피부염 및 아토피성 피부염, X-염색체 연관성 고 IgM 증후군, 두드러기, 예를 들어 만성 알레르기성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들면 만성 자가면역성 두드러기, 다발성 근염/피부 근염, 유년성 피부근염, 독성 표피 피사용해, 피부 경화증 (전신성 피부 경화증 포함), 경화증, 예를 들어 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예를 들면 스피노-광학 (spino-optical) MS, 원발성 진행성 MS (PPMS) 및 재발 완화형 (relapsing remitting) MS (RRMS), 진행성 전신성 경화증, 아테롬성 경화증, 동맥 경화증, 파종성 경화증 및 운동실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) [예를 들어, 크론병, 자가면역 매개된 위장 질환, 대장염, 예를 들어 궤양성 대장염 (ulcerative colitis, colitis ulcerosa), 현미경적 (미세) 대장염, 콜라겐성 대장염, 다발성 대장염, 피사성 소장대장염, 및 전층 대장염, 및 자가면역성 염증성 장 질환], 피저 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염, 호흡기 장애 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡기 장애 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막 전부 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역성 혈액 장애, 류마티스성 척추염, 돌발성 난청, IgE-매개성 질환, 예를 들어 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예를 들어 라스무센 (Rasmussen) 뇌염 및 (대뇌)변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예를 들어 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비-육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 후방 포도막염 또는 자가면역성 포도막염, 신 증후군을 수반한 및 수반하지 않는 사구체신염 (GN), 예를 들어 만성 또는 급성 사구체신염, 예를 들면 원발성 GN, 면역 매개성 GN, 막성 GN (막성 신증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신증, 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN) (유형 I 및 유형 II 포함), 및 신속한 진행성 GN, 알레르기성 질환 및 반응, 알레르기성 반응, 습진, 예를 들어 알레르기성 또는 아토피성 습진, 천식, 예를 들어 기관지성 천식, 및 자가면역성 천식, T 세포 침윤 및 만성 염증 반응과 관련된 질환, 외래 항원, 예를 들어 임신 동안 태아 A-B-O 혈액형에 대항한 면역 반응, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역성 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 홍반성 파종성 루푸스, 루푸스 (신염, 뇌염, 소아, 비-신, 신외, 원판상, 탈모증 포함), 유년성 (유형 I) 진성 당뇨병, 예를 들어 소아 인슐린-의존성 진성 당뇨병 (IDDM), 성인 진성 당뇨병 (유형 II 당뇨병), 자가면역성 당뇨병, 특발성 요붕증, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 육아종증, 예를 들어 림프종모양 육아종증, 베게너 육아종증, 과립구결핍증, 혈관염, 예를 들어 대혈관 혈관염 [류마티스성 다발성 근육통 및 거대 세포 (다카야스) 관절염 포함], 중혈관 혈관염 [가와사키병 (Kawasaki's disease) 및 결절성 다발성 동맥염 포함], 현미경적 다발성 동맥염, CNS 혈관염, 피사성, 피부 또는 과민성 혈관염, 전신성 피사 혈관염, 및 ANCA-관련 혈관염, 예를 들어 추르크-스트라우스 (Churg-Strauss) 혈관염 또는 증후군 (CSS), 측두 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역성 재생불량성 빈혈, 쿠움스 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈, 예를 들어 자가면역성 용혈성 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈 (anemia perniciosa), 애디송병 (Addison's disease), 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역성 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 백혈구 누출과 관련된 질환, CNS 염증성 장애, 다중 기관 상해 증상, 예를 들어 패혈증, 외상 또는 출혈에 따른 이차 증후군, 항원-항체 복합체 매개성 질병, 항-사구체 기저막 질병, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병 (Bechet's 또는 Behcet's disease), 캐슬맨 (Castleman) 증후군, 구드페스츄어 (Goodpasture) 증후군, 레이노 증후군, 쇼그伦 증후군, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 유사천포창, 예를 들어 수포성 유사천포창 및 피부 유사천포창, 천포창 (예를 들어, 심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유사천포창 천포창, 및 홍반성 천포창), 자가면역성 다발성 내분비병증, 라이터 (Reiter) 병 또는 증후군, 면역 복합체 신염, 항체 매개된 신염, 시신경 척수염, 다발성 신경병증, 만성 신경병증, 예를 들어 IgM 다발성 신경병증 또는 IgM-매개성 신경병증, 혈소판감소증 (예를 들어, 심근 경색 환자에 의해 발병되는 바와 같다), 예를 들어 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 수혈 후 자반병 (PTP), 혜파린-유도성 혈소판감소증 및 자가면역 또는 면역 매개성 혈소판감소증, 예를 들어 특발성 혈소판감소성 자반병 (ITP) (급성 또는 만성 ITP 포함), 고환 및 난소의 자가면역 질환, 예를 들어 자가면역성 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선 기능저하증, 부갑상선 기능저하증, 자가면역성 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예를 들면 자가면역성 갑상선염, 하시모토병 (Hashimoto's disease), 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염) 또는 아급성 갑상선염, 자가면역성 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능저하증, 그레이브병 (Grave's disease), 다분비선 증후군, 예를 들어 자가면역성 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비 병증 증후군), 종양연관성 증후군, 예를 들어 신경학적 종양연관성 증후군, 예를 들면 람베르트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-람베르트 증후군, 근육 강직 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기성 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증, 예를 들어 흥선종 관련 중증 근무력증, 소뇌 변성, 신경근육긴장증, 안진전 또는 안진전 간대성근경련증 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점 운동 신경병증, 쉬한

(Sheehan) 증후군, 자가면역성 간염, 만성 간염, 루포이드 간염, 거대 세포 간염, 만성 활동성 간염 또는 자가면역성 만성 활동성 간염, 림프계 간질성 폐렴 (LIP), 폐쇄성 세기관지염 (비-이식성) 대 NSIP, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 베르거병 (Berger's disease) (IgA 신증), 특발성 IgA 신증, 선형 IgA 피부병, 원발성 담즙성 간경변, 폐경화증, 자가면역성 장병증 증후군, 비열대병, 복강 질환, 비열대 스프루 (글루텐 장병증), 난치성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS; Lou Gehrig's disease), 판성 동맥 질환, 자가면역성 귀 질환, 예를 들어 자가면역성 내이 질환 (AIED), 자가면역성 난청, 안전진 간대성근경련증 (OMS), 다발성 연골염, 예를 들어 난치성 또는 재발성 다발성 연골염, 폐포 단백증, 아밀로이드증, 공막염, 비-암성 림프구증가증, 모노클로날 B 세포 림프구증가증 [예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 의미 미확정의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS)]을 포함하는 원발성 림프구증가증, 말초 신경병증, 종양연관성 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근육병증, 국소 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도막망막염, 맥락망막염, 자가면역성 혈액 장애, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전증, 슈미츠 (Schmidt) 증후군, 부신염, 위선 위축증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 예를 들어 자가면역성 탈수초성 질환 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 당뇨병성 신증, 드레슬러 (Dressler) 증후군, 원형 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노이드 현상, 식도 운동장애, 손발가락 경화증 및 모세혈관 확장증), 남성 및 여성 자가면역성 불임, 혼합 결체 조직 질환, 샤가스병 (Chagas' disease), 류마티스성 발열, 재발성 유산, 농부 폐, 다형 홍반, 심장결개 후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 애조가 폐 (bird-fancier's lung), 알레르기성 육아종성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예를 들어 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증 (leishmaniasis), 키파노소마증 (kypanosomiasis), 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증 (aspergillosis), 삼프터 (Sampter) 증후군, 캐이플란 (Caplan) 증후군, 뎅기 (dengue), 심내막염, 심내막심근 섬유증, 확산성 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 안내염, 장기 응기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 헤테로크로닉 (heterochronic) 섬모체염, 홍채섬모체염 (급성 또는 만성) 또는 폭스 (Fuch) 섬모체염, 헤노호-쉔라인 (Henoch-Schonlein) 자반병, 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종 후 증후군, 선천성 풍진 감염, 엠슈타인-바르 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 유행성 이하선염, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역성 생식선 기능상실, 시덴햄 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신염, 폐쇄 혈전혈관염, 갑상선중독증, 척수 매독, 맥락막염, 거대 세포 다발성 근육통, 내분비계 눈병증, 만성 과민성 폐렴, 건성 각막결막염, 표피성 각막결막염, 특발성 신 증후군, 최소 변화 신증, 양성 가족성 및 허혈성 재관류 상해, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐색성 기도 질환, 규폐증, 아프타 (aphthae), 아프타성 구내염, 동맥경화성 장애, 아스페르미오게네스 (aspermigenesis), 자가면역성 용혈, 뷔크병 (Boeck's disease), 한랭글로불린혈증, 뒤피트렌 (Dupuytren) 구축, 수정체과민성 안내염, 알레르기성 장염, 나성 결절성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 열성 류마티스, 해먼-리치 (Hamman-Rich) 병, 감각신경성 난청, 발작성 혜모글로불린혈증, 생식선 기능저하증, 국소성 회장염, 백혈구감소증, 전염성 단핵구증, 횡단성 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 훠장염, 급성 다발성 신경근염, 고저 농폐증, 쿼베인 (Quervain) 갑상선염, 후천성 스페닉 (spenic) 위축증, 항정자 항체로 인한 불임, 비-암성 홍선종, 백반증, SCID 및 엠슈타인-바르 바이러스 관련 질환, 후천성 면역결핍증 (AIDS), 건선성 질환, 예를 들어 리슈만편모충증, 독성-속 증후군, 식품 독, T 세포의 침윤과 관련된 질환, 백혈구-부착 결핍증, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 백혈구 누출과 관련된 질환, 다발성 기관 상해 증후군, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기성 신경염, 자가면역성 다발성 내분비병증, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역성 위축성 위염, 교감성 안염, 류마티스성 질환, 혼합 결체 조직 질환, 신 증후군, 훠도염, 다내분비계 기능상실, 말초 신경병증, 자가면역성 다분비성 증후군 유형 I, 성인 특발성 부갑상선 기능저하증 (AOIH), 전체 탈모증, 화장형 심근병증, 후천성 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소 침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비-화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 사골, 전두, 상악 또는 접형 부비동염, 호산구 관련 장애, 예를 들어 호산구증, 폐 침윤 호산구증, 호산구증-근육통 증후군, 로플러 (Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증, 기관지폐성 아스페르길루스증, 아스페르길루스종, 또는 호산구를 함유하는 육아종, 아나필락시, 혈청음성 척추관절병증, 다내분비계 자가면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 일과성 소아 저감마글로불린혈증, 비스코트-알드리히 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 실조성 모세혈관화장증, 콜라겐 질병과 연관된 자가면역 질환, 류마티즘, 신경 질환, 림프절병, 허혈성 재관류 장애, 혈압 반응 저하, 혈관성 기능이상, 혈관화장증, 조직 상해, 심혈관계 허혈증, 통각과민, 뇌 허혈증, 및 혈관신생을 수반하는 질환, 알레르기성 과민증 장애, 사구체신염, 재관류 상해,

심근 또는 기타 조직의 재판류 상해, 급성 염증성 성분을 수반한 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 기타 중추 신경계 염증 장애, 안구 및 안와 염증 장애, 과립구 수혈 관련 증후군, 시토카인 유도된 독성, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경화증, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 대동맥 장애, 동맥내 과형성, 소화성 궤양, 판막염, 및 자궁내막증이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0156] 구체적 실시양태에서, 인간화 2H7 항체 및 그의 기능적 단편을 포함하는 제약 조성물은 류마티스 관절염 및 연소성 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) (루푸스 신염 포함), 베게너병, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 특발성 혈소판감소성 자반병 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증 (재발 완화형 MS 포함), 건선, IgA 신증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, ANCA 관련 혈관염, 진성 당뇨병, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 시신경 척수염 (NMO) 및 사구체신염을 치료하는데 사용한다.

[0157] "치료하는", "치료 (처치)" 또는 "완화"는 치료적 처치를 지칭하는데, 이의 목적은 표적화된 병리적 질환이나 장애를 치유하지 못한다면 이를 느리게 진행 (경감)시키거나 또는 이러한 질환의 재발을 방지시키는 것이다. 본 발명의 방법에 따라서 치료량의 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체를 투여한 후에, 대상체가 특별한 질병의 한 가지 이상 징후 및 증상을 나타내지 않거나 또는 이러한 징후 및 증상이 관찰 가능하고/하거나 측정 가능한 수준으로 저하된 경우에, 이러한 대상체가 자가면역 질환 또는 CD20 양성 B 세포 악성 종양에 대해 성공적으로 "치료"된 것이다. 예를 들어, 암의 경우에는 암 세포 수를 상당히 감소시키거나 암 세포를 없애고/없애거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 종양 성장을 어느 정도 억제시키고/시키거나; 차도 기간을 연장시키고/시키거나; 질병의 진행을 느리게 하고/하거나; 특이적 암과 연관된 한 가지 이상의 증상을 어느 정도 경감시키고/시키거나; 발병률 및 사망률을 감소시키고 삶의 질을 개선시킨다. 질병의 징후 또는 증상 감소를 환자가 느낄 수도 있다. 치료로 인해, 모든 암 증상이 사라지는 것으로서 규정되는 완전한 반응, 또는 부분 반응 (여기서는, 종양 크기가 바람직하게는 50% 초과, 보다 바람직하게는 75% 정도 감소된다)을 달성할 수 있다. 환자가 안정 기간을 경험한 경우에도 환자가 치료된 것으로 간주된다. 한 가지 기준에서는, 본 발명의 h2H7 항체가 > 95% 말초혈 B 세포 고갈을 달성시켜 주고, 이러한 B 세포는 기준선의 25%로 회복된다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체를 이용한 치료는 치료 4개월 후, 바람직하게 6개월 후, 보다 바람직하게 1년 후, 보다 더 바람직하게 2년 이상 후에도 암 환자에게서 암이 진행되지 않게 하는 데에 유효하다. 해당 질병을 성공적으로 치료하고 개선시킨 것을 평가하기 위한 이들 파라미터는 당해 분야의 전문의에게 친숙한 통상의 과정에 의해 용이하게 측정할 수 있다.

[0158] "치료 유효량"은 대상체에게서 질병 또는 장애를 "치료"하는데 유효한 항체 또는 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 성장을 어느 정도 억제시키고/시키거나; 암과 연관된 한 가지 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다 ["치료하는"에 관한 앞서의 정의 참고]. 자가면역 질환의 경우, 항체 또는 기타 약물의 치료 유효량은 이러한 질환의 징후 및 증상을 저하시키는 데에 유효하다.

[0159] 신생물의 치료 효능 또는 치료 성공을 평가하기 위한 파라미터는 해당 질병 전문의에게 공지되어 있을 것이다. 일반적으로, 전문의는 특이적 질병의 징후 및 증상을 감소시키기 위한 방안을 찾을 것이다. 파라미터에는 평균 질병 진행 시간, 병의 차도 시간 및 안정 기간이 포함될 수 있다.

[0160] 다음 참고 문헌에는 림프종 및 CLL, 이들의 진단, 치료, 및 치료 효능을 측정하기 위한 표준 의학 과정이 기재되어 있다 [참고: Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL: *The Lymphomas*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1998; van Besien K and Cabanillas, F: Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, Chap. 70, pp 1293-1338, in: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed. Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; and Rai, K and Patel, D: Chronic Lymphocytic Leukemia, Chap. 72, pp 1350-1362, in: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed. Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000].

[0161] 자가면역 질환 또는 자가면역 관련 질환의 치료 효능 또는 치료 성공을 평가하기 위한 파라미터는 해당 질병 전문의에게 공지되어 있을 것이다. 일반적으로, 전문의는 특이적 질병의 징후 및 증상을 감소시키기 위한 방안을 찾을 것이다. 다음의 이의 예이다:

[0162] 한 실시양태에서, 인간화 2H7 항체를 포함하는 제약 조성물은 류마티스 관절염을 치료하는 데 사용한다.

[0163] RA는 2백만명 이상의 미국인에게 침범하여 이로 인해 고통받고 있는 사람의 일상 활동을 방해하여 쇠약하게 만드는 자가면역 질환이다. RA는 자신의 면역계가 관절 조직을 부적절하게 공격하고 만성 염증을 유발시켜 건강한 조직을 파괴시키고 관절 내에 손상을 입히는 경우에 발병한다. 증상에는 관절의 염증, 팽윤, 강직 및 통증이 포함된다. 부가적으로, RA는 전신 질환이기 때문에, 폐, 눈 및 골수와 같은 기타 조직에 영향을 미칠 수 있다. 치유법은 공지되어 있지 않다. 치료법에는 각종 스테로이드계 및 비스테로이드계 소염 약물, 면역억제제, 질병 완화 항류마티스 약물 (DMARD), 및 생물학적 작용제가 포함된다. 그러나, 많은 환자들은 치료에 대해 부적당한 반응을 지속적으로 나타낸다.

[0164] 본 발명의 항체를 초기 RA 환자에게서 1차 치료로서 [즉, 메토트렉세이트 (MTX)를 투약하지 않음] 및 단일제요법으로서 사용하거나 또는 예를 들어, MTX 또는 시클로포스파미드와 병용해서 사용하거나 이를 투여한 후에 사용할 수 있다. 또는, 항체를 DMARD 및/또는 MTX 난치성 환자에 대한 2차 치료로서 및 단일제요법으로서 사용하거나 또는, 예를 들어 MTX와 병용해서 사용할 수 있다. 인간화 CD20 결합성 항체는 관절 손상을 예방 및 제어하고, 구조적 손상을 지연시키며, RA 내의 염증과 관련된 통증을 감소시키고, 일반적으로 중간 수준 내지 중증의 RA 징후 및 증상들을 저하시키는 데에 유용하다. RA 환자는 RA를 치료하는 데 사용되어 온 기타 약물을 이용한 치료에 앞서, 치료 후에, 또는 이러한 치료와 함께, 인간화 CD20 항체로 치료할 수 있다 (하기 병용 요법 참고). 한 실시양태에서, 기존에 질병 완화 항류마티스 약물을 이용한 치료에 실패하였고/하였거나 메토트렉세이트 단독 치료에 대해 부적당한 반응을 나타낸 바 있는 환자를 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체로 치료한다. 이러한 치료의 한 실시양태에서는, 환자에게 인간화 CD20 결합성 항체 단독 (1일 및 15일째에 1 g을 정맥내 주입함); CD20 결합성 항체 + 시클로포스파미드 (3일 및 17일째에 750 mg을 정맥내 주입함); 또는 CD20 결합성 항체 + 메토트렉세이트를 17일 치료 섭생으로 투여한다.

[0165] 신체는 RA 동안 종양 과사 인자 알파 (TNF α)를 생성시키기 때문에, TNF α 억제제가 이러한 질병에 대한 치료법으로서 사용되어 왔다. 그러나, TNF α 억제제, 예를 들어 에타네르셉트 (Etanercept) (ENBREL[®]), 인플릭시마브 (Infliximab) (REMICADE[®]) 및 아달리무마브 (Adalimumab) (HUMIRATM)는 감염, 심부전증 및 탈수초성과 같은 부작용을 유발시킬 수 있다. 따라서 한 실시양태에서, 인간화 CD20 결합성 항체 또는 그의 생물학적 기능적 단편은, 예를 들어 TNF α 억제제 약물 투여에 따른 상기 부작용의 발생 위험을 감소시키기 위해 RA 환자를 치료하거나 또는 독성 (예를 들어, 심장 독성)을 겪기 쉬운 것으로 간주되는 환자를 치료하기 위한 1차 요법으로서 유용하다. 인간화 CD20 결합성 항체 또는 그의 생물학적 기능적 단편은 또한, TNF α -억제제로 치료받은 적이 있었으나 이에 대해 비반응성이거나, TNF α -억제제에 대해 부적당한 반응을 나타내거나 (TNF-IR 환자) 또는 일시적인 반응 기간 후 질병 재발을 나타내거나, 또는 TNF α -억제제를 이용한 요법에 반응할 것으로 예상되지 않는 환자로 결정된, RA로 인해 고통받고 있는 대상체를 치료하는 방법에 유용하다. 한 실시양태에서, TNF-IR은 TNF α -억제제를 이용한 치료에 앞서, 저 용량, 예를 들어 100 mg 미만의 용량으로 치료한다.

[0166] RA에서의 치료 효능을 평가하기 위한 한 가지 방법은 미국 류마티스 협회 (ACR) 기준에 근거한 것인데, 이는 특히 부서지기 쉽고 팽윤된 관절 상의 개선율을 측정한다. RA 환자는 항체 치료하지 않았거나 (예를 들면, 치료 전의 기준선) 또는 플라시보 (위약)로 치료한 경우와 비교해서, 예를 들어 ACR 20 (20% 개선)으로 스코어링할 수 있다. 항체 치료 효능을 평가하기 위한 다른 방식에는 X선 스코어링, 예를 들어 골 침식 및 관절 공간 협소화와 같은 구조적 손상을 스코어링하는 데에 사용되어 온 샤프 X선 스코어가 포함된다. 치료 동안 또는 치료 후 일정 기간에 건강 평가 질문서 [HAQ] 스코어, AIMS 스코어, SF-36를 기준으로 하여 장애를 예방하거나 개선시키는 것에 관해 환자를 평가할 수도 있다. ACR 20 기준은 부서지기 쉬운 (통증있는) 관절 계수치와 팽윤된 관절 계수치 둘 다에 있어서의 20% 개선과, 5가지 부가의 조치 중의 적어도 3가지에 있어서 20% 개선을 포함할 수 있다:

1. 가시적 아날로그 규모에 의한 환자의 통증 평가 (VAS),
2. 질병 활성에 대한 환자의 포괄적인 평가 (VAS),
3. 질병 활성에 대한 의사의 포괄적인 평가 (VAS),
4. 건강 평가 질문서에 의해 측정된 환자의 자체 평가된 장애; 및
5. 급성 상 반응물 CRP 또는 ESR.

[0172] ACR 50 및 70은 유사하게 정의된다. 바람직하게는, ACR 스코어 20 이상, 바람직하게는 ACR 30 이상, 보다 바람직하게는 ACR 50 이상, 보다 더 바람직하게는 ACR 70 이상, 가장 바람직하게는 ACR 75 이상을 달성하기에 유효한 양의 본 발명의 CD20 결합성 항체를 환자에게 투여한다.

[0173] 건선성 관절염은 독특하면서도 별개의 방사선촬영 특징을 갖는다. 건선성 관절염의 경우, 관절 침식과 관절 공간 협소화는 또한, 샤프 스코어에 의해 평가할 수 있다. 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체를 사용하여 관절 손상을 예방할 뿐만 아니라 상기 장애의 병 징후와 증상을 저하시킬 수 있다.

[0174] 본 발명의 또 다른 국면은 치료 유효량의 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체를 포함하는 제약 조성물을, SLE 또는 루푸스 신염으로 인해 고통받고 있는 환자에게 투여함으로써 SLE 또는 루푸스 신염을 치료하는 방법이다. SLEDAI 스코어는 질병 활성의 수치적 정량화를 제공해준다. SLEDAI는 질병 활성과 상관이 있는 것으로 공지된 24가지 임상 및 실험실용 파라미터의 청량 지수이고, 수치 범위는 0 내지 103이다 [참고: Bryan Gescuk & John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" in Current Opinion in Rheumatology 2002, 14:515-521]. 기타 스코어링 방법에는 BILAG 스코어링이 포함된다. 이중 가닥 DNA에 대한 항체는 신장 발적 (renal flares) 및 루푸스의 기타 소견 (증상)을 유발시키는 것으로 여겨진다. 항체 치료를 받고 있는 환자를 대상으로 하여, 혈청 크레아티닌, 뇨단백 또는 뇨중 혈액 상의 상당하고도 재생 가능한 증가로서 정의되는 신장 발적 시간에 대해 모니터링할 수 있다. 다르게는, 또는 부가적으로, 환자를 대상으로 하여, 항핵 항체 및 이중 가닥 DNA에 대한 항체 수준을 모니터링할 수 있다. SLE에 대한 치료는 고 용량 코르티코스테로이드 및/또는 시클로포스파미드 (HDCC)를 포함한다. 본원에서, 성공적인 루푸스 치료는 발적을 저하시킬 수 있는데, 즉 발적 중증도 및/또는 다음 발적이 발생하기 까지의 시간을 감소시킬 것이다.

[0175] 척추관절병증은 강직성 척추염, 건선성 관절염 및 크론병을 포함한 관절 질환 군이다. 치료 성공은 입증된 환자 및 의사 포괄적 평가 측정 도구에 의해 결정할 수 있다.

[0176] 혈관염과 관련하여, 전신성 혈관염 환자의 대략 75%가 항-호중구 세포질성 항체를 갖고 있고, 소형/중간 크기의 혈관에 악영향을 미치는 3가지 질환, 즉 베게너 육아종증 (WG), 미세 다발성 혈관염 (MPA) 및 추르크-스트라우쓰 (CSS) [집합적으로 ANCA 관련 혈관염 (AAV)로서 공지됨] 중의 한 가지 질환에 해당된다.

[0177] 건선에 대한 치료 효능은 기준선 질환과 비교해서 의사의 포괄적 평가 (PGA) 변화 및 건선 부위 및 중증도 지수 (PASI) 스코어, 건선 증상 평가 (PSA)를 포함한, 상기 질병의 임상 징후 및 증상의 변화를 모니터링함으로써 평가한다. 본 발명의 인간화 CD20 결합성 항체 (예를 들어, hu2H7.v511)를 이용하여 치료한 건선 환자를 대상으로 하여, 특정 시점에 경험한 가려움 정도를 표시하기 위해 사용되어 온 가시적 아날로그 등급에 대해 치료 전 과정에 걸쳐 주기적으로 측정할 수 있다.

[0178] 환자는 치료용 항체를 처음 주입하는 것과 관련하여 주입 반응 또는 주입-관련 증상을 경험할 수도 있다. 이들 증상은 그 중증도가 다양하고, 일반적으로 의료 개입에 따라 가역적이다. 이들 증상에는 독감 유사 발열, 오한/경직, 오심, 두드러기, 두통, 기관지연축, 혈관부종이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 질병 치료 방법이 주입 반응을 최소화하는 것이 바람직할 것이다. 상기 부작용을 완화 또는 최소화하기 위해, 환자에게 초기 컨디셔닝 또는 관용화 용량의 항체를 투여한 다음, 치료 유효량을 투여할 수 있다. 컨디셔닝 용량은 치료 유효량 보다 더 낮아, 환자가 보다 고 투여량을 견딜 수 있도록 할 것이다.

[0179] 투여

[0180] 해당 분야의 전문의에게 잘 알려져 있는 투여와 관련된 요인들과 치료하고자 하는 적응증에 따라서, 본 발명의 항체를, 독성과 부작용은 최소화시키면서 상기 적응증을 치료하는데 효능이 있는 투여량으로 투여할 것이다. 목적하는 투여량은 질병 및 질병 중증도, 질병의 병기, 목적하는 B 세포 조정 수준 및 당해 분야의 전문의에게 친숙한 기타 요인들에 좌우될 수 있다.

[0181] 자가면역 질환을 치료하기 위해서는, 인간화 2H7 항체의 투여량을 조정함으로써, 개개 환자에게서 질병 및/또는 질환의 중증도에 따라서 B 세포 고갈 정도를 조정하는 것이 바람직할 수 있다. B 세포 고갈이 완전히 이루어질 수는 있지만, 반드시 완전히 이루어질 필요는 없다. 또한, 총 B 세포 고갈은 초기 치료 동안에 요망되지만, 후속 치료에서는 부분 고갈 만을 달성하도록 투여량을 조정할 수 있다. 한 실시양태에서는, B 세포 고갈이 20% 이상인데, 즉 치료 전의 기준선 수준과 비교해서 CD20 양성 B 세포의 80% 이하가 잔존한다. 기타 실시양태에서, B 세포 고갈은 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 그 초과이다. 바람직하게는, B 세포 고갈이 질병의 진행을 중지시키기에 충분하고, 보다 바람직하게는 치료 중인 특별한 질병의 징후 및 증상을 완화시키기에 충분하고, 보다 더 바람직하게는 질병을 치유하기에 충분하다.

[0182] 본 발명의 항체는 각종 투여 빈도로 투여할 수 있는데, 예를 들어 매주, 격주, 매월 등으로 투여할 수 있다. 한 가지 예에서, 투여 빈도는 6개월 마다 1회분을 투여하거나, 또는 6개월 마다 2주 간격을 두고 2회분을 투여하는 것이다. 주사하고자 하는 항체 용액의 용적은 1회 주사당 약 0.1 내지 약 3 ml의 범위, 보다 바람직하게 약 0.5 ml 내지 약 1.5 ml의 범위일 수 있다. 1회 주사당 투여되는 인간화 2H7 항체의 총 양은 주사당 약 150 mg 이하일 수 있다. 목적하는 용량을 달성하기 위해 수 차례 주사할 수 있다.

[0183] 한 가지 이상의 현재 요법이 유효하지 못하였거나, 불량한 수준으로 면역관용되었거나 또는 금기를 나타낸, 자가면역 질환 또는 B 세포 악성 종양이 있는 환자는 본 발명의 투여 섭생을 이용하여 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 종양 괴사 인자 (TNF) 억제제 요법 또는 질병 완화 항류마티스 약물 (DMARD) 요법에 대해 부적당한 반응을 나타낸 적이 있는 RA 환자에 대한 본 발명의 치료 방법을 고려한다.

[0184] "만성" 투여는 작용제(들)를 급성 방식과는 달리 지속적인 방식으로 투여하여, 초기 치료 효과 (활성)가 장기간 유지되도록 하는 것을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 수행하지는 않지만, 사실상 순환식 치료이다.

[0185] 병용 요법

[0186] 상기 언급된 B 세포 신생물을 치료하는 데에 있어서, 환자를 다중 약물 섭생에서의 화학요법제와 같은 한 가지 이상의 치료제와 연계해서 본 발명의 인간화 2H7 항체로 치료할 수 있다. 인간화 2H7 항체는 이러한 화학요법제와 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여하거나, 또는 기타 요법과의 비-반응성 후에 투여할 수 있다. 림프종 치료를 위한 표준 화학요법에는 시클로포스파미드, 시타라빈, 멜팔란 및 미톡산트론 + 멜팔란이 포함될 수 있다. CHOP는 비-호지킨 림프종을 치료하기 위한 가장 흔한 화학요법 섭생 중의 하나이다. 다음은 CHOP 섭생에 사용된 약물이다: 시클로포스파미드 (브랜드명 시톡산, 네오사르); 아드리아마이신 (독소루비신/히드록시독소루비신); 빙크리스틴 (온코빈: Oncovin); 및 프레드니솔론 (종종 멜타손 또는 오라손으로 지칭됨). 특별한 실시양태에서는, CD20 결합성 항체를, 이를 필요로 하는 환자에게 다음 화학요법제들 중의 하나 이상과 병용해서 투여한다: 독소루비신, 시클로포스파미드, 빙크리스틴 및 프레드니솔론. 구체적 실시양태에서는, 림프종 (예를 들어, 비호지킨 림프종)으로 인해 고통받고 있는 환자를 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레드니손) 요법과 연계해서 본 발명의 인간화 2H7 항체로 치료한다. 또 다른 실시양태에서는, 암 환자를 CVP (시클로포스파미드, 빙크리스틴 및 프레드니손) 화학요법과 병용해서 본 발명의 인간화 2H7 CD20 결합성 항체로 치료할 수 있다. 구체적 실시양태에서는, CD20-양성 NHL로 인해 고통받고 있는 환자에게 인간화 2H7.v511 또는 v114를 CVP와 연계해서, 예를 들어 8주기 동안 3주 마다 투여한다. CLL 치료법의 구체적 실시양태에서는, hu2H7.v511 항체를 플루다라빈 및 시톡산 중의 하나 또는 둘 다를 이용한 화학요법과 연계해서 투여한다.

[0187] "화학요법제"는 암을 치료하는 데에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 CYTOXAN®

시클로포스파미드; 알킬 솔포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로솔판 및 피포솔판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸롤로멜라민; TLK 286 (TELCYTA™); 아세토게닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 멜타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, MARINOL®)

); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베타루린산; 캄프토테신 [합성적으로 유사한 토포테칸 (HYCAMTIN®

), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR®

), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함]; 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님무스틴; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 항생제, 예를 들어 엔디이네 (enediyne) 항생제, 예를 들면 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 1I 및 칼리케아미신 오메가I1 [참고: Agnew, *Chem Int. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994)], 및 안트라시클린, 예

를 들어 안나마이신, AD 32, 알카루비신, 다우노루비신, 텍스라족산, DX-52-1, 에피루비신, GPX-100, 이다루비신, KRN5500, 메노가릴, 디네미신 (디네미신 A 포함), 에스페라미신, 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색단 백질 엔디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN®

독소루비신 [모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 리포솜성 독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함], 에소루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예를 들어, 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 및 조루비신; 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토락톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 및 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들어 폴린산 (류코보린); 아세글라톤; 항염산염 항종양제, 예를 들어 ALIMTA®

, LY231514 폐메트렉세드, 디히드로폴레이트 환원효소 억제제, 예를 들어 메토트렉세이트, 항대사제, 예를 들어 5-플루오로우라실 (5-FU) 및 그의 프로-드럭, 예를 들면 UFT, S-1 및 카페시타빈, 및 티미딜레이트 합성효소 억제제 및 글리신아미드 리보뉴클레오티드 포밀트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어 랄티트렉세드 (TOMUDEX™, TDX); 디히드로피리미딘 데히드로게나제의 억제제, 예를 들어 에닐우라실; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®

다당류 복합체 (공급처: JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아준산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우례탄; 빈데신 (ELDISINE®

, FILDESIN®

); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드 및 탁산, 예를 들어 TAXOL®

파클리탁셀 (공급처: Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ 파클리탁셀의 크램포르-무함유의 알부민-공학 처리시킨 나노입자 제제 (공급처: American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), 및 TAXOTERE®

독세탁셀 (공급처: Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 쟈시타빈 (GEMZAR®); 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 백금; 백금 유사체 또는 백금-기재 유사체, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®

); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONCOVIN®

); 빈카 알카로이드; 비노렐빈 (NAVELBINE®

); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예를 들어, 레티노산); 및 상기 언급된 제제의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라 상기 제제의 2가지 이상 병용물, 예를 들어 CHOP (이는 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 병용 요법에 대한 약어이다), 및 FOLFOX (이는 5-FU 및 류코보린과 병용된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 이용한 치료 섭생에 대한 약어이다)이 포함된다.

[0188]

상기 정의에는 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제시키는 작용을 하는 항호르몬제, 예를 들어 항에스트로겐제 및 선택적 에스트로겐 수용체 조정제 (SERM)가 포함되는데, 이에는 예를 들어 타목시펜 (NOLVADEX®)

타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON®

토레미펜; 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE®

메게스트롤 아세테이트, AROMASIN®

엑세메스탄, 포르메스타니에, 파드로졸, RIVISOR®

보로졸, FEMARA®

레트로졸 및 ARIMIDEX®

아나스트로졸; 및 항안드로겐제, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상한 세포 증식에 밀접한 영향을 미치는 신호 전달 경로에 있어 유전자, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드; 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN®

백신, LEUVECTIN®

백신 및 VAXID®

백신; PROLEUKIN®

r IL-2; LURTOTECAN®

토포이소미라제 1 억제제; ABARELIX®

rmRH; 및 이들의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0189]

부가적으로, hu2H7 항체 및 그의 기능적 단편은 항종양 혈관형성제, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 길항제와 연계해서 CD20 발현성 B 세포 신생물 (예를 들어, NHL)을 치료하는 데에 사용할 수 있다. "항혈관형성제" 또는 "혈관형성 억제제"는 혈관형성, 혈관생성, 또는 바람직하지 못한 혈관 침투성을 직접 또는 간접적으로 억제시키는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 그의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 항혈관형성제는 상기 정의된 바와 같은 혈관형성제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어 VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체에 대한 항체, VEGF 수용체 신호 전달을 차단시키는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668)이다. "VEGF 길항제"는 VEGF 활성 (이에는 하나 이상의 VEGF 수용체와의 결합성이 포함된다)을 중화, 차단, 억제, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 한 실시양태에서, 이러한 B 세포 신생물로 인해 고통받고 있는 환자는 아바스틴 [Avastin®]

(bevacizumab; 공급처: Genentech)]과 연계해서 2H7.v511 또는 2H7.v114로 치료한다. "rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴®"

"으로서 공지되기도 한 항-VEGF 항체 "베바시주마브 (BV)"는 문헌 [참고: Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)]에 따라서 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다.

[0190]

hu2H7 항체 및 그의 기능적 단편은 TNF 계열의 시토카인 구성원, 예를 들어 Apo-2 리간드 (Apo2L) (TRAIL로서 지칭되기도 함)와 연계해서 CD20 발현성 B 세포 신생물을 치료하는 방법에 유용하다. 전장 천연 서열 인간 Apo-2 리간드는 281개 아미노산 길이인, 종양 괴사 인자 계열의 시토카인의 유형 II 막관통 단백질이다. 가용

성 형태의 Apo-2 리간드, 예를 들어 세포외 도메인 (ECD) 또는 그의 일부를 포함하는 것이 포유류 암 세포에서의 아폽토시스 활성을 포함한 각종 활성을 지니고 있는 것으로 밝혀졌다. Apo2L/TRAIL (WO 97/01633 및 WO 97/25428에 기재됨)은 전장 Apo-2L 단백질의 아미노산 114-281을 포함하는, ECD의 단편인 가용성 인간 단백질이다.

[0191] 상기 언급된 자가면역 질환 또는 자가면역 관련 질환을 치료하는 데에 있어서, 환자는 하나 이상의 hu2H7 항체를 다중 약물 섭생에서와 같이 제2의 치료제, 예를 들어 면역억제제와 연계해서 치료할 수 있다. hu2H7 항체는 면역억제제와 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여할 수 있거나 또는 기타 요법을 이용한 경우의 비-반응성시 투여할 수 있다. 면역억제제는 당해 분야에서 제시된 바와 동일하거나 적은 투여량으로 투여할 수 있다. 바람직한 보조 면역억제제는 치료하고자 하는 장애의 유형 뿐만 아니라 환자의 병력을 포함한 많은 요인들에 좌우될 것이다.

[0192] 보조 요법을 위해 본원에 사용된 바와 같은 "면역억제제"는 환자의 면역계를 억제하거나 은폐시키는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 이러한 작용제에는 시토카인 생성을 억제하거나, 자기 항원 발현을 하향 조절하거나 억제시키거나, 또는 MHC 항원을 은폐시키는 물질이 포함될 것이다. 이러한 작용제의 예에는 스테로이드, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드, 예를 들면 프레드니손, 메틸프레드니솔론 및 텍사메타손; 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 [참고: 미국 특허 제4,664,077호], 아자티오프린 (또는 아자티오프린에 대한 부작용이 있는 경우에는, 시클로포스파미드); 브로모크립틴; 글루타르알데히드 (이는 미국 특허 제4,120,649호에 기재된 바와 같이, MHC 항원을 은폐시킨다); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-개체특이형 항체; 시클로스포린 A; 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제 (항-인터페론- γ , - β 또는 - α 항체 포함); 항종양 괴사 인자- α 항체; 항종양 괴사 인자- β 항체; 항-인터루킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체; 항-L3T4 항체; 이종 항-림프구 글로불린; 범 (pan)-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합성 도메인을 함유하는 가용성 웨티드 [참고: 1990년 7 월 26일자로 공개된 WO 90/08187]; 스트렙토카니제; TGF- β ; 스트렙토도나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 테옥시스페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 [참고: 미국 특허 제5,114,721호]; T-세포 수용체 단편 [참고: Offner et al., *Science* 251:430-432 (1991); WO 90/11294; and WO91/01133]; 및 T 세포 수용체 항체 [참고: EP 340,109], 예를 들면 T10B9가 포함된다.

[0193] 류마티스 관절염을 치료하기 위해, 환자를 다음 약물을 중의 한 가지 이상과 연계해서, 본 발명의 CD20 결합성 항체로 치료할 수 있다: DMARD (질병 완화 항류마티스 약물) (예를 들어, 메토트렉세이트), NSAID 또는 NSAID (비)-스테로이드계 소염 약물), 면역억제제 [예를 들어, 아자티오프린; 미코페놀레이트 모페틸 (CellCept[®] ; 공급처: Roche)], 진통제, 글루코코르티코스테로이드, 시클로포스파미드, HUMIRA[™] [아달리무마브; 공급처: Abbott Laboratories], ARAVA[®]

(레플루노미드: leflunomide), REMICADE[®]

[인플릭시마브 (infliximab); 공급처: Centocor Inc., of Malvern, Pa], ENBREL[®]

[에타네르셉트 (etanercept); 공급처: Immunex, WA], ACTEMRA[®]

[토실리주마브 (tocilizumab); 공급처: Roche, Switzerland], COX-2 억제제. RA에 흔히 사용되는 DMARD는 히드록시클로로퀸, 술파살라진, 메토트렉세이트, 레플루노미드, 에타네르셉트, 인플릭시마브, 아자티오프린, D-페니실라민, 금 (경구), 금 (근육내), 미노시클린, 시클로스포린, 스타필로코쿠스성 단백질 A 면역흡착제이다.

[0194] 아달리무마브는 TNF α 와 결합하는 인간 모노클로날 항체이다. 인플릭시마브는 TNF α 와 결합하는 키메라 마우스-인간 모노클로날 항체이다. 이는 RA 및 크론병을 치료하도록 처방된 면역억제성 약물이다. 인플릭시마브는 심부전증 및 결핵을 포함한 감염증 뿐만 아니라 MS를 유발시키는 탈수초성과 같은 치명적인 반응과 연관이 있었다. 악템라 [Actemra (tocilizumab)]는 인간화 항-인간 인터루킨-6 (IL-6) 수용체이다.

[0195] 에타네르셉트는 인간 IgG1의 Fc 부분에 연결된 인간 75 kD (p75) 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR)의 세포외 리간드 결합 부분으로 이루어진 "면역부착인자" 융합 단백질이다. 에타네르셉트 (ENBREL[®])

)는 활동성 RA의 요법을 위해 US에서 승인된 주사용 약물이다. 에타네르셉트는 TNF α 와 결합하고 관절 및 혈액으로부터 대부분의 TNF α 를 제거시키는 작용을 함으로써, TNF α 가 염증 및 기타 류마티스 관절염 증상을 증진시키지 못하게 한다. 상기 약물은 중증의 감염증 및 폐렴증, 신경계 장애, 예를 들어 다발성 경화증 (MS)을 포함

한 부작용과 연관이 있어 왔다 [참고: 예를 들어, www.remicade-infliximab.com/pages/enbrel_embrel.html].

[0196] RA의 통상적인 치료법에 대해서는, 예를 들어 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheumatism* 46 (2): 328-346 (February, 2002)]. 구체적 실시양태에서, RA 환자는 메토트렉세이트 (MTX)와 연계해서 본 발명의 hu2H7 CD20 항체로 치료한다. MTX 투여량의 한 예는 1주당 약 7.5 내지 25 mg/kg이다. MTX는 경구 및 피하 투여할 수 있다.

[0197] 한 가지 예에서는, 환자에게 CD20 항체를 주입하기 30분 전에 메틸프레드니솔론 100 mg을 정맥내 투여하는 것과 2 내지 7일째에 프레드니손 60 mg을 경구 투여것, 8 내지 14일째에 30 mg을 경구 투여하는 것 (16일째에는 기준선 용량으로 돌아온다)으로 이루어진 코르티코스테로이드 섭생과 함께, MTX (경구 또는 비경구 투여당 매주 10 내지 25 mg)를 동시에 투여한다. 환자에게 또한, 엽산염 (5 mg/주)을 1회분 용량으로서 또는 수 회분으로 나누어서 투여할 수 있다. 환자에게는 치료 기간 내내 어떠한 배경 코르티코스테로이드 (10 mg/일 프레드니손 또는 등가물)도 지속적으로 임의 투여한다.

[0198] 강직성 척추염, 건선성 관절염 및 크론병을 치료하기 위해서는, 환자를, 예를 들어 Remicade®

(인플릭시마브; 공급처: Centocor Inc., of Malvern, Pa.), ENBREL (에타네르셉트; 공급처: Immunex, WA)와 연계해서, 본 발명의 CD20 결합성 항체로 치료할 수 있다.

[0199] SLE에 대한 치료에는 CD20 항체와 고 용량 코르티코스테로이드 및/또는 시클로포스파미드 (HDCC)의 병용 요법이 포함된다. SLE, AAV 및 NMO로 고통받고 있는 환자는 다음 약물과 병용해서 본 발명의 2H7 항체로 치료할 수 있다: 코르티코스테로이드, NSAID, 진통제, COX-2 억제제, 글루코코르티코스테로이드, 통상적인 DMARD (예를 들어, 메토트렉세이트, 슬파살라진, 히드록시클로로퀸, 레플루노미드), 생물학적 DMARD, 예를 들어 항-Blys [예를 들어, 벨리무마브 (belimumab)], 항-IL6R, 예를 들어 토실리주마브; CTLA4-Ig (아바타셉트: abatacept), 항-CD22 (예를 들어, 에프라투주마브: epratuzumab), 면역억제제 [예를 들어, 아자티오프린; 미코페놀레이트 모페틸 (CellCept®

; 공급처: Roche)], 및 세포독성제 (예를 들어, 시클로포스파미드).

[0200] 건선을 치료하기 위해서는, 환자에게 인간화 2H7 항체를, 국소 치료, 예를 들어 국소 스테로이드, 안트랄린, 칼시포트리엔, 클로베타솔 및 타자로텐과 연계하거나 또는 메토트렉세이트, 레티노이드, 시클로스포린, PUVA 및 UVB 요법과 함께 투여할 수 있다. 한 실시양태에서는, 건선 환자를 시클로스포린과 순차적으로 또는 동시에 인간화 2H7 항체로 치료한다.

[0201] 독성을 최소화하기 위해, 전통적인 전신 요법을 본 발명의 투여량의 hu2H7 CD20 결합성 항체 조성물과 함께, 합리적, 순차적, 조합적 또는 간헐적 치료 섭생, 또는 보다 저 투여량 병용 섭생으로 투여할 수 있다.

제조품 및 키트

[0203] 본 발명의 또 다른 실시양태는 자가면역 질환 및 관련 질환 및 CD20 양성 암, 예를 들어 비호지킨 림프종을 치료하는 데에 유용한 본 발명의 제제를 포함하는 제조품이다. 본 발명의 제조품은 용기, 및 이러한 용기와 연합되거나 그 위의 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 당해 제제 또는 조성물 중의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 hu2H7 항체이고, 이러한 항체는 투여 중인 상기 언급된 투여량을 전달시키기 위한 양으로 주사기와 같은 용기에 존재한다. hu2H7의 농도 범위는 10 mg/ml 내지 200 mg/ml일 것이고, 30 내지 150 mg/ml 또는 100 내지 150 mg/ml일 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입물을 해당 조성물이 특별한 질환을 치료하기 위해 사용된다는 것을 표시해준다. 표지 또는 패키지 삽입물은 항체 조성물을 환자에게 투여하기 위한 지시사항을 추가로 포함할 것이다.

[0204] 패키지 삽입물은 적응증, 활용, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 치료 제품의 사용과 관련한 경고에 관한 정보를 함유하고 있는, 치료 제품의 상업적 패키지에 통상적으로 포함되는 지시사항을 지칭한다. 한 실시양태에서, 패키지 삽입물은 해당 조성물이 비호지킨 림프종을 치료하기 위해 사용된다는 것을 표시해준다.

[0205] 부가적으로, 본 발명의 제조품은 제약상 허용 가능한 완충액, 예를 들어 주사용 수 (WFI), 제균성 주사용 수 (BWF), 인산염 완충 식염수, 링거액, 염화나트륨 (0.9%) 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들어 기타 완충액, 희석제, 충진제, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수도 있다.

[0206] [실험 실시예]

[0207] 실시예 1rhuMAb 2H7에 대한 초기 피하 제제

rhuMAb 2H7에 대한 고 농도 피하 제제 (150 mg/ml)을 개발하였다. 이러한 제제는 150 mg/ml 2H7, 30 mM 나트륨 아세테이트; 7% 트레할로스 이수화물; 0.03% 폴리솔베이트 20 (pH 5.3)을 포함한다. 상기 제제는 권장되는 조건 하에 최종 바이알 저장시 장기간 안정적이다. 이러한 물질을 시노몰구스 원숭이에게 피하 주사 투여하면, 주사 부위에서 중증의 염증이 발생하고, 생체이용률도 낮다 (약 30%). 이들 동물에게서 피하 층에 경도 내지 중간 수준의 대식세포 침윤물이 관찰되었다. 자극의 원인은 외래 신체 물질 (즉, 2H7 시험 물질)에서 비롯되었다. 해당 의약품을 주사 부위에 노출시켰다고 모의 실험한 조건 하에 상기 제제를 시험한 결과, 단백질이 생리학적 조건 하에 상당히 응집된 것으로 확인되었는데 (도 1), 이는 시노몰구스 원숭이에게서 관찰된 염증 발생을 입증해준다. 이와 같이 관찰된 침전은 pH 이동에 이은 염석 효과와 일치할 수 있다.

[0210] 실시예 2피하 주사의 생리학적 조건 하에 거대분자 응집을 시험하기 위한 시험관내 투석 방법

피하 주사 동안 직면하게 된 생리학적 조건 하에서 2H7 응집을 감소시킬 수 있는 상이한 부형제의 능력을 시험하기 위한 시험관내 투석 방법이 개발되었다. 간질성 유체를 모의 실험하기 위해 상기 모델용의 변형된 PBS 용액 ("방출 매질")을 개발하였다. 이러한 시험관내 시스템을 사용하여 2H7 응집을 지연시키는 데에 있어서의 당, 중합체, 계면활성제 및 아미노산의 효과를 평가하였다. 이어서, 시험관 내에서 개선된 생성물을 방출을 나타낸 후보 제제를 대상으로 하여, 이러한 개선이 생체 내에서의 염증 감소에 상응하는지를 결정하기 위해 생체 내에서 시험하였다 (래트 피하 모델; 실시예 3 참고).

시험관내 투석 모델의 설정이 도 2에 도시되어 있다. 250 ml 용 유리 항아리에 220 ml 방출 매질 (167 mM 나트륨, 140 mM 염화물, 17 mM 인산염, 4 mM 칼륨)을 37°C 하에 충전시켰다. 6 cm 길이의 투석용 투빙 [Spectra Por 1 Million Molecular Weight Cut Off (MWCO) PVDF 투석용 투빙; 12 mm 직경]을 정제 수에 침지시켰다. 상기 투석용 투빙의 한쪽 말단을 클램핑하고, 이에 대략 1 ml의 시험 샘플 (시험 부형제가 존재하는 2H7)을 충전시켰다. 과량의 공기를 제거하고, 투빙의 반대편 말단을 클램핑하여 항아리를 밀봉시켰다. 이와 같이 충전된 봉지를, 방출 매질을 함유하는 250 ml 용 유리 항아리에 가하고, 항아리를 일정하게 교반시키면서 37°C 하에 놓아두었다. 방출 매질의 500 μ l 샘플을 2.5, 6, 12, 24, 33 및 48시간 후에 꺼냈다. 방출 매질에 존재하는 단백질의 양 및 샘플의 혼탁도를 UV 분광 스캔으로 측정하였다. 또한, 투석용 투빙 내부에 있는 용액과 방출 매질을 가시적으로 검사하여 침전에 관하여 알아보았다.

[0214] 시험 부형제는 다음과 같은 경우에 시험관내 응집 연구에서 허용 가능한 것으로 간주되었다:

- 시험 부형제를 이용한 경우의 2H7의 누적 방출량이 음성 대조군 (본래의 2H7 제제 - 150 mg/ml 2H7, 30 mM 나트륨 아세테이트; 7% 트레할로스 이수화물; 0.03% 폴리솔베이트 20, pH 5.3) 보다 더 많은 경우 (이는 개선된 2H7 특징을 표시해준다).

- 양성 대조군 (rhuMAb 항-CD11a, RaptivaTM로서 공지됨, 피하 투여된 인간화 항-CD11a 항체)는 침전을 전혀 나타내지 않았고, 음성 대조군 보다 더 많은 방출을 나타내는 경우.

- 2H7의 침전이 감소되거나 없어진 경우.

- 방출 매질의 혼탁도가 감소된 경우.

이어서, 허용 기준을 충족시킨 후보를 생체내 래트 모델에서 시험하여, 시험관 내에서 응집을 지연시키는 것이 생체 내에서 염증을 감소시키는 것과 상관이 있었는지를 결정하였다.

시험관내 결과:

시험관내 투석 방법에서 연구용 대조군의 전형적인 방출 프로파일이 도 3에 도시되어 있다. 이러한 모델 대조군은 용이하게 응집하지 않았던 단백질 (rhuMAb CD11a)의 방출 및 생리학적 조건 하에 전형적으로 응집하였던 단백질 (본래의 2H7)의 방출을 일괄하여 다루어 선택하였다. 두 방출 곡선 간의 면적은 대조군과 비교해서 응집을 지연시킬 수 있는 시험 부형제의 상대적 능력을 측정해준다.

본래의 2H7 제제의 누적 방출율은 낮다 (< 30%). 방출 매질의 혼탁도 증가가 관찰되었는데, 이는 2H7이 투석

봉지로부터 방출 매질 내로 방출되었기 때문인데, 이는 상기 물질이 해당 환경에서 응집 중이었다는 사실을 표시한다. 투석 봉지 내부에서의 광범위한 엉김이 24시간 이내에 관찰되었고, 이는 2H7 농도가 연구를 시작할 무렵의 150 mg/ml에서 48시간 연구가 끝날 무렵 4 내지 5 mg/ml로 현저하게 감소한 사실과 부합된다. 이를 관찰 결과 모두는 2H7이 생리학적 조건 하에 용이하게 응집된다는 사실을 나타낸다. 이러한 행동은 본래의 2H7 제제를 37°C 하에 유리 바이알 내에 저장한 경우에는 관찰되지 않는다.

[0223] 이와는 달리, rhuMAb CD11a는 투석 봉지로부터 방출 매질 내로 신속하게 방출된다. 방출 매질은 연구 기간 내내 청정한 상태로 유지되었고 투석 봉지 내부에서는 엉김이 전혀 관찰되지 않았는데, 이는 rhuMAb CD11a가 생리학적 조건 하에서 응집되지 않고 상기 모델에 대한 대조군으로서 관계가 있다는 사실을 나타낸다. 표 3에는 방출된 단백질 비율, 방출 매질 혼탁도 및 엉김의 존재 여부가 요약되어 있다.

표 3

대조군	시간 (시)	방출된 누적 단백질 %	방출 매질의 혼탁도 OD 350 nm	투석 봉지 내부에서의 엉김
rhuMAb CD11a	0	0	0.001	없음
	48	83	0.03	없음
2H7 본래의	0	0	0.02	없음
	48	28	0.37	있음

[0224]

실시예 3거대분자 응집을 시험하기 위한 생체내 래트 피하 모델

[0227] 래트 피하 모델은 피하 염증의 형질에 있어서의 유사성에 기초한 관련 모델이다. 본래의 2H7 제제를 투여한 래트의 염증 반응은 시노몰구스 원숭이에게서 관찰된 염증 반응과 일치하였다 (실시예 1 참고). 2H7을 주사한 래트 피부 박편을 대상으로 한 인간 면역글로불린에 대한 면역조직화학 염색은 양성이었는데, 이는 염증 부위에 항체가 존재하거나 영속된다는 사실을 나타내고, 이는 시험 제품의 침전으로 인해 주사 부위에서 염증이 유발되었다는 이론을 뒷받침해준다.

[0228] 생체내 래트 스크리닝 검정을 다음과 같이 수행하였다:

[0229] 각각의 시험 또는 대조군 제제 (0.25 ml)을 피하 투여하였다. 투여 후 72시간째에 해당 동물을 부검하였다. 주사 부위에서의 피부 박편을 횡절단하고, 포르말린에 고정시킨 다음, 염증을 저하시키는 데에 있어서의 시험 부형제의 효과를 조직학적으로 결정하였다. 이러한 조직학적 박편에 대해 다음과 같이 염증 스코어를 할당하였다:

[0230] +/-: 최소/약간의 염증

[0231] 1: 경도의 염증

[0232] 2: 중간 수준의 염증

[0233] 3: 중증.

[0234] 육아종의 존재를 병리학적으로 결정하였다. 주사 부위로부터 조직을 박편으로 만들고, 염색한 다음, 육아종의 존재 또는 부재를 알아보기 위해 광 현미경으로 관찰하였다.

[0235] 생체내 래트 모델에 대한 허용 기준은 (1) rhuMAb CD11a (음성 대조군)과 거의 동등한 수준의 염증 및 (2) 주사 부위에서의 육아종 부재였다.

실시예 42H7의 응집을 감소시킬 수 있는 계면활성제 및 기타 부가제의 능력

[0238] 거대분자의 응집을 저연시키기 위해 계면활성제가 흔히 사용되고 있다. 2H7의 응집 및 엉김을 감소시킬 수 있는 계면활성제의 능력은 실시예 2에 기재된 시험관내 모델을 이용하여 평가하였다. 시험된 계면활성제는 일정 범위의 친수성-친지성 벨런스 (HLB)를 포함한다. 폴리솔베이트 20, 폴록사며 및 스펜 20 및 80 계면활성제를 부가하는 것이 본래의 2H7 제제와 비교해서 2H7 방출을 상당해 개선시키지 못하였다. 폴리솔베이트 80의 경우

에 시험관 내에서 2H7 방출에 관한 적당한 수준의 개선이 관찰되었지만, 시험된 기타 어떠한 계면활성제의 경우에도 2H7 방출 상의 상당한 개선이 관찰되지 않았다 (표 4 참고). 그러나, 모든 경우에 있어서 투석 봉지 내부에서의 엉김이 관찰되었다 (표 4). 따라서, 계면활성제가 단백질 응집을 감소시키기 위해 전통적으로 사용되고 있긴 하지만, 이는 시험관내 모델에서 2H7의 응집을 자연시키는 데에 있어서 유효하지 못한 것으로 밝혀졌다.

표 4

계면활성제 + 2H7	방출된 단백질 % (T=48 hrs)	HLB	투석 봉지 내부에서의 엉김
2H7 본래의 (대조군)	31	N/A	있음
10% 폴록사며	15	>28	있음
0.2% 폴리솔베이트 80	59	15	있음
0.05% 스펜 80	24	8.6	있음
0.02% 스펜 80	24	8.6	있음
0.05% 스펜 80	33	4.3	있음
0.02% 스펜 80	33	4.3	있음
rhuMAb CD11a (대조군)	100	N/A	없음

[0239]

[0240] 응집 및 엉김을 자연시키는 것에 대한 텍스트란 (다당류), PEG 4000 (중합체), 아르기닌 (아미노산) 및 감마 시클로텍스트란의 부가 효과를 또한 평가하였고, 그 결과가 표 5 내지 7에 요약되어 있다. 이들 부가제 중의 어느 것을 이용한 경우에도 유의한 개선이 관찰되지 않았다.

표 5

시험 물질 + 2H7	방출된 단백질 % (T=48 hrs)	투석 봉지 내부에서의 엉김
2H7 본래의 (대조군)	58	PBS 혼탁되지 않음
10% 70 KD 텍스트란	47	PBS 혼탁되지 않음
10% 2,000 KD 텍스트란	38	PBS 혼탁이 있음 (1/2)
rhuMAb CD11a (대조군)	89	없음

[0241]

표 6

시험 물질 + 2H7	방출된 단백질 % (T=48 hrs)	투석 봉지 내부에서의 엉김
2H7 본래의 (대조군)	22	있음
200 mM 아르기닌 글루타메이트	35	있음 (1/2)
100 mM 아르기닌 숙시네이트	36	있음
100 mM 아르기닌 숙시네이트 및 10% HP 감마	25	있음
10% PEG 4000	28	있음
rhuMAb CD11a (대조군)	61	없음

[0242]

표 7

시험 물질 + 2H7	방출된 단백질 % (T=48 hrs)	투석 봉지 내부에서의 영김
2H7 본래의 (대조군)	13	있음
5% 감마 시클로덱스트린	20	있음
10% 감마 시클로덱스트린	2	있음
rhuMAb CD11a (대조군)	76	없음

[0243]

실시예 52H7의 응집에 대한 시클로덱스트린의 효과

[0246] 시험관내 모델에서 2H7의 응집에 대한 시클로덱스트린의 효과를 시험하였다. 사용된 물질은 다음과 같다:

[0247] ● 술포-부틸 에테르 베타 시클로덱스트린, 나트륨 염 [공급처: Cydex, Inc., Captisol Research Grade]

[0248] ● 히드록시프로필-감마 시클로덱스트린 [공급처: Cyclodextrin Technologies Development, Inc., Trappsol Pharmaceutical Grade]

[0249] ● 히드록시프로필-베타 시클로덱스트린 [공급처: Cyclodextrin Technologies Development, Inc., Trappsol Pharmaceutical Grade].

[0250] 2% 내지 9% 술포-부틸 에테르 (SBE) 및 5% 내지 20% 히드록시프로필 감마 (HP-감마) 시클로덱스트린을 이용하여 초기 연구를 수행하였다. SBE (도 4) 및 HP-감마 (도 5) 시클로덱스트린을 부가하는 것은 둘 다, 본래의 2H7 제제 대조군과 비교해서 100 mg/ml 2H7의 시험관내 방출을 상당히 개선시켜 주었다 (도 3, 표 3). SBE 제제가 수반된 투석 봉지에서는 영김이 덜 관찰되었지만, 봉지 외부에 있는 용액은 단백질이 매질 내로 방출됨에 따라 점차적으로 유백색이 되었다. HP-감마 제제는 응집을 감소시키는 데에 있어서 더 유효하였다. 투석 봉지 내부에서는 단지 소량의 영김만이 있었고, 봉지 외부에 있는 용액은 연구 기간 내내 청정한 상태로 유지되었다. 전반적으로, 시클로덱스트린을 부가하는 것이 생리학적 조건 하에서 2H7의 응집을 억제시키는 데에 도움을 주었다.

[0251] 이러한 놀라운 결과를 기준으로 하여, 히드록시 프로필 베타 (HP-베타) 시클로덱스트린을 시험관내 투석 모델에서 평가하여 2H7의 응집 행동에 대한 상이한 치환 군의 강한 영향력을 결정하였다. 5% 내지 20% 농도 범위의 HP-베타 시클로덱스트린을 평가하였다 (도 6). 방출된 단백질의 비율은 본래의 2H7 제제와 비교해서 개선되었지만, rhuMAb CD11a 대조군의 경우 보다는 덜하였다. 단백질이 방출 매질 내로 방출됨에 따라, 이러한 방출 매질은 유백색이 되었고, 37°C 하에 24시간 항온 배양한 후에는 투석 봉지 내부에서 영김이 나타났다. HP-베타 시클로덱스트린을 부가하는 것이 2H7의 응집을 감소시키는 데에 있어서 유효하였지만, HP-감마 시클로덱스트린 보다 정량적으로 덜 유효한 것으로 여겨졌다 (도 5).

[0252] HP-감마 시클로덱스트린과 아르기닌 숙시네이트의 조합물을 평가하여 2H7의 응집을 감소시키는 데에 있어서 부가 효과가 있었는지를 결정하였다. 4가지 상이한 비의 아르기닌 숙시네이트 대 HP-감마 시클로덱스트린을 100 mg/ml 2H7과 함께 시험하였다 (도 7). 모든 시험 군에서, 본래의 2H7 제제 대조군과 비교해서 2H7 방출 상의 개선이 관찰되었다. 100 mM 아르기닌 숙시네이트/10% HP-감마 시클로덱스트린 및 50 mM 아르기닌 숙시네이트/15% HP-감마 시클로덱스트린 제제는 매질 내로의 방출 후에 가장 낮은 혼탁도를 나타내었고, 본래의 2H7 제제 대조군과 비교해서 투석 봉지 내에서의 영김도 덜하였다.

실시예 6생체내 래트 피하 모델에서 염증에 대한 시클로덱스트린의 효과

[0255] 이어서, 시험관내 연구에서 상당한 개선을 나타낸 HP-감마 및 HP-베타 시클로덱스트린을 함유하는 항체 제제를 생체내 래트 피하 모델에서 시험하였다. 본 연구의 목적은 시험관내 생리학적 조건 하에 2H7의 응집을 없애는 것이 주사 부위에서의 염증 저하로 해석될 수 있는지를 결정하는 것이었다. 이러한 동물 모델에 대한 성공 기준은 (1) rhuMAb CD11a 연구 대조군과 비교해서 시험 제제에서의 거의 동등한 수준의 낮은 염증 및 (2) 주사 부

위에서의 육아종 부재였다.

[0256]

HP-베타 시클로렉스트린 제제에 대한 조직-병리학적 결과에 관한 요약이 표 8에 제시되어 있다. 음성 대조군인 rhuMAb CD11a는 최소한의 피하 염증을 유도시켰다. 본래의 150 mg/ml 2H7 제제가 양성 대조군으로서 사용되었고, 이로 인해 주사 부위에서 중간 수준 내지 중증의 (2-3+) 염증이 발생하였다. HP-베타 시클로렉스트린을 부가하면 주사 부위에서의 염증이 상당히 저하되었다. 15 또는 30%의 최적 농도의 HP-베타 시클로렉스트린을 100 mg/ml 2H7과 함께 사용하면, 주사 부위에서의 염증이 경도 (1+) 수준으로 상당히 저하되었다. 시클로렉스트린의 농도를 증가시키면 보다 고 농도의 2H7 단백질의 경우에 관찰된 증가된 염증이 저하되었다. 30% HP-베타 시클로렉스티린을 보다 고 농도의 2H7 (150 mg/ml)에 부가하면, 2H7은 관찰된 염증을 중간 수준 내지 중증 (2-3+)에서 경도 수준의 염증 (1+)으로 상당히 저하시켰다. 보다 저 농도의 HP-베타 시클로렉스트린 (5% 및 15%)은 동일한 효과를 나타내지 못하였다.

표 8

제제	동물	조직학 스코어	언급
150 mg/mL rhuMAb CD11a	1	+/-	소포성 모낭염
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 15% HP-베타	1	1+	언급 없음
	2	1+	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 30% HP-베타	1	1+	국소적으로 광범위한 염증
	2	1+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7 + 5% HP-베타	1	3+	괴사를 수반한 국소적으로 광범위한 염증
	2	2-3+	
	3	2-3+	
150 mg/mL 2H7 + 15% HP-베타	1	2+	호중증증가성 변성을 수반한 국소적으로 광범위한 염증
	2	2-3+	
	3	2+	
150 mg/mL 2H7 + 30% HP-베타	1	1+	국소적으로 광범위한 염증
	2	1+	
	3	1+	
30% HP-베타 비히클	1	+/-	국소적으로 광범위한 염증 (동물 2 및 3)
	2	1-2+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7 본래의 제제	1	2-3+	괴사를 수반한 국소적으로 광범위한 염증
	2	2-3+	
	3	2-3+	

염증 등급 스코어:

WNL = 정상 범위 내에 있음

+/- = 최소/약간의 염증

1+ = 경도

2+ = 중간 수준

3+ = 중증

[0257]

HP-감마 시클로렉스트린 제제에 대한 조직-병리학 결과가 표 9에 요약되어 있다. 10% HP-감마 시클로렉스트린을 2H7에 부가한 경우에, 염증이 중간 수준 내지 중증 (2-3+)에서 경도 내지 중간 수준 (<2+)으로 감소한 것이 관찰되었다. HP-감마 비히클을 사용한 경우에는 유의한 염증 반응이 관찰되지 않았다.

표 9

제제	동물	조직학 스코어	언급
150 mg/mL rhuMAb CD11a	1	+/-	소포성 모낭염
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 10% HP-감마	1	1-2+	언급 없음
	2	+/-	
	3	2+	
100 mg/mL 2H7 + 10% HP-감마	4	1-2+	국소적으로 광범위한 염증
	5	1+	
	6	1+	
125 mg/mL 2H7 + 10% HP-감마	1	2+	언급 없음
	2	1-2+	
	3	2+	
150 mg/mL 2H7 + 10% HP-감마	1	2+	국소적으로 광범위한 염증
	2	1-2+	
	3	2+	
10% HP-감마 비히클	1	1+	국소적으로 광범위한 염증; 헬관 주위 염증
	2	+/-	
	3	+/-	
10% HP-감마 비히클	4	WNL	언급 없음
	5	+/-	
	6	WNL	
150 mg/mL 2H7 본래의 제제	1	2-3+	피사를 수반한 국소적으로 광범위한 염증
	2	2-3+	
	3	2-3+	

염증 등급 스코어:

WNL = 정상 범위 내에 있음

+/- = 최소/약간의 염증

1+ = 경도

2+ = 중간 수준

3+ = 중증.

[0259]

결론:

[0261]

요약하면, 솔포-부틸 에테르 (SBE), 히드록시 프로필 베타 (HP-베타) 및 히드록시 프로필 감마 (HP-감마) 시클로덱스트린을 부가하는 것이 생리학적 조건 하에 2H7의 응집을 상당히 감소시키고 2H7의 엉짐을 감소시키는 데에 유효하였다. 이와 같이 시클로덱스트린 및 2H7을 사용한 경우의 결과는 시클로덱스트린의 조직학적 용도에 기초해서 예상치 못한 일이었으므로, 본 접근 방식의 신규성 및 혁신적 단계를 예시해준다. 단백질 응집을 감소시키기 위해 전통적으로 사용되어 온 계면활성제를 또한, 본 발명의 시험관내 모델에서 평가하였지만, 어느 것도 2H7의 응집을 자연시키는 데에 있어서 유효하지 못하였다. 중합체 (예를 들어, 텍스트란) 및 아미노산 (예를 들어, 아르기닌)을 또한 시험하였지만, 이는 단백질 응집을 상당히 감소시키지 못하였다.

[0262]

상기 환경 하에 2H7의 응집을 감소시키면, 2H7를 주사한 동물의 주사 부위에서의 염증이 궁극적으로 감소하였다. 염증은 HP-베타 또는 HP-감마 시클로덱스트린을 포함한 2H7 제제의 경우에 중증 (본래의 2H7)에서 경도 내지 중간 수준으로 감소하였다. 이를 조건 하에서 응집될 수 있는 단백질의 능력을 저하시키는 것이 잠재적으로, 생체이용률을 증가시키는 것으로 해석될 수 있었다. 마지막으로, 본 발명자들은 단백질 응집을 감소시킬 수 있는 부형제의 능력을 측정하기 위한 시험관내 투석 모델의 유용성을 성공적으로 개발하였고 이를 입증하였다.

[0263]

참고 문헌

[0264]

특허, 공개된 특허원 및 기타 공보를 포함한, 본 출원 내에 인용된 참고 문헌이 본원에 참고로 도입된다.

[0265]

본 발명의 실시는 달리 표시되지 않는 한, 당해 분야의 기술 수준 내에 있는 분자 생물학 등의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 다음 문헌에 상세히 설명되어 있다. 예를 들어, 하기 문헌을 참고한다:

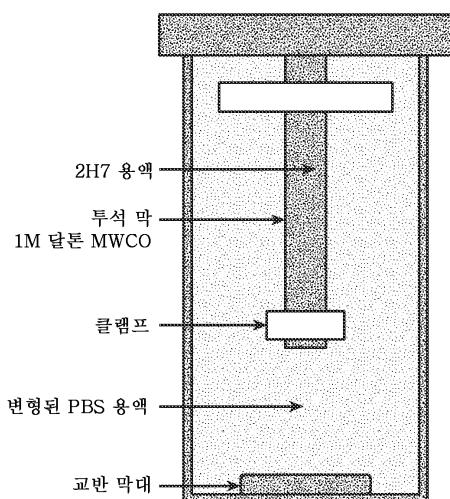
Molecular Cloning:

A Laboratory Manual, (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds., 1987 updated); Essential Molecular Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell *et al.* eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu *et al.* eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson *et al.*, IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller & M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard *et al.* eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells, 2nd Ed. (R. Freshney *et al.* eds., Alan R. Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed *et al.* eds., Wiley-Liss 1990); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. and Hauser H. (1993); Immunochemistry in Practice, 3rd edition, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in Immunocytochemistry, (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan *et al.* eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis & T.K. Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, New York; Ed Harlow and David Lane, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Antibody Engineering, 2nd edition (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); and the series Annual Review of Immunology; the series Advances in Immunology.

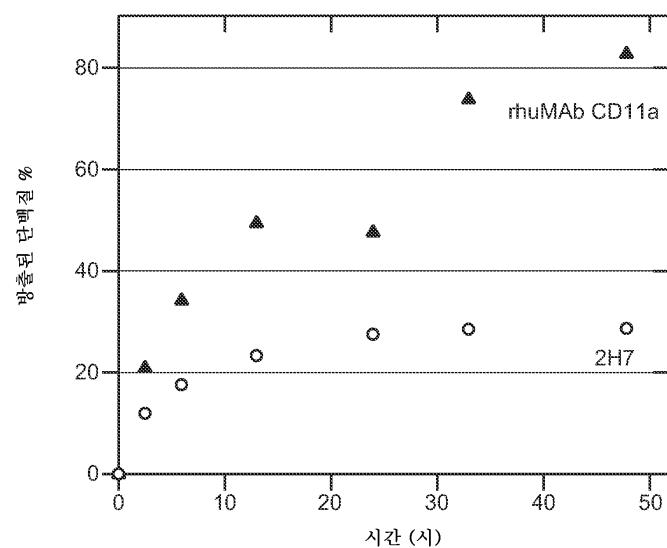
[0266]

도면**도면1**

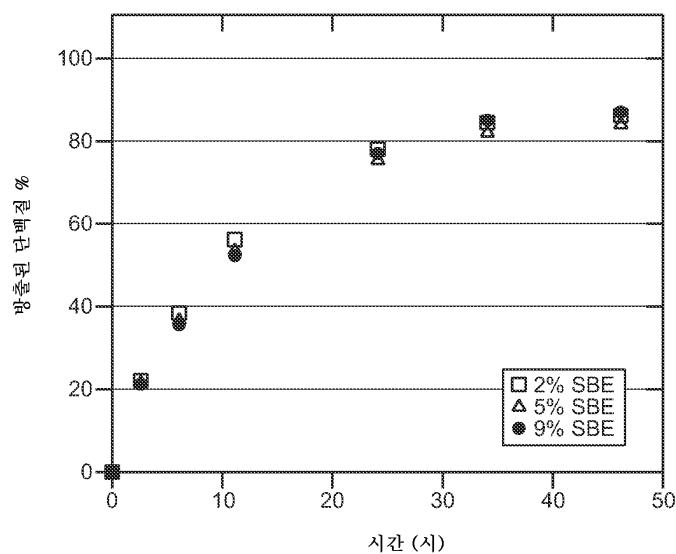
도면2



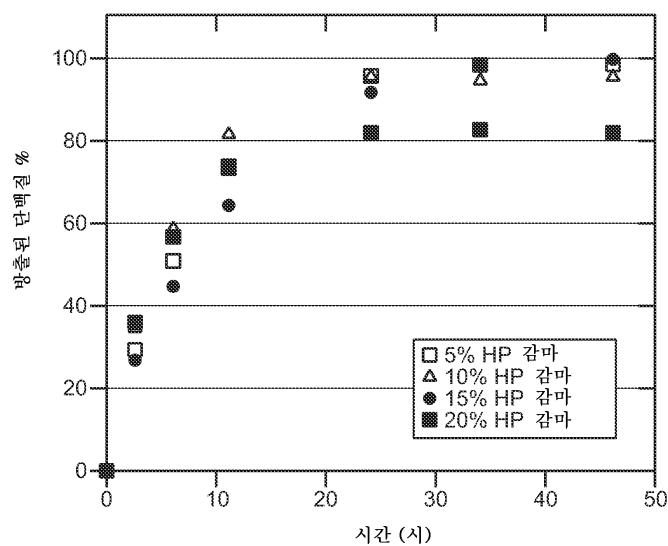
도면3



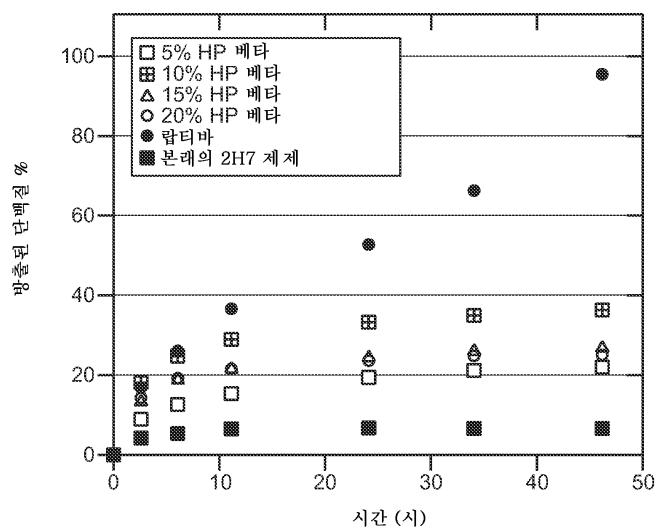
도면4



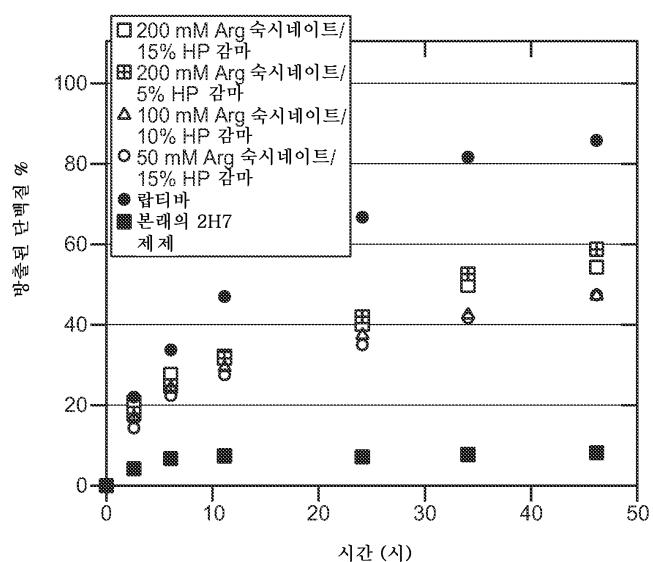
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> METHOD AND FORMULATION FOR REDUCING AGGREGATION OF A
MACROMOLECULE UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

<130> P2391R1 WO

<141> 2009-11-16

<150> US 61/115,441

<151> 2008-11-17

<160> 15

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

Lys Arg

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> sequence is synthesized
<400> 3

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

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

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

Lys Arg

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser

95 100 105

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

110 115 120

Ser Ser

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 5

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

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
	50				55				60					
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
	65				70				75					
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
	80				85				90					
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg
	95					100			105					
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
										110			115	
Ser	Ser													120

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

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

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

 110 115 120
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

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

<210> 7

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 7

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

1 5 10 15

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

 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

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

 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly Lys

<210> 8

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 8

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

215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300

Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 9

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

<210> 10

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

10

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

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

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

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

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

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

 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 11

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 11

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

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

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

350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		

410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450
Gly Lys		

<210> 12
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> sequence is synthesized
 <400> 12

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

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

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

320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450
Gly Lys		

<210> 13

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 13

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

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

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

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

290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
350	355	360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		

425	430	435
Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450
Gly Lys		

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 14

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240

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

245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450
Gly Lys		

<210> 15

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 15

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

215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450

Gly Lys