	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2007-0122543 (43) 공개일자 2007년12월31일
(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)		(71) 출원인 제넨테크, 인크. 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(21) 출원번호 10-2007-7026455 (22) 출원일자 2007년11월14일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2007년11월14일		(72) 발명자 구즈라티, 셰일라 미국 94114 캘리포니아주 샌프란시스코 클리퍼 스트리트 682
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/013780 국제출원일자 2006년04월13일 (87) 국제공개번호 WO 2006/113308 국제공개일자 2006년10월26일		(74) 대리인 양영준, 위혜숙
(30) 우선권주장 60/671,902 2005년04월15일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 항-C D20 항체에 의한 염증성 장 질환 (I B D)의 치료방법

(57) 요약

본 발명은 CD20에 결합하는 항체로 IBD, 특히 궤양성 결장염 (UC)을 치료하는 것에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

인간 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 항체의 투여로 인해 임상 응답 또는 질환 완화가 초래되는 것인, 인간 대상에서 중등도 내지 중증의 염증성 장 질환 (IBD)의 치료 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, IBD가 궤양성 결장염 (UC)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, IBD가 크론병인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 활성 IBD에 걸린 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 투여로 인해 질환 완화가 초래되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 완화가 약 제8주에 달성되는 것인 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 항체의 투여로 인해 S자형 결장경 점수가 0점 또는 1점이 되고, 직장 출혈 점수가 0점이 되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 투여로 인해 임상 응답이 초래되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 임상 응답이 약 제8주에 달성되는 것인 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 항체의 투여가 질환 활성 지수 (DAI) 점수를 감소시키는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 본원 명세서 표 2에서의 점수매김 시스템을 이용하여 매긴 DAI 점수가 3점 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 투여가 결장 점막 내의 B 세포를 감소시키는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화 항체인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 리투시맵(rituximab)을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 2H7을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2F2 (huMax-CD20)를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 순수한(naked) 항체인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 또다른 분자에 접합된 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 약 200 mg 내지 2000 mg 범위의 용량으로 약 1개월의 기간 내에 약 1회 내지 4회 용량의 빈도로 투여되는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 용량이 약 500 mg 내지 1500 mg 범위인 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 용량이 약 750 mg 내지 1200 mg 범위인 방법.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 1회 또는 2회 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 약 2주 내지 3주의 기간 내에 투여되는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 기간이 약 2주인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 정맥내 투여되는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 피하 투여되는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 유효량의 제2 의약이 투여되고, CD20 항체가 제1 의약인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 의약이 1종 초과 의약인 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 제2 의약이 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및 아자티오프린으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 의약이 제2 의약 처치 대상에게 CD20 항체가 투여되지 않는 경우에 사용되는 것보다 낮은 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 이전에 CD20 항체 처치를 받지 않은 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 B 세포 악성 종양을 앓고 있지 않은 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 IBD 이외의 자가면역 질환을 앓고 있지 않은 것인 방법.

청구항 34

활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에게 CD20 항체를 오직 1회 또는 2회 용량만 투여하는 것을 포함하고, CD20 항체의 1회 또는 2회 용량 투여시 질환 완화 또는 임상 응답이 달성되는 것인, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD의 치료 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 1회 또는 2회 용량이 정맥내 (IV) 투여되는 것인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 1회 또는 2회 용량이 피하 (SQ) 투여되는 것인 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 2회의 정맥내 용량이 투여되고, 상기 2회의 용량 각각이 약 200 mg 내지 약 2000 mg의 범위인 방법.

청구항 38

활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 상기 대상에게 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및 아자티오프린으로 구성된 군으로부터 선택된 유효량의 제2 의약을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD의 치료 방법.

청구항 39

활성 궤양성 결장염 (UC)에 걸린 인간 대상에게 질환 활성 지수 (DAI) 점수 감소 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 활성 궤양성 결장염 (UC)에 걸린 인간 대상에서의 DAI 점수 감소 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 본원 명세서 표 2에서의 점수매김 시스템을 이용하여 매김 DAI 점수가 3점 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 대상에서의 핵주변 항-호중구 세포질 항체 (p-ANCA) 또는 항-인간 트로포마이오신 이소형 5 (hTM5) 자가항체가 비전형적인 수준인 방법.

청구항 42

i. CD20 항체를 포함하는 용기, 및

ii. 인간 대상에서 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하기 위한 지침서가 있고, 상기 지침서는 유효량의 CD20 항체가 인간 대상에게 투여됨을 지시하는 것인 포장 삽입물

을 포함하는 제조품.

명세서

- <1> 본 출원은 가출원 60/671,902 (2005년 4월 15일 출원)를 35 USC § 119 하에 우선권으로 청구하는 정식 출원이고, 상기 가출원의 전체 개시내용은 거명에 의해 본원에 포함된다.

기술분야

- <2> 본 발명은 CD20에 결합하는 항체로 IBD, 특히 궤양성 결장염 (UC)을 치료하는 것에 관한 것이다.

배경기술

- <3> **염증성 장 질환 (IBD)**

- <4> 염증성 장 질환 (IBD)은 장에 염증을 일으키는 일군의 장애의 명칭이다. IBD의 증상에는 복부의 경련 및 통증, 설사, 체중 감소 및 장 출혈이 포함된다. IBD의 발병기전에 관한 현재의 일치된 의견은 정주 세균총에 대한 숙주 면역 응답에서의 유전적으로 결정된 조절곤란에 집중되어 있다 ([Pallone et al., The immune system in inflammatory bowel disease. In: Satsangi J, Sutherland LR, editors. Inflammatory Bowel Disease. Spain: Churchill Livingstone, 85-93 (2003)]).
- <5> 크론병 및 궤양성 결장염 (UC)은 가장 일반적인 형태의 IBD이다.
- <6> 크론병은 일반적으로 소장 및 대장의 길이를 따라 궤양을 야기한다. 보통 크론병은 직장에 해를 미치지 않거나, 또는 직장 주변의 배농과 함께 염증 또는 감염을 일으킨다.
- <7> 대부분 예외 없이, UC에는 직장이 수반되고, 근위적으로 인접 부분으로 또는 모든 결장으로 확산된다. 질환 활성은 재발 및 정지 기간이 있으면서 일반적으로 간헐적이다. S자형 결장경 또는 결장경 사진이 특징적이다. 경도(輕度)의 질환에서, 결장 점막은 충혈성 및 과립형으로 나타난다. 더욱 중증의 질환에서, 작은 점 궤양이 존재하고, 점막이 특징적으로 파쇄성이고, 자발적으로 출혈될 수 있다. 조직학적으로, 활성 질환에서의 염증성 세포 침윤물은, 종종 음(crypt)을 침범할 뿐만 아니라 상피 손상 및 음 비틀림과 관련되면서, 일반적으로 호중구를 포함한다. 고유판 내의 증가된 수의 림프구 및 기저 형질세포증가증이 일반적으로 존재한다.
- <8> 미국에서 500,000명 내지 700,000명의 환자가 UC를 앓고 있다 ([Loftus, Gastroenterology 126:1504-1517 (2004)]). UC의 결장의 소견에는 관절염, 포도막염, 아프타성 구내염, 궤저농피증, 및 결절 홍반이 포함된다. 경도 내지 중등도 질환의 환자에 대한 초기 요법은 일반적으로 아미노살리실레이트이다. 제어된 실험에서, 다양한 기준에 의한 질환 개선이 위약 군에서 30% 이하의 대상에서 발생하였다; 따라서, 특정 치료가 매우 경도의 환자에 대해 선택될 수 없다. 직장 및 S자형 결장이 수반되는 원위 좌측 UC는 5-아미노살리실레이트 (5-ASA) 관장 제형으로 효과적으로 치료될 수 있다. 표준 5-ASA 치료에 응답하지 않는 활성 UC 환자 및 더욱 중증의 질환의 환자에서는, 경구 코르티코스테로이드가 급성 대증 요법의 대안이었다. 그러나, 코르티코스테로이드는 이의 사용이 시간에 따라 현저한 독성과 관련된다면 UC 환자에서의 장기적인 완화 유지에서 효과적이지 않다 ([Lennard-Jones et al., Lancet 1:188-189 (1965)]).
- <9> 질환 격화에 대해 5-ASA 약물 및 코르티코스테로이드에 응답하지 않는 환자들에게는 이용가능한 치료 선택권이 제한된다. 다수의 이러한 환자들은 면역억제제, 가장 통상적으로는 6-메르캅토퓨린 (6-MP) 또는 아자티오프린으로 치료되고, 이들은 활성 질환에서 치료 효과의 개시에서 현저하게 지연될 수 있다. 고용량의 IV 코르티코스테로이드에 응답하지 않고 결장절제술을 기다리고 있는 중증 질환의 환자에서, IV 시클로스포린으로의 현저한 단기 효능이 한 소규모 위약-제어 연구에서 관찰되었다 ([Lichtiger et al., N Engl J Med 330:1841-1845 (1994)]). 궁극적으로, 환자의 25%-40%에서 결장절제술이 필요하다. 활성 질환의 신속한 제어를 제공할 수 있고 장기간의 질환 완화를 유도할 수 있는, 안전하고 효과적인 치료제에 대한 충족되지 않은 요구가 명백하게 존재한다.
- <10> UC의 발병기전이 완전하게 이해되지는 않았지만, UC가 B 세포가 질환 병태생리학에서 중요한 역할을 하는 자가 면역 장애일 수 있다는 증거가 증가하고 있다. B 세포, 뿐만 아니라 T 세포가 UC의 지표로 간주되고 활성 UC 환자로부터의 조직 절편에서 나타나는 조직병리학적 양상인 기저 림프성 응집물 내에 존재한다 ([Yeung et al., Gut 47:212-221 (2000)]). 휴지기 UC 환자에서의 재발을 예측할 수 있는 임상 및 조직학적 파라미터를 평가하는데 있어서, 점막의 기저 부분에 증가된 수의 혈장 세포가 존재하는 것이 재발의 독립적인 예보물인 것으로 발견되었다 ([Bitton et al., Gastroenterology 120:1320 (2001)]). UC에서의 점막 염증은 활성화된 T 세포에 의해 구동되는 것으로 생각되지만, 이러한 환자들은 T-헬퍼-2 (Th2) 사이토카인 발현 패턴 프로파일을 갖는다

([Monteleone et al., Gut 50(Suppl III)64 (2002)]). Th2 사이토카인은 고전적으로 B-세포 면역 응답 및 항체 생산을 구동시키기 때문에, B 세포에 대한 중심적인 역할이 UC에서 가정될 수 있다.

<11> 증가된 양의 IgG, IgM, 및 IgA 및 혈장 세포, 뿐만 아니라 장강(intestinal lumen) 항원 및 자가항원에 대한 항체의 증가된 생산이 UC 환자의 염증이 있는 결장 점막의 고유관에서 발견되었다 ([MacDermott et al., Gastroenterology 81:844-852 (1981)]). 또한, UC 환자 내의 자가항원의 존재에 대한 데이터가, UC의 발병기 전에서의 이러한 항체에 대한 명확한 역할은 확실하지 않지만, 축적되고 있다. UC 환자의 약 2/3에 호중성 백혈구의 성분에 대해 지시된 핵주변 항-호중구 세포질 항체 (p-ANCA)로 공지된 순환 항체가 있다 ([Quinton et al., Gut 42:788-791 (1998)]). 일부 형태의 혈관염에서 발생하고, 다른 호중구 성분 (골수세포형 과산화효소)에 대해 지시된 p-ANCA 자체가 혈관염 및 조직 손상의 원인인 것으로 혈관염의 실험 동물 모델에서 최근 나타났다 ([Xiao et al., J Clin Invest 110:955-963 (2002)]).

<12> 자가면역의 또다른 마커는 UC에서의 추정 자가항원인 인간 트로포마이오신 이소형 5 (hTM5)에 대한 결장 점막 B-세포 응답이다. UC 환자의 결장 점막에서 hTM5에 대한 IgG를 생산하는 고유관 B 세포의 수가 크론 결장염 환자 및 비-IBD 환자와 비교하여 통계적으로 매우 유의하게 증가되었고, 이는 UC에서의 항-hTM5 항체의 중요하고 뚜렷한 역할을 시사한다 ([Onuma et al., Clin Exp Immunol 121:466-471 (2000)]). 유사하게, 임상 활성과 상관 없이, 23명의 환자 중 21명 (91%)에 IgG-생산 면역세포가 있어, 항-hTM5 IgG 면역세포의 수가 비-IBD 대조군과 비교하여 UC 환자에서 유의하게 더 높았다 ([Onuma et al., Clin Exp Immunol 121:466-471 (2000)]). 또한, 항-hTM5 항체가 UC 및 원발성 경화성 담관염 환자의 혈청에서 검출되었다 ([Sakimaki et al., Gut 47:236-241 (2000)]). UC 환자로부터의 혈청 내의 항-결장 항체가 결장 상피 세포 내의 표면 항원 또는 술잔 세포 내의 결장 점액소와 반응할 수 있는 것으로 나타났다 ([Inoue et al., Gastroenterology 121:1523 (2001)]). 이러한 항체는 결장 상피 세포에 대한 항체-의존성 세포-매개 세포독성 메커니즘을 통해 결장 점막의 파괴에 기여할 수 있다.

<13> 한 연구에서, T-세포 수용체 (TCR) α 가 결핍된 마우스에서 발생한 자발적인 만성 결장염이 성숙형 B 세포의 부재 하에 더욱 중증인 것으로 관찰되었다. $\alpha\mu$ 녹아웃(knockout) 마우스와 교차된 TCR α -결핍 만성 결장염 마우스의 후손에서는 TCR α -결핍 마우스보다 더욱 중증 형태의 결장염이 발달된다. 이러한 연구에서, 결장염의 증가된 중증도는 발병성 세균총으로 인한 것이 아니라, B 세포의 완전한 부재로 인한 것이었다. $\alpha\mu$ 녹아웃 마우스에서, 결장염의 개시 전에 TCR α -결핍 마우스로부터 3- 내지 4-주령 $\alpha\mu$ -결핍 마우스로의 말초 B 세포의 입양 전달 후에 만성 결장염이 두드러지게 약화되었다. 이는 이러한 마우스 모델에서 결장염의 발달에서의 B 세포에 대한 억제 역할을 시사한다 ([Mizoguchi et al., Int Immunol 12:597-605 (2000)]).

<14> CD20 항체 및 CD20 항체로의 치료법

<15> 림프구는 조혈 동안 골수에서 생산되는 많은 유형의 백혈구 중 하나이다. 림프구에는 2종의 주요 집단이 있다: B 림프구 (B 세포) 및 T 림프구 (T 세포). 본원에서 특히 흥미로운 림프구는 B 세포이다.

<16> B 세포는 골수 내에서 성숙되어, 이의 세포 표면 상에 항원-결합 항체를 발현하면서 골수를 떠난다. 나이브 (naive) B 세포가 이의 막-결합 항체가 특이적인 항원을 최초로 만나면, 세포가 급속하게 분열하기 시작하여, 이의 자손이 메모리(memory) B 세포 및 "형질 세포"로 칭해지는 이펙터(effector) 세포로 분화된다. 메모리 B 세포는 수명 기간이 더 길고, 원래의 어버이 세포와 동일한 특이성을 갖는 막-결합 항체를 계속 발현한다. 형질 세포는 막-결합 항체를 발현하지 않지만, 대신 분비될 수 있는 형태의 항체를 생산한다. 분비된 항체는 체액성 면역의 주요 이펙터 분자이다.

<17> CD20 항원 (인간 B-림프구-제한 분화 항원, Bp35으로도 또한 칭해짐)은 프리(pre)-B 및 성숙 B 림프구 상에 위치한 분자량이 약 35 kD인 소수성 막횡단 단백질이다 ([Valentine et al., J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989)]; 및 [Einfeld et al., EMBO J. 7(3):711-717 (1988)]). 이 항원은 90 %를 초과하는 B-세포 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종 (NHL) 상에서 발현되지만 ([Anderson et al., Blood 63(6):1424-1433 (1984)]), 조혈 줄기 세포, 프로(pro)-B 세포, 정상 형질 세포 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 ([Tedder et al., J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)]). CD20은 세포-주기 개시 및 분화를 위한 활성화 프로세스에서의 초기 단계(들)를 조절하고 ([Tedder et al., 상기 문헌]), 아마도 칼슘 이온 채널로 기능한다 ([Tedder et al., J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)]).

<18> B-세포 림프종에서의 CD20의 발현이 주어지면, 이러한 항원은 이같은 림프종의 "표적화"를 위한 후보물질로 작용할 수 있다. 본질적으로, 이같은 표적화는 하기와 같이 일반화될 수 있다: B 세포의 CD20 표면 항원에 특이

적인 항체가 환자에게 투여된다. 이러한 항-CD20 항체는 정상 B 세포 및 악성 B 세포 모두 (표면 상)의 CD20 항원에 특이적으로 결합한다; CD20 표면 항원에 결합된 항체는 신생물 B 세포의 파괴 및 결핍에 이를 수 있다. 추가로, 종양을 파괴하는 잠재력을 갖는 화학 작용제 또는 방사성 표지가 작용제가 신생물 B 세포에 특이적으로 "전달"되도록 항-CD20 항체에 접합될 수 있다. 접근법과 상관없이, 1차 목표는 종양을 파괴하는 것이다; 구체적인 접근법은 사용된 특정 항-CD20 항체에 의해 결정될 수 있고, 따라서 CD20 항원을 표적화하기 위한 이용가능한 접근법은 상당히 변할 수 있다.

<19> 리툭시맵(rituximab) (RITUXAN®) 항체는 CD20 항원에 대해 지시된, 유전자 조작된 키메라 마우스/인간 모노클로날 항체이다. 리툭시맵은 1998년 4월 7일 허여된 미국 특허 5,736,137 (Anderson 등)에서 "C2B8"으로 칭해진 항체이다. 리툭시맵은 재발된 또는 난치성의 저-등급 또는 소포형, CD20 양성, B-세포 비-호지킨 림프종 환자의 치료에 지시된다. 시험관 내에서, 리툭시맵은 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포형 세포독성 (ADCC)을 매개하고, 세포자멸사를 유도하는 것으로 나타났다 ([Reff et al., Blood 83(2):435-445 (1994)]; [Maloney et al., Blood 88:637a (1996)]; [Manches et al., Blood 101:949-954 (2003)]). 리툭시맵과 화학요법 및 독소 간의 상승작용이 또한 실험적으로 관찰되었다. 특히, 리툭시맵은 약물-저항성 인간 B-세포 림프종 세포주를 독소루비신, CDDP, VP-16, 디프테리아 독소 및 리신(ricin)의 세포독성 효과에 민감하게 한다 ([Demidem et al., Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997)]). 생체내 임상전 연구는 리툭시맵이 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이의 말초혈, 림프절, 및 골수로부터 B 세포를 결핍시킨다는 것을 나타냈다. [Reff et al., Blood 83:435-445 (1994)].

<20> 리툭시맵은 B 세포 및 자가항체가 질환 병태생리학에서 역할을 하는 것으로 나타난 다양한 비-악성 자가면역 장애에서 또한 연구되었다. [Edwards et al., Biochem Soc. Trans. 30:824-828 (2002)]. 리툭시맵은, 예를 들어, 류머티스 관절염 (RA) ([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 ([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 혈소판감소 자색반 ([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)]; [Zaia et al., Haematologica, 87:189-195 (2002)]; [Ratanatharathorn et al., Ann. Int. Med., 133:275-279 (2000)]), 진정 적혈구계 무형성증 ([Auner et al., Br. J. Haematol, 116: 725-728 (2002)]); 자가면역성 빈혈 ([Zaja et al., Haematologica 87:189-195 (2002)] ([Haematologica 87:336 (2002)]에는 오류가 있음)), 저온 응집병 ([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 저항성의 B형 증후군 ([Coll et al., N. Engl. J. Med., 350:310-311 (2004)]), 혼합 한랭글로불린혈증 ([De Vita et al., Arthritis Rheum. 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002)]), 중증 근무력증 ([Zaja et al., Neurology, 55:1062-63 (2000)]; [Wylam et al., J. Pediatr., 143:674-677 (2003)]), 베게너 육아종증 ([Specks et al., Arthritis & Rheumatism 44:2836-2840 (2001)]), 무반응 보통 천포창 ([Dupuy et al., Arch Dermatol, 140:91-96 (2004)]), 피부근육염 ([Levine, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)]), 쇼그렌 증후군 ([Somer et al., Arthritis & Rheumatism, 49:394-398 (2003)]), 활성 II형 혼합 한랭글로불린혈증 ([Zaja et al., Blood, 101:3827-3834 (2003)]), 보통 천포창 ([Dupay et al., Arch. Dermatol, 140:91-95 (2004)]), 자가면역성 신경병증 ([Pestronk et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74:485-489 (2003)]), 부신생물 안간대-간대성 근경련 증후군 ([Pranzatelli et al., Neurology 60(Suppl. 1) P05.128:A395 (2003)]), 및 재발-이장성 다발성 경화증 (RRMS)의 징후 및 증상을 잠재적으로 경감시키는 것으로 보고되었다. [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)].

<21> 제II상 연구 (WA16291)가 류머티스 관절염 (RA) 환자에서 수행되어, 리툭시맵의 안정성 및 효능에 대한 48-주 추적조사(follow-up) 데이터를 제공하였다. [Emery et al., Arthritis Rheum 48(9):S439 (2003)]; [Szczepanski et al., Arthritis Rheum 48(9):S121 (2003)]; [Edwards et al., N Engl. J. Med. 350:2572-82 (2004)]. 총 161명의 환자를 4종의 치료 병기로 무작위로 고르게 나누었다: 메토티렉세이트, 리툭시맵 단독, 리툭시맵 + 메토티렉세이트, 및 리툭시맵 + 시클로포스파미드 (CTX). 리툭시맵의 치료 요법은 1일 및 15일에 1g을 정맥내에 투여하는 것이었다. 대부분의 류머티스 관절염 환자에서의 리툭시맵의 주입은 대부분의 환자에서 잘 허용되었고, 36 %의 환자가 최초 주입 동안 1종 이상의 유해 사례를 겪었다 (위약을 수여받은 30 %의 환자

와 비교). 전반적으로, 대부분의 유해 사례는 중증도가 경도 내지 중등도인 것으로 간주되었고, 모든 처리 군에 대해 균형을 잘 이루었다. 48주에 걸쳐 4개의 병기에서 19개의 심각한 유해 사례가 있었고, 이는 리툽시맵/CTX 군에서 더욱 빈번하였다. 감염 발생은 모든 군에 대해 균형을 잘 이루었다. 이러한 류머티스 관절염 환자 집단에서의 심각한 감염의 평균 비율은 100명의 환자-년 당 4.66이었고, 이는 커뮤니티를 기초로 하는 역학 연구에서 보고된 류머티스 관절염 환자에서 병원 입원을 필요로 하는 감염 비율 (100명의 환자-년 당 9.57)보다 낮다. [Doran et al., *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002)].

<22> 자가면역성 신경병증 ([Pestronk et al., 상기 문헌]), 안간대-간대성 근경련 증후군 ([Pranzatelli et al., 상기 문헌]), 및 RRMS ([Cross et al., 상기 문헌])가 포함되는 신경 장애가 있는 소수의 환자에서의 리툽시맵의 보고된 안정성 프로파일은 중앙학 또는 류머티스 관절염에서 보고된 것과 유사하였다. RRMS 환자에서의 인터페론-베타 (IFN-β) 또는 글라티라머 아세테이트와 조합된 리툽시맵의 진행중인 연구자-스폰서 시험 (IST: investigator-sponsored trial)에서 ([Cross et al., 상기 문헌]), 치료된 환자 10명 중 1명은 리툽시맵의 최초 주입 후 중증도의 열 및 오한을 겪은 후에 야간 관찰을 위해 병원에 입원하였고, 나머지 9명은 4종의 주입 요법을 어떠한 보고된 유해 사례도 없이 완료하였다.

<23> CD20 항체 및 CD20 결합 분자에 관한 특허 공보에는 미국 특허 5,776,456, 5,736,137, 5,843,439, 6,399,061, 및 6,682,734, 뿐만 아니라 미국 2002/0197255, 미국 2003/0021781, 미국 2003/0082172, 미국 2003/0095963, 미국 2003/0147885 (Anderson 등); 미국 특허 6,455,043, 미국 2003/0026804, 및 WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez 및 White); WO 2000/27433 및 미국 2004/0213784 (Grillo-Lopez 및 Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky 등); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter 및 White); WO 2001/10460 (White 및 Grillo-Lopez); 미국 2001/0018041, 미국 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna 및 Hariharan); 미국 2002/0006404 및 WO 2002/04021 (Hanna 및 Hariharan); 미국 2002/0012665 및 WO 2001/74388 (Hanna, N.); 미국 2002/0058029 (Hanna, N.); 미국 2003/0103971 (Hariharan 및 Hanna); 미국 2002/0009444 및 WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C); 미국 2002/0128488 및 WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky 등); WO 2002/096948 (Braslawsky 등); WO 2002/079255 (Reff 및 Davies); 미국 특허 6,171,586 및 WO 1998/56418 (Lam 등); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, 미국 특허 6,194,551, 미국 특허 6,242,195, 미국 특허 6,528,624 및 미국 특허 6,538,124 (Idusogie 등); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd 등); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez 등); 미국 2002/0004587 및 WO 2001/77342 (Miller 및 Presta); 미국 2002/0197256 (Grewal, L); 미국 2003/0157108 (Presta, L.); WO 04/056312 (Lowman 등); 미국 2004/0202658 및 WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan, A.); 미국 2005/0032130A1 (Beresini 등); 미국 2005/0053602A1 (Branetta, P.); 미국 특허 6,565,827, 6,090,365, 6,287,537, 6,015,542, 5,843,398, 및 5,595,721, (Kaminski 등); 미국 특허 5,500,362, 5,677,180, 5,721,108, 6,120,767, 및 6,652,852 (Robinson 등); 미국 특허 6,410,391 (Raubitschek 등); 미국 특허 6,224,866 및 WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); 미국 2003/0133930 및 WO 2000/74718 (Goldenberg 및 Hansen); 미국 2003/0219433 및 WO 2003/68821 (Hansen 등); WO2004/058298 (Goldenberg 및 Hansen); WO 2000/76542 (Golay 등); WO 2001/72333 (Wolin 및 Rosenblatt); 미국 특허 6,368,596 (Ghetie 등); 미국 특허 6,306,393 및 미국 2002/0041847 (Goldenberg, D.); 미국 2003/0026801 (Weiner 및 Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); 미국 2003/0068664 (Albitar 등); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, 미국 2002/0009427, 및 미국 2003/0185796 (Wolin 등); WO 2003/061694 (Sing 및 Siegal); 미국 2003/0219818 (Bohen 등); 미국 2003/0219433 및 WO 2003/068821 (Hansen 등); 미국 2003/0219818 (Bohen 등); 미국2002/0136719 (Shenoy 등); WO 2004/032828 (Wahl 등); WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter); 미국 2003/0219433 A1 (Hansen 등); WO 2004/035607 (Teeling 등); 미국 2004/0093621 (Shitara 등); WO 2004/103404 (Watkins 등); WO 2005/000901 (Tedder 등); 미국 2005/0025764 (Watkins 등); WO 2005/016969 및 미국 2005/0069545 A1 (Carr 등); 및 WO 2005/014618 (Chang 등)이 포함된다. 또한 미국 특허 5,849,898 및 EP 330,191 (Seed 등); EP332.865A2 (Meyer 및 Weiss); 미국 특허 4,861,579 (Meyer 등); 미국 2001/0056066 (Bugelski 등); 및 WO 1995/03770 (Bhat 등)을 참조.

<24> 리툽시맵으로의 치료법에 관련된 공개문헌으로는 하기의 것들이 포함된다: [Perotta and Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" Abstract # 3360 Blood 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998)]; [Perotta et al., "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)", Blood, 94:49 (abstract) (1999)]; [Matthews, R., "Medical Heretics" New Scientist (7 April, 2001)]; [Leandro et al., "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety,

efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001)]; 2-주 기간 동안, 각각의 환자들이 리툽시맵의 500-mg 주입 2회, 시클로포스파미드의 750-mg 주입 2회, 및 고용량 경구 코르티코스테로이드를 수여받았고, 치료된 환자 중 2명은 각각 7개월 및 8개월에 재발되어 상이한 프로토콜로 재치료받은, [Leandro et al., "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673-2677 (2002)]; 환자를 리툽시맵 (375 mg/m² × 4, 1주 간격으로 반복)으로 치료하고, 추가적인 리툽시맵 적용을 5-6 개월마다 전달한 후, 유지 요법으로 리툽시맵 375 mg/m²을 3개월마다 제공하였고, 무반응 SLE에 걸린 제2 환자가 리툽시맵으로 성공적으로 치료되었고 3개월마다 유지 요법을 제공하였으며, 양쪽 환자 모두 리툽시맵에 잘 반응한 [Weide et al., "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" *Lupus*, 12:779-782 (2003)]; [Edwards and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001)]; [Cambridge et al., "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9):S1350 (2002)]; [Edwards et al., "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9):S197 (2002)]; [Pavelka et al., *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004)]; [Emery et al., *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004)]; [Levine and Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52:1701-1704 (1999)]; [DeVita et al., "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002)]; [Hidashida et al., "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA (2002)]; [Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA (2002)]; ["Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin and Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004)]; [Silverman and Weisman, "rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48:1484-1492 (2003)]; [Kazkaz and Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4:398-402 (2004)]; [Virgolini and Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58:299-309(2004)]; [Klemmer et al., "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with an antiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis and Rheumatism*, 48(9):S624-S624 (2003)]; [Kneitz et al., "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases", *Immunobiology*, 206:519-527 (2002)]; [Arzoo et al., "Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases* 61(10):922-4 (2002)]; [Looney, R., "Treating human autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum Dis.* 61:863-866 (2002)]; [Lake and Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy" in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 by John Wiley & Sons, Inc.) Article Online Posting Date: January 15, 2003 (Chapter 2 "Antibody-Directed Immunotherapy")]; [Liang and Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Section: CD20 as an Immunotherapy Target, article online posting date: 15 January, 2002 entitled "CD20"]; [Appendix 4A entitled "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens" by Stockinger et al., eds: Coligan et al, in *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc) Online Posting Date: May, 2003; Print Publication Date: February, 2003]; [Penichet and Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" in *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* Section: Chimeric, Humanized and Human Antibodies; posted online 15 January, 2002]; [Specks et al., "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001)]; [online abstract submission and invitation Koegh et al., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", *American College of Rheumatology*, Session Number: 28-100, Session Title: Vasculitis, Session Type: ACR Concurrent Session, Primary Category: 28 Vasculitis, Session 10/18/2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>)]; [Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003)]; [Jayne et al., "B-cell depletion with rituximab

for refractory vasculitis" Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003)]; [Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology]; [Stone and Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>]; 및 [Leandro et al., "B cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" Arthritis Rheum., 48 (Suppl 9):S1160 (2003)].

<25>

발명의 개요

<26>

첫번째 양상에서, 본 발명은 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 항체의 투여로 대상에서 임상 응답 또는 질환 완화가 초래되는, 인간 대상에서 중등도 내지 중증의 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하는 방법에 관한 것이다.

<27>

또다른 양상에서, 본 발명은 오직 1회 또는 2회 용량의 CD20 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 1회 또는 2회 용량의 CD20 항체의 투여시 질환 완화 또는 임상 응답이 달성되는, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD를 치료하는 방법에 관한 것이다.

<28>

또한 본 발명은 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 대상에게 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및 아자티오프린으로 구성된 군으로부터 선택된 유효량의 제2 의약을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD를 치료하는 방법을 제공한다.

<29>

추가적인 양상에서, 본 발명은 질환 활성 지수 (DAI) 점수를 감소시키는데 효과적인 양으로 대상에게 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 활성 궤양성 결장염 (UC)에 걸린 인간 대상에서 DAI 점수를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

<30>

추가적인 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는 제조품에 관한 것이다:

<31>

i. CD20 항체를 포함하는 용기; 및

<32>

ii. 인간 대상에서 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하기 위한 지침서가 있고, 지침서는 유효량의 CD20 항체가 인간 대상에 투여되는 것을 가리키는 포장 삽입물.

발명의 상세한 설명

<39>

I. 정의

<40>

"염증성 장 질환" 또는 "IBD"는 장이 염증에 걸리게 하고, 일반적으로 복부 경련 및 통증, 설사, 체중 감소 및 장 출혈이 포함되는 증상이 나타나는 일군의 장애의 명칭이다. IBD의 주요 형태는 궤양성 결장염 (UC) 및 크론병이다.

<41>

"궤양성 결장염" 또는 "UC"는 출혈성 설사를 특징으로 하는, 대장 및 직장의 만성, 발작성, 염증성 질환이다. 궤양성 결장염은 결장 점막 내의 만성 염증을 특징으로 하고, 위치에 따라 분류될 수 있다: "직장염"에는 오직 직장만 수반되고, "직장S자형결장염"은 직장 및 S자형 결장에 영향을 미치며, "좌측 대장염"은 대장의 전체 좌측을 포함하고, "전체결장염"은 전체 결장에 염증을 일으킨다.

<42>

"국소 장염"으로 또한 칭해지는 "크론병"은 위장관의 임의의 부분에 영향을 미칠 수 있지만 회장 (소장과 대장이 만나는 영역)에서 가장 통상적으로 발생하는 만성 자가면역 질환이다. 크론병은, 궤양성 결장염과 반대로, 장벽의 모든 층을 따라 확장되고 장간막뿐만 아니라 국소적인 림프절이 수반되는 만성 염증을 특징으로 한다. 소장 또는 결장이 수반되는지 여부와 상관 없이, 기본적인 병리학적 프로세스는 동일하다.

<43>

궤양성 결장염 및 크론병은 90%를 초과하는 사례에서 임상적으로, 내시경에 의해, 병리학적으로, 그리고 혈청학적으로 서로 구별될 수 있다; 나머지는 부정형 IBD인 것으로 간주된다 ([Harrison's Principles of Internal medicine, 12th edition, p. 1271 (1991)]).

<44>

"중등도 내지 중증" IBD는 대상에서의 질환의 징후 또는 증상이 정도보다 큰 IBD이다. 이같은 대상은 숙련된 위장병전문의에 의해 확인될 수 있다. 중등도 내지 중증 IBD 대상은 스크리닝하기 전 2년 이내에 UC용 경구 코르티코스테로이드로 치료되었을 수 있고/있거나, 치료 강도가 2주 이상의 기간 동안 20 mg/일의 프레드니손 당

량 용량 이상이 있을 수 있다. 이같은 대상은 스테로이드 불응성 및/또는 스테로이드-의존성일 수 있다. 중등도 내지 중증 UC 환자는, 예를 들어, DAI 점수를 기초로 선택될 수 있고, 이때 6점 이상의 DAI 점수, 2점 이상의 직장 출혈 점수, 및/또는 2점 이상의 가요성 S자형 결장경 점수는 대상이 중등도 내지 중증 UC인 것을 가리킨다. 별법으로 또는 추가로, [Truelove and Witts Br Med J. 2:1041-1048 (1955)]에서와 같은 정도, 중등도 및 중증 질환의 평가 기준 (하기 표 1 참조)을 사용하여 이같은 대상을 확인할 수 있다. 전격 또는 독성 결장염 대상에게는 일반적으로 하루에 10회를 초과하는 장 운동, 연속적인 출혈, 복부 팽만 및 압통, 및 부종 및 가늠하게는 장 확장증의 방사선학적 증거가 있다.

표 1

<45>

궤양성 결장염에서의 질환 활성을 평가하기 위한 Truelove & Witts의 기준		
일일 장 운동 (횟수)	≤ 5	> 5
혈변배설	소량	대량
온도	< 37.5 °C	≥ 37.5 °C
맥박	< 90/분	≥ 90/분
적혈구 침강 속도	< 30 mm/시	≥ 30 mm/시
헤모글로빈	> 10 g/dl	≤ 10 g/dl
· 중증 활성에 대한 모든 6가지 상기 기준보다 적은 대상은 중등도 활성의 질환이다.		

<46> 본원에서의 "대상"은 인간 대상이다.

<47> "활성" IBD에 걸린 대상은 스크리닝 또는 초기 치료 시점에 1종 이상의 IBD 증상을 겪고 있다.

<48> "스테로이드-불응성" IBD는 스테로이드가 IBD 대상에게 투여되고 있음에도 불구하고 진행되거나 또는 악화되는 IBD이다.

<49> "스테로이드-의존성" IBD에 걸린 대상은 스테로이드 사용에 의존적이고, 지속적인 증상으로 인해 스테로이드 투여를 점점 감소시키거나 끊을 수 없다.

<50> IBD의 "증상"은 대상이 겪는, 병적인 현상, 또는 구조, 기능 또는 감각이 정상으로부터 이탈하는 것이고, IBD의 지표이다.

<51> "점막"은 위장관을 포함하는 신체 전반에 걸친 체강 및 특정 기관을 라이닝(lining)하는 습성 조직이다. 점막을 따라서 샘이 점액 (진한 유체)을 분비한다.

<52> "결장"은 맹장에서 직장으로 뻗은 대장의 부분이다.

<53> "결장" 점막은 결장을 라이닝하는 점막이다.

<54> "파이어 판"은 신체 전반에 걸쳐, 특히 소화관 및 호흡관의 점막성 라이닝에서 발견되는 응집된 림프 소절이다.

<55> "질환 완화"는 질환 증상의 증거가 실질적으로 없는 것을 의미한다. 완화는 길항제 또는 항체로의 치료 개시로부터 또는 길항제 또는 항체의 최초 투여로부터 지정된 시간 프레임 내에, 예컨대 약 8주 이내에 또는 약 8주에 달성될 수 있다. 또한 완화는 일정 기간의 시간 동안, 예컨대 24주 이상, 또는 48주 이상 동안 지속될 수 있다. 질환 완화는 0점 또는 1점의 S자형 결장경 점수 및/또는 0점의 직장 출혈 점수로 정의될 수 있다.

<56> "S자형 결장경"은 S자형 결장 내부를 내시경을 통해 검사하는 것이다.

<57> "S자형 결장경 점수"는 S자형 결장경을 기초로 임상외에 의해 정해지는 점수이다. 바람직한 S자형 결장경 점수 매김 시스템은 하기와 같다:

<58> 0 = 정상 또는 불활성 질환

<59> 1 = 경도 질환 (홍반, 감소된 혈관 패턴, 경도의 파쇄성(friability))

<60> 2 = 중등도 질환 (상당한 홍반, 혈관 패턴 부재, 파쇄성, 미란)

<61> 3 = 중증 질환 (자발적인 출혈, 궤양)

<62> "직장 출혈"은 직장 내의 또는 직장으로부터의 임의의 출혈을 지칭한다.

- <63> "직장 출혈 점수"는 직장 출혈 (존재하는 경우)의 정도에 대해 정해진 점수 또는 등급이다. 일일 출혈 점수는 그 날의 가장 심한 출혈을 나타낸다. 바람직한 직장 출혈 점수매김 시스템은 하기와 같다:
- <64> 0 = 출혈이 보이지 않음
- <65> 1 = 절반 미만의 시간 동안 대변과 함께 혈액의 줄무늬가 있음
- <66> 2 = 대부분의 시간 동안 대변과 함께 명백한 혈액
- <67> 3 = 혈액이 단독으로 배설됨
- <68> "임상 응답"은 질환 증상에서의 개선을 의미한다. 임상 응답은 특정 시간 프레임 내에, 예를 들어, 길항제 또는 항체로의 치료 개시로부터 또는 길항제 또는 항체의 최초 투여로부터 약 8주 이내에 또는 약 8주에 달성될 수 있다. 또한 임상 응답은 일정 기간의 시간 동안, 예컨대 24주 이상, 또는 48주 이상 동안 지속될 수 있다. 임상 응답은 질환 활성 지수 (DAI) 점수에서의 감소의 관점에서 평가될 수 있고, 예를 들어, DAI 점수가 3점 이상 감소될 수 있다.
- <69> "질환 활성 지수 (DAI)" 점수매김 시스템은 UC 활성을 정량적으로 평가하는 방법이다. 바람직한 DAI 점수매김 시스템이 하기 표 2에 제시된다.

표 2

<70>	<div>UC 활성 평가를 위한 DAI 점수매김 시스템</div> <div> 대변 빈도 (각각의 대상은 자신의 제어로 대변 빈도의 이상 정도를 정한다) 0 = 이러한 대상에 대해 정상 횟수의 대변 1 = 정상보다 1-2회 더 많은 대변 2 = 정상보다 3-4회 더 많은 대변 3 = 정상보다 5회 이상 더 많은 대변 </div> <div> 직장 출혈 (일일 출혈 점수는 그날의 가장 심한 출혈을 나타낸다) 0 = 출혈이 보이지 않음 1 = 절반 미만의 시간 동안 대변과 함께 혈액의 줄무늬가 있음 2 = 대부분의 시간 동안 대변과 함께 명백한 혈액 3 = 혈액이 단독으로 배설됨 </div> <div> 가요성 직장S자형 결장경의 소견 0 = 정상 또는 불활성 질환 1 = 경도 질환 (홍반, 감소된 혈관 패턴) 2 = 중등도 질환 (상당한 홍반, 혈관 패턴 부재, 파쇄성, 미란) 3 = 중증 질환 (자발적인 출혈, 궤양) </div> <div> 의사의 포괄적인 평가 (3가지의 다른 기준을 인정함; 대상의 복부 불쾌감 및 일반적인 안녕감의 일일 기록, 및 기타 관찰, 예컨대 진찰 소견 및 대상의 수행 상태) 0 = 정상 1 = 경도 질환 2 = 중등도 질환 3 = 중증 질환 </div>
------	--

- <71> "자가항체"는 대상에 의해 생성되고 대상 자신의 항원에 대해 지시된 항체이다.
- <72> "트로포마이오신"은 근육으로부터 추출가능한 섬유 단백질이다. 8종의 공지된 인간 트로포마이오신 이소형이 존재한다. 대장 상피 세포에서, 더 적은 양의 이소형 4 (hTM4)와 함께, 인간 트로포마이오신 이소형 5 (hTM5)가 우세한 이소형이다.
- <73> "항-hTM5 항체"는 대상에 의해 생성되고 이러한 대상의 hTM5에 대해 지시된 자가항체를 의미한다.
- <74> "핵주변 항-호중구 세포질 항체 (p-ANCA)"는 대상에 의해 생성되고 이러한 대상의 호중성 백혈구의 성분에 대해 지시된 자가항체를 지칭한다. "핵주변"은 이같은 자가항체의 염색 패턴을 지칭한다.
- <75> "비전형적인" 자가항체 수준은 정상 수준을 초과하는 이같은 자가항체의 수준을 의미한다. 이같은 정상 또는

전형적인 자가항체 수준은 정상 대상 또는 IBD를 앓고 있지 않은 대상의 결장 조직 또는 점막에서 발견된 수준 일 수 있다.

<76> "B 세포"는 골수 내에서 성숙된 림프구이고, 나이브 B 세포, 메모리 B 세포, 또는 이펙터 B 세포 (형질 세포)가 포함된다. 본원에서의 B 세포는 정상 또는 비-악성 B 세포일 수 있다.

<77> 본원에서의 "B-세포 표면 마커" 또는 "B-세포 표면 항원"은 이에 결합하는 길항제 또는 항체가 표적으로 할 수 있는 B 세포의 표면 상에서 발견되는 항원이다. 예시적인 B-세포 표면 마커로는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 및 CD86 백혈구 표면 마커가 포함된다. (설명을 위해서는, [The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York] 참조). 기타 B-세포 표면 마커로는 RP105, FcRH2, B 세포 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Bt1g, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 및 239287이 포함된다. 특히 흥미로운 B-세포 표면 마커는 대상의 비-B-세포 조직과 비교하여 B 세포 상에서 우선적으로 발현되고, 전구체 B 세포와 성숙형 B 세포 모두에서 발현될 수 있다.

<78> "CD20" 항원, 또는 "CD20"은 말초 혈액 또는 림프 기관으로부터의 90 %를 초과하는 B 세포의 표면 상에서 발견된 약 35-kDa의 비-글리코실화 인단백질이다. CD20은 정상 B 세포뿐만 아니라 악성 B 세포 모두에 존재하지만, 줄기 세포 상에서는 발현되지 않는다. 문헌에서의 CD20에 대한 다른 명칭으로는 "B-림프구-제한 항원" 및 "Bp35"이 포함된다. CD20 항원은, 예를 들어, [Clark et al. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 82:1766 (1985)]에 기술되어 있다.

<79> "B-세포 표면 마커 길항제"는 B 세포 상의 B 세포 표면 마커에의 결합 시, 예를 들어 B 세포에 의해 유발되는 체액성 응답을 감소시키거나 방지함으로써, 대상에서 B 세포를 파괴 또는 결핍시키고/시키거나 1종 이상의 B-세포 기능을 방해하는 분자이다. 바람직하게는 길항제는 이것으로 치료된 대상에서 B 세포를 결핍시킬 수 있다 (즉, 순환되는 B-세포 수준을 감소시킬 수 있다). 이같은 결핍은 다양한 메커니즘 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC), B-세포 증식 억제, 및/또는 B-세포 사망 유도 (예를 들어, 세포자멸사를 통해)를 통해 이루어질 수 있다. 본 발명의 범주 내에 포함되는 길항제에는 임의로 세포독성체에 접합 또는 융합된, CD20과 같은 B 세포 표면 마커에 결합하는 항체, 합성 또는 천연-서열 펩티드, 면역부착소, 및 소형분자 길항제가 포함된다. 바람직한 길항제는 항체를 포함한다.

<80> 본원에서의 "CD20 항체 길항제"는, B 세포 상의 CD20에의 결합 시, 예를 들어 B 세포에 의해 유발되는 체액성 응답을 감소시키거나 방지함으로써, 대상에서 B 세포를 파괴 또는 결핍시키고/시키거나 1종 이상의 B-세포 기능을 방해하는 항체이다. 바람직하게는 길항제 항체는 이것으로 치료된 대상에서 B 세포를 결핍시킬 수 있다 (즉, 순환되는 B-세포 수준을 감소시킬 수 있다). 이같은 결핍은 다양한 메커니즘 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC), B-세포 증식 억제, 및/또는 B-세포 사망 유도 (예를 들어, 세포자멸사를 통해)를 통해 이루어질 수 있다.

<81> 본원에서의 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편이 포함된다.

<82> "항체 단편"은 무손상 항체의 항원-결합 영역을 포함하는 것이 바람직한, 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

<83> 본원에서의 "무손상 항체"는 2개의 항원 결합 영역, 및 Fc 영역을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 무손상 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다.

<84> CD20 항체의 예로는 하기의 것들이 포함된다: 현재 "리투시맵" ("RITUXAN®")으로 칭해지는 "C2B8" (미국 특허 5,736,137); IDEC Pharmaceuticals, Inc.에서 시판하는, "Y2B8" 또는 "이브리튜모맵 티옥세탄(Ibritumomab Tiuxetan)" (ZEVALIN®)으로 명명된 이트륨-[90]-표지 2B8 마우스 항체 (미국 특허 5,736,137; 2B8은 접속 번호 HB11388 하에 ATCC에 1993년 6월 22일 기탁됨); "토시튜모맵(Tositumomab)"으로 또한 칭해지는 마우스 IgG2a "B1" (임의로 ¹³¹I로 표지되어, Corixa에서 시판하는 "131I-B1" 또는 "요요드 I131 토시튜모맵" 항체 (BEXXAR™)가 생성됨) (또한 미국 특허 5,595,721 참조); 마우스 모노클로날 항체 "1F5" (IPress et al. Blood

69(2):584-591 (1987)]), 및 "프레임워크 패치(patched)" 또는 인간화 1F5이 포함되는 이의 변이체 (WO03/002607 (Leung, S.); ATCC 기탁 HB-96450); 마우스 2H7 및 키메라 2H7 항체 (미국 특허 5,677,180); 인간화 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman 등), 및 하기에 기재됨); B-세포의 세포막 내의 CD20 분자에 대해 표적화된, 완전한 인간형의 고친화력 항체인 2F2 (HuMax-CD20) (Genmab, Denmark; 예를 들어, [Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510 (2003)] 및 [Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003)]; WO 2004/035607; 미국 2004/0167319 참조); WO 2004/035607 및 미국 2004/0167319 (Teeling 등)에 기재된 인간 모노클로날 항체; 미국 2004/0093621 (Shitara 등)에 기술된, 복합 N-글리코시드-연결 당 사슬이 Fc 영역에 결합된 항체; CD20에 결합하는 모노클로날 항체 및 항원-결합 단편 (WO 2005/000901 (Tedder 등)) 예컨대 HB20-3, HB20-4, HB20-25, 및 MB20-11; WO 2004/103404 및 미국 2005/0025764에 기재된 AME 계열의 항체와 같은 CD20 결합 분자, 예를 들어, AME 33 항체 (Watkins 등, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); 미국 2005/0025764 (Watkins 등)에 기재된 것들과 같은 CD20 결합 분자; A20 항체 또는 이의 변이체 예컨대 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각 cA20, hA20) (미국 2003/0219433, Immunomedics); 미국 2005/0069545 A1 및 WO 2005/16969 (Carr 등)에서와 같이, IL-2가 임의로 접합된, 에피토프-결핍 Leu-16, 1H4, 또는 2B8이 포함되는, CD20-결합 항체; CD22 및 CD20에 결합하는 이중특이적 항체, 예를 들어, hLL2xhA20 (WO2005/14618 (Chang 등)); International Leukocyte Typing Workshop으로부터 입수가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 ([Valentine et al., Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))]; 1H4 ([Haisma et al. Blood 92:184 (1998)]). 본원에서의 바람직한 CD20 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 CD20 항체, 더욱 바람직하게는 리툽시맵, 인간화 2H7, 2F2 (Hu-Max-CD20) 인간 CD20 항체 (Genmab), 및 인간화 A20 항체 (Immunomedics)이다.

- <85> 본원에서의 용어 "리툽시맵" 및 "RITUXAN®"은 CD20 항원에 대해 지시되고 미국 특허 5,736,137에서 "C2B8"으로 명명된, 유전자 조작된 키메라 마우스/인간 모노클로날 항체를 지칭하고, CD20에 결합하는 능력이 유지된 이의 단편이 포함된다.
- <86> 오직 본원에서의 목적을 위해, 그리고 달리 언급되지 않는 한, "인간화 2H7" 항체는 마우스 2H7 항체의 인간화 변이체이고, 이때 항체는 생체 내에서 순환 B 세포를 감소시키는데 효과적이다.
- <87> 한 실시양태에서, 인간화 2H7 항체는 하기의 CDR 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함한다:
- <88> RASSSVSYXH (식중 X는 M 또는 L이다) (서열 21), 예를 들어 서열 4 (도 1A)의 CDR L1 서열,
- <89> 서열 5 (도 1A)의 CDR L2 서열,
- <90> QQWXFNPPT (식중 X는 S 또는 A이다) (서열 22), 예를 들어 서열 6 (도 1A)의 CDR L3 서열,
- <91> 서열 10 (도 1B)의 CDR H1 서열,
- <92> AIYPGNGXTSYNQKFKG (식중 X는 D 또는 A이다) (서열 23), 예를 들어 서열 11 (도 1B)의 CDR H2 서열, 및
- <93> VVYYSXXYWYFDV (식중 위치 6의 X는 N, A, Y, W 또는 D이고, 위치 7의 X는 S 또는 R이다) (서열 24), 예를 들어 서열 12 (도 1B)의 CDR H3 서열.
- <94> 상기 CDR 서열들은 일반적으로 인간 가변 경쇄 및 중쇄 프레임워크 서열, 예컨대 실질적으로 인간 경쇄 카파 아군 I ($V_{\kappa I}$)의 인간 컨센서스 FR 잔기 및 실질적으로 인간 중쇄 아군 III ($V_{\mu III}$)의 인간 컨센서스 FR 잔기 내에 존재한다. WO 2004/056312 (Lowman 등)를 또한 참조.
- <95> 가변 중쇄 영역이 인간 IgG 사슬 불변 영역에 연결될 수 있고, 이때 영역은, 예를 들어, 천연 서열 및 변이체 불변 영역을 포함하는, IgG1 또는 IgG3일 수 있다.
- <96> 바람직한 실시양태에서, 이같은 항체는 서열 8의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하고 (v16, 도 1B에 제시됨), 또한 서열 2의 경쇄 가변 도메인을 임의로 포함하며 (v16, 도 1A에 제시됨), 이는 중쇄 가변 도메인 내의 위치 56, 100, 및/또는 100a에서의 하나 이상의 아미노산 치환(들), 예를 들어 D56A, N100A 또는 N100Y 및/또는 S100aR, 및 경쇄 가변 도메인 내의 위치 32 및/또는 92에서의 하나 이상의 아미노산 치환(들), 예를 들어 예를 들어 M32L 및/또는 S92A를 임의로 포함한다. 바람직하게는, 항체는 서열 13 또는 15의 경쇄 아미노산 서열, 및 서열 14, 16, 17 또는 20의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 무순상 항체이다.
- <97> 바람직한 인간화 2H7 항체는 오크레리주맵(ocrelizumab) (Genentech)이다.
- <98> 본원에서의 항체는, 위치 298, 333, 및 334에서의 아미노산 치환, 바람직하게는 S298A, E333A, 및 K334A와

같이, ADCC 활성을 개선시키는 Fc 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다 (중쇄 잔기의 유 번호매김 사용). 미국 특허 6,737,056B1 (Presta)을 또한 참조.

<99> 임의의 이러한 항체들은 FcRn 결합 또는 혈청 반감기를 개선시키는 Fc 영역에서의 하나 이상의 치환, 예를 들어 중쇄 위치 434에서의 치환, 예컨대 N434W를 포함할 수 있다. 미국 특허 6,737,056B1 (Presta)를 또한 참조.

<100> 임의의 이러한 항체들은 CDC 활성을 증가시키는 Fc 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어, 위치 326에서의 치환, 바람직하게는 K326A 또는 K326W를 포함한다. 미국 특허 6,528,624B1 (Idusogie 등)을 또한 참조.

<101> 일부 바람직한 인간화 2H7 변이체들은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 및 서열 8의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것들 (Fc 영역에서의 치환 (존재한다면)이 있거나 없는 것들이 포함), 및 서열 8 내의 변경 N100A; 또는 D56A 및 N100A; 또는 D56A, N100Y, 및 S100aR이 있는 중쇄 가변 도메인 및 서열 2 내의 변경 M32L; 또는 S92A; 또는 M32L 및 S92A이 있는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것들이다.

<102> 2H7.v16의 중쇄 가변 도메인 내의 M34는 항체 안정성의 잠재적인 공급원인 것으로 확인되었고, 치환에 대한 또 다른 잠재적 후보물이다.

<103> 본 발명의 일부 다양한 바람직한 실시양태의 요약에서, 2H7.v16을 기초로 하는 변이체의 가변 영역은 하기 표 3에서 지시된 아미노산 치환의 위치를 제외하고는 v16의 아미노산 서열을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 2H7 변이체는 v16과 동일한 경쇄를 가질 것이다.

표 3

예시적인 인간화 2H7 항체 변이체

2H7 버전	중쇄 (V _H) 변화	경쇄 (V _L) 변화	Fc 변화
참조용 16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR		S298A, E333A, K334A, K326A

<104> 한 바람직한 인간화 2H7은 2H7.v16 경쇄 가변 도메인 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (서열 2);

<105> 및 2H7.v16 중쇄 가변 도메인 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
 FKGRTISVDKSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS (서열 8).

<106> 을 포함한다.

- <110> 인간화 2H7.v16 항체가 무손상 항체인 경우, 이는 경쇄 아미노산 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 13);
- <111>
- <112> 및 서열 14 또는 하기의 중쇄 아미노산 서열:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
 FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG (서열 17).
- <113>
- <114> 을 포함할 수 있다.
- <115> 또다른 바람직한 인간화 2H7 항체는 2H7.v511 경쇄 가변 도메인 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (서열 18)
- <116>
- <117> 및 2H7.v511 중쇄 가변 도메인 서열:
- SYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLTVTV
 SS (서열 19).
- <118>
- <119> 을 포함한다.
- <120> 인간화 2H7.v511 항체가 무손상 항체인 경우, 이는 경쇄 아미노산 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
 CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 15)
- <121>
- <122> 및 서열 16 또는 하기의 중쇄 아미노산 서열:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQK
 FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNAAAPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG (서열 20).
- <123>
- <124> 을 포함할 수 있다.
- <125> "성장-억제" 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지하거나 감소시키는 것들이다. 예를 들어, 항체는 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 B 세포의 증식을 방지하거나 감소시킬 수 있다.
- <126> "세포자멸사를 유도"하는 항체는, 표준 세포자멸사 분석법 예컨대 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (세포자멸사체(apoptotic body)로 칭해짐)의 형성에 의해 결정되는 바와 같이, 계획된 세포 사멸, 예를 들어 B 세포의 계획된 세포 사멸을 유도하는 것들이다.
- <127> 일반적으로 "천연 항체"는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중 사량체성(heterotetrameric) 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 디설피드 공유 결합에 의해 중쇄에

연결되고, 디설피드 연결의 수는 여러 면역글로불린 이소타입(isotype)의 중쇄에 따라 다르다. 또한 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적인 간격의 사슬내 디설피드 다리를 갖는다. 각각의 중쇄는 다수의 불변 도메인이 이어지는 가변 도메인 (V_H)을 한쪽 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫번째 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

<128> 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간에서 서열이 크게 상이하고 각각의 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되지 않다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인에서 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, β -시트 형상을 주로 채택한 4개의 FR을 포함한다. 각각의 사슬 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른쪽 사슬로부터의 초가변 영역들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 ([Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 것에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포형 세포 독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

<129> 항체를 파파인(papain)으로 소화시키면 "Fab" 단편이라고 칭해지는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 나머지 "Fc" 단편이 생성되는데, Fc라는 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신으로 처리하면 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원과 교차결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.

<130> "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 지닌 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유결합으로 결합되어 있는 이량체로 구성된다. 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 규정하는 것은 이러한 형상 내이다. 총괄적으로, 6개의 초가변 영역이 항원-결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 초가변성 영역만을 포함한 Fv의 절반)도, 비록 전체 결합 부위보다는 낮은 친화력이지만, 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

<131> Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 또한 함유한다. Fab' 단편은, 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기들이 부가되어 있어서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 힌지 시스테인을 사이에 갖는 Fab' 단편들의 쌍으로서 본래 생산되었다. 항체 단편들의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

<132> 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 칭해지는 명백하게 상이한 2종 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.

<133> "중쇄"의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 여러 클래스로 지정될 수 있다. 무손상 항체에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 주요 5개 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 칭해진다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 주지되어 있다.

<134> 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 면역글로불린 중쇄 내의 잔기의 번호매김은 거명에 의해 명백하게 본원에 포함된 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서의 EU 지수에 의한 것이다. "캐벗(Kabat)에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호매김을 지칭한다.

<135> 본원에서의 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하여 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하도록 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 위치 Cys226 또는 Pro230에서의 아미노산 잔기로부터 이의 카르복실-말단까지 이르는 것으로 일반적으로 정

의된다. Fc 영역의 C-말단 라이신 (EU 번호매김 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 유전자 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 있는 항체와 K447 잔기가 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.

<136> "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 대표적인 "이펙터 기능"에는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 포함된다. 이같은 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어 항체 가변 도메인)과 조합되는 것을 일반적으로 필요로 하고, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 다양한 분석법을 사용하여 평가할 수 있다.

<137> "천연 서열 Fc 영역"은 천연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역; 뿐만 아니라 임의의 상기의 것들의 천연 발생 변이체를 포함한다.

<138> "변이체 Fc 영역"은 1개 이상의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역에는 천연 서열 Fc 영역 또는 어버이 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 1개 이상의 아미노산 치환이 있고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 어버이 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 약 1개 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1개 내지 약 5개의 아미노산 치환이 있다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 어버이 폴리펩티드의 Fc 영역과의 상동성이 바람직하게는 약 80% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상일 것이다.

<139> "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)을 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기술된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이같은 분석에 유용한 이펙터 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 추가로, 당해 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어, [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

<140> "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이러한 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구가 포함되고, PBMC와 NK 세포가 바람직하다.

<141> 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연-서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, 이것으로는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체 (이러한 수용체들의 대립유전자 변이체 및 별법으로 스플라이싱된 형태 포함)가 포함된다. Fc γ RRII 수용체에는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체")와 Fc γ RIIB ("억제 수용체")가 포함되고, 이들은 주로 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 세포질 도메인 내에 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 ([Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에 개관되어 있다. 추후에 확인될 것이 포함되는 기타 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어에는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn 또한 포함된다 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

<142> "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1성분 (C1q)이 동족 항원과 복합체를 형성한 분자 (예를 들어 항체)에 결합하는 것에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어, [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol.

Methods 202:163 (1996)]에 기술된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

- <143> "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 및 V_L 도메인 간의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개관을 위해서는, [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)] 참조.
- <144> 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H - V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭한다. 동일한 사슬 상의 두 도메인 간에 쌍을 형성하도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루도록 강요되고, 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 디아바디는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기술되어 있다.
- <145> 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은, 모노클로날 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체들 (이같은 변이체들은 일반적으로 미량으로 존재한다)을 제외하고는, 동일하고/하거나 같은 에피토프(들)에 결합한다. 이같은 모노클로날 항체는 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 이때 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일한 표적 결합 폴리펩티드 서열을 선별하는 것을 포함하는 프로세스에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선별 프로세스는 다수의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 유일한 클론을 선별하는 것일 수 있다. 예를 들어, 표적에 대한 친화력 개선, 표적 결합 서열의 인간화, 세포 배양에서의 이의 생산의 개선, 생체 내에서의 이의 면역원성의 감소, 다중특이적 항체의 생성 등을 위해, 선별된 표적 결합 서열이 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체 또한 본 발명의 모노클로날 항체라는 것을 이해하여야 한다. 여러 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 체계와는 반대로, 모노클로날 항체 체계의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체 체계는 전형적으로 다른 면역글로불린에 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된다는 항체의 특성을 가리키는 것이며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법 (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., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조), 파지 디스플레이 기술 (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)]; 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)] 참조), 및 인간 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자와 또는 유전자의 일부분 또는 전체를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하기 위한 기술 (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 Immuno., 7:33 (1993)]; 미국 특허 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (모두 GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; [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)]; 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)] 참조)가 예를 들어 포함되는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.
- <146> 본원에서의 모노클로날 항체에는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 사슬(들)의 나머지부분은 또다른 종으로부터 유래되거나 또다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린), 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편이 특히 포함된다 (미국 특허 4,816,567; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)]). 본원에서 당해 키메라 항체에는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구대륙 원숭이, 예컨대 개코원숭이, 붉은털 원숭이

또는 사이노몰거스 원숭이)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화(primitized)" 항체가 포함된다 (미국 특허 5,693,780).

- <147> 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 부분에 대해서, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종의 초가변 영역 (공여자 항체)으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변경은 항체의 성능을 더욱 정련시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은, 상기 언급된 바와 같은 FR 치환(들)을 제외하고는, 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 또한 인간화 항체는 임의로 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 임의로 포함할 것이다. 추가적인 상세사항은 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)] 참조.
- <148> 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- <149> "순수한(naked) 항체"는 이중 분자, 예컨대 세포독성 모이어티(moiety) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체 (본원에서 정의된 바와 같음)이다.
- <150> 본원에서의 "무손상 항체"는 2개의 항원 결합 영역, 및 Fc 영역을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 무손상 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다.
- <151> "단리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 천연 환경의 오염 성분은 항체가 진단 또는 치료에 사용되는 것을 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시 95 중량%의 항체를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 서열분석기 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기 15개 이상을 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하는 환원 또는 비-환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의한 균질성 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체에는 재조합 세포내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- <152> "친화력 성숙된" 항체는 이의 하나 이상의 초가변 영역이 변경되어 이러한 변경(들)이 없는 어버이 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화력이 개선된 것이다. 바람직한 친화력 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 친화력이 나노몰 또는 심지어 피코몰일 것이다. 친화력 성숙된 항체는 당업계에서 공지된 절차에 의해 생산된다. [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화력 성숙이 기술되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기술되어 있다.
- <153> 본원에서의 대상의 "치료"는 치료용 처치 및 예방용 또는 방지용 조치 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상에는 이미 IBD를 앓고 있는 사람들뿐만 아니라, IBD를 방지하려는 대상도 포함된다. 따라서, 대상은 IBD를 앓고 있는 것으로 진단되었을 수 있거나, 또는 IBD에 걸리기 쉬울 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "치료하는", "치료된다" 또는 "치료"는 방지용 (예를 들어, 예방용), 완화용 및 치유용 치료를 포함한다.

<154> 보조 요법을 위해 본원에서 사용된 용어 "면역억제제"는 본원에서 치료될 대상의 면역계를 억제하거나 차폐하는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 사이토카인 생산을 억제하거나, 자가-항원 발현을 하향조절 또는 억제하거나, MHC 항원을 차폐하는 물질이 포함될 것이다. 이같은 면역억제제의 예로는 2-아미노-6-아릴-5-치환 피리미딘 (미국 특허 4,665,077 참조); 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID); 간시클로비르; 타크로리무스; 글루코코르티코이드 예컨대 코르티솔 또는 알도스테론, 항-염증제 예컨대 시클로옥시게나제 억제제, 5-리폭시게나제 억제제; 또는 류코트리엔 수용체 길항제; 퓨린 길항제 예컨대 아자티오프린 또는 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF); 알킬화제 예컨대 시클로포스파미드; 브로모크립틴; 단존; 덤손; 글루타르알데히드 (미국 특허 4,120,649에 기술된 바와 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린; 6 메르캅토피린; 스테로이드 예컨대 코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코이드 유사체, 예를 들어, 프레드니손, 메틸프레드니솔론 (SOLU-MEDROL® 메틸프레드니솔론 소듐 숙시네이트 포함), 및 텍사메타손; 디히드로폴레이트 환원효소 억제제 예컨대 메토타렉세이트 (경구 또는 피하); 항말라리아제 예컨대 클로로퀸 및 히드록시클로로퀸; 술파잘라진; 레플루노미드; 항-인터페론-알파, -베타 또는 -감마 항체, 항-종양괴사 인자(TNF)-알파 항체 (인플릭시맵 (REMICADE®) 또는 아달리무맵), 항-TNF-알파 면역부착소 (이테너셉트), 항-TNF-베타 항체, 항-인터루킨-2 (IL-2) 항체 및 항-IL-2 수용체 항체, 및 항-인터루킨-6 (IL-6) 수용체 항체 및 길항제가 포함되는, 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 항체 또는 길항제; 항-CD11a 및 항-CD18 항체가 포함되는 항-LFA-1 항체; 항-L3T4 항체; 이중 항-림프구 글로불린; pan-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (1990년 7월 26일 공개된 WO 90/08187); 스트렙토키나제; 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타); 스트렙토도나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 클로람부실; 데옥시시퍼구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (Cohen 등의 미국 특허 5,114,721); T-세포 수용체 단편 ([Offner et al. Science, 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Janeway, Nature, 341:482 (1989)]; 및 WO 91/01133); BAFF 길항제 예컨대 BAFF 또는 BR3 항체 또는 면역부착소 및 zTNF4 길항제 (개관을 위해, [Mackay and Mackay, Trends Immunol, 23:113-5 (2002)] 참조하고, 또한 하기의 정의를 참조); T 세포 헬퍼 신호를 방해하는 생물학적 작용제, 예컨대 항-CD40 수용체 또는 항-CD40 리간드 (CD154) (CD40-CD40 리간드에 대한 차단 항체 포함) (예를 들어, [Durie et al., Science, 261:1328-30 (1993)]; [Mohan et al., J. Immunol, 154:1470-80 (1995)]) 및 CTLA4-Ig ([Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)]); 및 T 세포 수용체 항체 (EP 340,109) 예컨대 T10B9가 포함된다.

<155> 본원에서 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 소형-분자 독소와 같은 독소, 또는 이의 단편을 포함하도록 의도된다.

<156> "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (CYTOXAN®); 알킬 술포네이트 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸올로멜라민이 포함되는, 에틸렌이민 및 메틸렌이민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로카나비놀 (드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베틀린산; 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 (HYCAMTIN®), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포사이드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노렙비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마II 및 칼리키아마이신 오메가II (예를 들어, [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 다이네마이신 A가 포함되는 다이네마이신; 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색단백질 엔다이인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라마이신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 탁티노마이신, 다우노루비신, 텍토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (ADRIAMYCIN®, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (DOXIL®) 및 데옥시독

소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질 예컨대 메토크렉세이트, 겐시타빈 (GEMZAR®), 테가푸르 (UFTORAL®), 카페시타빈 (XELODA®), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토크렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피리딘, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스유리딘; 항-부신제 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀴온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 마이탄시노이드 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 라죽산; 리죽신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀴온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE®, FILDESIN®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (TAXOL®), 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제형 (ABRAXANE™), 및 독세탁셀 (TAXOTERE®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피리딘; 메토크렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONVOVIN®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 예컨대 레티노산; 임의의 상기 물질들의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 임의의 상기 물질들의 배합물, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 배합 요법에 대한 약자인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 배합된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)으로의 치료 요법에 대한 약자인 FOLFOX가 포함된다.

<157>

이러한 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 저하, 차단 또는 억제하는 작용을 하고 종 종 전신 또는 온몸 치료의 형태인 항호르몬제가 또한 포함된다. 이들은 자체가 호르몬일 수 있다. 예로는 타목시펜 (NOLVADEX® 타목시펜 포함), 라록시펜 (EVISTA®), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (FARESTON®)이 예를 들어 포함되는 항-에스트로겐제 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM); 항-프로게스테론제; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 에스트로겐 수용체 길항제 예컨대 폴베스트란트 (FASLODEX®); 난소를 저해하거나 막는 기능을 하는 작용제, 예를 들어, 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 작동제 예컨대 류프롤리드 아세테이트 (LUPRON® 및 ELIGARD®), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 항-안드로겐제 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 바이칼루타미드; 및 부신에서의 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (MEGASE®), 엑세메스탄 (AROMASIN®), 포르메스타니에, 파드로졸, 보로졸 (RIVISOR®), 레트로졸 (FEMARA®), 및 아나스트로졸 (ARIMIDEX®)이 포함된다. 또한, 화학요법제의 이같은 정의에는 비스포스포네이트 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, BONEFOS® 또는 OSTAC®), 에티드로네이트 (DIDROCAL®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (ZOMETA®), 알렌드로네이트 (FOSAMAX®), 파미드로네이트 (AREDIA®), 티루드로네이트 (SKELID®), 또는 리세드로네이트 (ACTONEL®); 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 사이토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 비정상적인 세포 증식에 연루된 신호전달 경로에서의 유전자, 예를 들어, PKC-알파, Ralf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제하는 것들; 백신 예컨대 THERATOPE® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, LURTOTECAN®); rmRH (예를 들어, ABARELIX®); 라파티닙 디토실레이트 (GW572016로 또한 공지된 ErbB-2 및 EGFR 이중 타이로신 키나제 소형-분자 억제제); 및 임의의 상기 물질의 제약상 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

<158>

용어 "사이토카인"은 또다른 세포 상에서 세포간 매개자로서 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반명이다. 이같은 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인, 인터루킨 (IL) 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15 (PROLEUKIN® rIL-2 및 인간 IL-4 및 인간 IL-4의 변이체, 예를 들어, IL-2R 감마에 결합하는 것에서 수반되는 IL-4의 영역에서의 돌연변이를 함유하고, 예를 들어, Arg 21이 Glu 잔기로 변화된 돌연변이체 포함); 종양 괴사 인자 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)가 포함되는 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에 사용된 용어 사이토카인에는,

천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적으로 활성인 증가물 (이의 합성 생산된 소형-분자 본체 및 제약상 허용가능한 유도체 및 염 포함)이 포함된다.

<159> 용어 "호르몬"은 폴리펩티드 호르몬을 지칭하고, 이는 관이 있는 샘 기관에 의해 일반적으로 분비된다. 호르몬 중에서, 예를 들어, 성장 호르몬 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 틸락신; 에스트라디올; 호르몬-대체 요법; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 또는 테스토락톤; 프로틸락신; 당단백질 호르몬 예컨대 난포-자극 호르몬 (FSH), 갑상선-자극 호르몬 (TSH), 및 황체형성 호르몬 (LH); 프로락틴, 태반 락토젠, 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드, 고나도트로핀-방출 호르몬; 인히빈; 액티빈; 물리관-억제 물질; 및 트롬보포이에틴이 포함된다. 본원에서 사용된 용어 호르몬에는, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 호르몬의 생물학적으로 활성인 증가물 (이의 합성 생산된 소형-분자 본체 및 제약상 허용가능한 유도체 및 염 포함)이 포함된다.

<160> 용어 "성장 인자"는 성장을 촉진하는 단백질을 지칭하고, 예를 들어, 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 혈관 내피 성장 인자; 신경 성장 인자 예컨대 NGF- β ; 혈소판-유래 성장 인자; 전환 성장 인자 (TGF) 예컨대 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론 예컨대 인터페론- α , - β , 및 - γ ; 및 콜로니 자극 인자 (CSF) 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF), 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF), 및 과립구-CSF (G-CSF)가 포함된다. 본원에서 사용된 용어 성장 인자에는, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 성장 인자의 생물학적으로 활성인 증가물 (이의 합성 생산된 소형-분자 본체 및 제약상 허용가능한 유도체 및 염 포함)이 포함된다.

<161> 용어 "인테그린"은 세포가 세포외 매트릭스에 결합하여 응답하도록 하고, 다양한 세포 기능 예컨대 상처 치유, 세포 분화, 종양 세포의 귀소 및 세포자멸사에 수반되는 수용체 단백질을 지칭한다. 이들은 세포-세포외 매트릭스 및 세포-세포 상호작용에서 수반되는 세포 부착 수용체의 대형 족의 일부이다. 기능성 인테그린은 비-공유결합적으로 결합된, 알파 및 베타로 칭해지는 2개의 막횡단 당단백질 서브유닛으로 구성된다. 알파 서브유닛 모두는 서로 약간의 상동성을 공유하고, 베타 서브유닛도 마찬가지이다. 수용체는 항상 1개의 알파 사슬 및 1개의 베타 사슬을 함유한다. 예로는 알파6베타1, 알파3베타1 및 알파7베타1, LFA-1 등이 포함된다. 본원에서 사용된 용어 인테그린에는, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 인테그린의 생물학적으로 활성인 증가물 (이의 합성 생산된 소형-분자 본체 및 제약상 허용가능한 유도체 및 염 포함)이 포함된다.

<162> 본원에서의 목적을 위해, "종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파)"는 [Pennica et al., Nature, 312:721 (1984)] 또는 [Aggarwal et al., JBC, 260:2345 (1985)]에 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 인간 TNF-알파 분자를 지칭한다. 본원에서의 "TNF-알파 억제제"는, 일반적으로 TNF-알파에 결합하여 이의 활성을 중화시키는 것을 통해, TNF-알파의 생물학적 기능을 어느 정도 억제하는 작용제이다. 본원에서 구체적으로 구현되는 TNF 억제제의 예는 이테너셉트 (ENBREL®), 인플릭시맵 (REMICADE®) 및 아달리무맵 (HUMIRA™)이다.

<163> "질환-변형 항-류머티스 약물" 또는 "DMARD"에는 히드록시클로로퀸, 술폰살라진, 메토타렉세이트, 레플루노미드, 이테너셉트, 인플릭시맵, 아자티오프린, D-페니실라민, 금 염 (경구), 금 염 (근육내), 미노시클린, 시클로스포린 (시클로스포린 A 및 국소 시클로스포린 포함), 포도알균 단백질 A ([Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39 (2003)]) 등 (이들의 염 및 유도체 포함)이 포함된다.

<164> "비스테로이드성 항-염증 약물" 또는 "NSAID"의 예로는 아스피린, 아세틸살리실산, 이부프로펜, 나프록센, 인도메타신, 숀린, 톨메틴, COX-2 억제제 예컨대 셀레콕시 (CELEBREX®; 4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일) 벤젠술폰아미드 및 발데콕시 (BEXTRA®), 및 멜록시캄 (MOBIC®) 등 (이들의 염 및 유도체 포함)이 포함된다.

<165> 본원에서의 "인테그린 길항제 또는 항체"의 예로는 LFA-1 항체 예컨대 Genentech가 시판하는 에팔리주맵 (RAPTIVA®), 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 Biogen이 판매하는 나탈리주맵 (TYSABRI®), 또는 디아자시클릭 페닐알라닌 유도체 (WO 2003/89410), 페닐알라닌 유도체 (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 및 WO 2003/53926), 페닐프로피온산 유도체 (WO 2003/10135), 엔아민 유도체 (WO 2001/79173), 프로판산 유도체 (WO 2000/37444), 알칸산 유도체 (WO 2000/32575), 치환된 페닐 유도체 (미국 특허 6,677,339 및 6,348,463), 방향족 아민 유도체 (미국 특허 6,369,229), ADAM 디스인테그린 도메인 폴리펩티드 (미국 2002/0042368), 알파v 베타3 인테그린에 대한 항체 (EP 633945), 아자-다리결합(bridged) 2고리형 아미노산 유도체 (WO 2002/02556) 등이 포함된다.

- <166> "코르티코스테로이드"는 천연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 이를 증대시키는 스테로이드의 일반 화학 구조를 갖는 여러 합성 또는 천연 발생 물질들 중 임의의 것을 지칭한다. 합성 코르티코스테로이드의 예로는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론, 예컨대 SOLU-MEDROL® 메틸프레드니솔론 소듐 숙시네이트 포함), 텍사메타손 또는 텍사메타손 트리암시클론, 히드로코르티손, 및 베타메타손이 포함된다. 본원에서 바람직한 코르티코스테로이드는 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 히드로코르티손, 또는 텍사메타손이다.
- <167> 본원에서 사용된 용어 "유효량"은 IBD를 치료하는데 효과적인 항체 또는 길항제의 양을 지칭하는 것을 의미한다. 유효량은 활성 성분을 포함하지 않는 조성물 (즉, 대조군)이 유사한 상태에 있는 개체에게 투여될 때 관찰되는 효과와 비교된 효과에 의해 전형적으로 결정된다.
- <168> "포장 삽입물"은 치료용 제품의 시판되는 포장에 관례적으로 포함되는 지침서를 지칭하기 위해 사용되고, 지침서는 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기, 포장된 제품과 조합되는 다른 치료 제품, 및/또는 이같은 치료용 제품의 사용에 관련된 경고 등에 대한 정보를 함유한다.
- <169> "의약"은 IBD 또는 이의 증상 또는 부작용을 치료하기 위한 활성 약물이다.
- <170> **II. IBD의 치료법**
- <171> 본원에서의 발명은 B-세포 표면 마커, 예컨대 CD20에 결합하는 항체 (또는 길항제)를 유효량으로 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상에서 IBD를 치료하는 방법을 제공한다.
- <172> 특히, 본 발명은 유효량의 CD20 항체 (또는 길항제)를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 항체 (또는 길항제)의 투여로 임상 응답 및/또는 질환 완화가 초래되는, 인간 대상에서 중등도 내지 중증의 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하는 방법을 제공한다
- <173> 이같은 투여는 또한 결장 점막, 파이어 판, 2차 림프성 조직 또는 기관 예컨대 림프절 및 지라, 및 혈액, 특히 대상의 결장 점막 내의 B-세포를 감소시킨다.
- <174> IBD는 궤양성 결장염 (UC), 또는 크론병일 수 있지만, 바람직하게는 UC이다. 본원에서 치료되는 대상은 활성 IBD, 활성 UC 또는 활성 크론병에 걸린 대상일 수 있다. 일반적으로, 치료되는 대상은 중등도 내지 중증 IBD, 중등도 내지 중증 UC, 또는 중등도 내지 중증 크론병에 걸렸을 것이다.
- <175> 또한, 대상은 스테로이드-불응성 및/또는 스테로이드 의존성 IBD, 스테로이드-불응성 및/또는 스테로이드 의존성 UC, 또는 스테로이드-불응성 및/또는 스테로이드 의존성 크론병을 앓을 수 있다.
- <176> 본원에서 치료되는 대상은 스크리닝 시 6개월 이상 IBD로 진단되었거나; S자형 결장경 스크리닝 시 20 cm 이상의 활성 질환을 앓거나; 6점 이상 내지 11점 이하의 DAI 점수, 2점 이상의 직장 출혈 및 2점 이상의 가요성 S자형 결장경으로 정의되는 활성 질환을 앓거나; 스크리닝하기 전 2년 이내에 UC용 경구 코르티코스테로이드로 치료되었거나; 2주 이상의 기간 동안 20 mg/일의 프레드니손 당량 용량을 초과하는 강도로 치료되었거나; 이태너셉트, 인플릭시맵 또는 아달리무맵에 저항성 또는 불응성이거나; 안정적인 용량의 아미노살리실레이트로 3주 이상 동안 치료되었거나; 안정적인 용량의 경구 코르티코스테로이드 용량으로 2주 이상 동안 치료되었거나; 6-MP로 3개월 기간 동안, 안정적인 용량으로 4주 이상 동안 치료되었거나; 아자티오프린으로 3개월 기간 동안, 안정적인 용량으로 4주 이상 동안 치료되었을 수 있다.
- <177> 중등도 내지 중증의 활성 UC 대상의 표준 관리는 표준 용량의 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및/또는 아자티오프린으로의 치료법을 수반한다. 본원에 개시된 CD20 항체로의 치료법으로는 이같은 대상의 표준 관리로 달성되는 것보다 우수한, 질환 완화 (질환의 신속한 제어 및/또는 장기간의 완화), 및/또는 임상 응답에서의 개선이 초래될 것이다.
- <178> 항체의 투여로 질환 완화가 초래될 수 있고, 예를 들어 질환 완화가 약 8주에 또는 약 8주까지 달성될 수 있다. 바람직하게는, 질환 완화까지의 시간이 CD20 항체로 치료되지 않은 대상에서 달성되는 것보다 더 짧다. 또한, 바람직하게는, 완화 기간이 CD20 항체로 치료되지 않은 대상에서 달성되는 것보다 더 길다. 예를 들어, 완화 기간이 최초 치료로부터 또는 완화의 달성으로부터 약 24주 이상, 바람직하게는 약 48주 이상, 가장 바람직하게는 약 2년 이상일 수 있다. 완화는 0점 또는 1점의 S자형 결장경 점수, 및/또는 0점의 직장 출혈 점수로 정의될 수 있다.
- <179> 항체의 투여로 임상 응답이 초래될 수 있고, 예를 들어 임상 응답이 약 8주에 또는 약 8주까지 달성될 수 있다. 본원에서의 임상 응답은 질환 활성 지수 (DAI) 점수에서의 감소, 예를 들어, 이러한 점수에서의 3점 이상의 감

소로 정의될 수 있다.

- <180> 한 실시양태에서, 대상은 이전에 CD20 항체로 치료되지 않았다. 바람직하게는, 대상은 B 세포 악성 종양을 앓고 있지 않다. 또한 바람직하게는 대상은 IBD, UC, 또는 크론병 이외의 자가면역 질환을 앓고 있지 않은 대상이다.
- <181> 질환 활성 지수 (DAI) 점수를 감소시키는데 효과적인 양으로 대상에게 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 활성 궤양성 결장염 (UC)의 인간 대상에서 DAI 점수를 감소시키는 방법이 또한 제공된다. 바람직하게는, DAI 점수매김 시스템은 본원의 표 2에서와 같고, CD20 항체의 투여는 이같은 DAI 점수를 3점 이상 감소시킨다.
- <182> 추가로, 상기 방법은 핵주변 항-호중구 세포질 항체 (p-ANCA) 및/또는 항-인간 트로포마이오신 이소형 5 (hTM5) 자가항체 수준(들)이 비전형적인 인간 대상에서 활성 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하는 것을 수반한다. 대상에게 CD20 항체를 투여하는 것은 대상에서의 p-ANCA 및/또는 항-hTM5 항체 수준(들)을 효과적으로 감소시킨다.
- <183> 정확한 용량은 치료될 용태의 성질 및 중증도, 길항제 또는 항체의 유형, 대상의 소질 등을 고려하여 임상 의에 의해 허용된 표준에 따라 결정될 것이다. 용량의 결정은 당업자의 수준 내에 속한다. 바람직하게는, 항체는 전신, 정맥내, 또는 피하 투여된다. 투여 경로 및 방법에 따라, 길항제 또는 항체는 단일 용량으로, 장기간의 주입으로, 또는 장기간에 걸쳐 간헐적으로 투여될 수 있다. 일반적으로 정맥내 투여는 볼루스 주사 또는 1시간 내지 수시간의 전형적인 기간에 걸친 주입에 의해 이루어질 수 있다. 서방성 방출 제형이 사용될 수 있다.
- <184> 바람직한 실시양태에서, 방법은 약 200 mg 내지 2000 mg, 바람직하게는 약 500 mg 내지 1500 mg, 가장 바람직하게는 약 750 mg 내지 1200 mg 범위의 1회 이상의 용량을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 1회 내지 4회의 용량, 또는 단지 1회 또는 2회의 용량이 투여될 수 있다. 이러한 실시양태에 따라, 항체는 약 1개월의 기간 이내에, 바람직하게는 약 2 내지 3주의 기간 이내에, 가장 바람직하게는 약 2주의 기간 이내에 투여될 수 있다.
- <185> 1회를 초과하는 용량이 투여되는 경우, 나중의 용량 (예를 들어, 2차 용량 또는 3차 용량)은 이전 용량이 투여된 시간으로부터 바람직하게는 약 1일 내지 20일, 더욱 바람직하게는 약 6일 내지 16일, 가장 바람직하게는 약 14일 내지 16일에 투여된다. 개별적인 용량들은 바람직하게는 약 1일 내지 4주, 더욱 바람직하게는 약 1일 내지 20일의 전체 기간 (예를 들어, 6일-18일의 기간) 내에 투여된다. 항체의 각각의 이러한 개별적인 용량은 바람직하게는 약 200 mg 내지 2000 mg, 더욱 바람직하게는 약 500 mg 내지 1500 mg, 가장 바람직하게는 약 750 mg 내지 1200 mg이다.
- <186> 그러나, 상기 언급된 바와 같이, 이러한 권고량의 길항제 또는 항체는 다량의 치료적 재량에 적용된다. 적합한 용량의 선택 및 일정계획에서의 주요 요인은, 상기 지시된 바와 같이, 수득된 결과이다. 예를 들어, 비교적 더 높은 용량이 활성 IBD의 치료를 위해 초기에 필요할 수 있다. 후속 용량이 초기 용량보다 높을 수 있다. 가장 효과적인 결과를 수득하기 위해, 일반적으로 길항제 또는 항체가 최초의 징후, 진단, 외관, 또는 질환 또는 장애의 출현에 가능한 한 가깝게 또는 질환 또는 장애의 완화 동안 투여된다.
- <187> 따라서, 본 발명은 오직 1회 또는 2회 용량의 CD20 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 1회 또는 2회 용량의 CD20 항체의 투여시 질환 완화 또는 임상 응답이 달성되는, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 이같은 1회 또는 2회 용량은 정맥내 (IV), 또는 피하 (SQ) 투여된다. 2회의 정맥내 용량이 투여되는 경우, 바람직하게는 2회 용량 각각은 약 200 mg 내지 약 2000 mg 범위이다.
- <188> 길항제 또는 항체는 비경구 투여, 피하 투여, 복강내 투여, 폐내 투여, 흡입 투여, 수막강내 투여, 관절내 투여 및 비강내 투여, 그리고 국소 면역억제 치료를 원하는 경우 병변내 투여가 포함되는 임의의 적절한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 또한, 길항제 또는 항체는, 예를 들어, 항체의 용량을 감소시키면서, 펄스 주입에 의해 적절하게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여가 단시간 또는 만성인지 여부에 부분적으로 좌우되면서, 투여는 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공된다.
- <189> 1회를 초과하는 노출 또는 셋트의 용량, 예컨대 길항제 또는 항체의 약 2회 이상의 노출, 예를 들어, 약 2회 내지 60회의 노출, 더욱 특히 약 2회 내지 40회의 노출, 가장 바람직하게는 약 2회 내지 20회의 노출을 제공하는 것에 의한 것과 같이, 대상은 길항제 또는 항체로 재치료될 수 있다.
- <190> 한 실시양태에서, 질환의 징후 또는 증상이 돌아올 때, 대상이 더 이상 완화되지 않을 때, 및/또는 p-ANCA 또는 항-hTM5 자가항체 수준이 상승될 때 등의 때에 임의의 재치료가 제공될 수 있다.

- <191> 또다른 실시양태에서, 규정된 간격으로 임의의 재치료가 제공될 수 있다. 예를 들어, 후속 노출이 다양한 간격, 예를 들어, 약 24-28주 또는 48-56주 또는 그 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 이같은 노출은 각각 약 24-26주 또는 약 38-42주, 또는 약 50-54주의 간격으로 투여된다.
- <192> 한 실시양태에서, 각각의 길항제 또는 항체 노출은 단일 용량의 길항제 또는 항체로 제공된다. 별법의 실시양태에서, 각각의 길항제 또는 항체 노출은 별도의 용량의 항체로서 제공된다. 그러나, 길항제 또는 항체 노출마다 단일 용량 또는 별도의 용량으로 제공될 필요는 없다.
- <193> 바람직한 길항제는 항체이다. 본원에 기재된 방법에서, CD20 항체는 순수한 항체일 수 있거나, 또는 또다른 분자 예컨대 세포독성제 또는 사이토카인에 접합될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 무손상 순수한 항체이다. 본원에서 바람직한 CD20 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 CD20 항체이고, 더욱 바람직하게는 리툽시맵, 인간화 2H7, 2F2 (HuMax-CD20) 인간 CD20 항체 (Genmab), 인간화 A20 항체 (Immunomedics)이다. 리툽시맵 또는 인간화 2H7가 더욱 더 바람직하다.
- <194> 본원에서의 모든 방법의 추가적인 실시양태에서, 대상은 이전에 약물(들), 예컨대 IBD를 치료하는 작용제로 치료되지 않았고/않았거나, 이전에 B-세포 표면 마커에 대한 길항제 또는 항체로 치료되지 않았다 (예를 들어, 이전에 CD20 항체로 치료되지 않았다).
- <195> 임의의 본원에서의 방법에서, B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 또는 항체와 함께 유효량의 제2 의약을 대상에게 투여할 수 있다 (이때 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 또는 항체 (예를 들어, CD20 항체)가 제1 의약이다). 이같은 제2 의약의 유형은 IBD의 유형, IBD의 중증도, 대상의 상태 및 연령, 사용된 제1 의약의 유형 및 용량 등이 포함되는 다양한 요인에 좌우된다.
- <196> 이같은 추가적인 의약 또는 기타 치료법의 예로는 IBD를 치료하는 또다른 작용제, 화학요법제, 인터페론 클래스 약물 예컨대 인터페론-알파 (예를 들어, Amarillo Biosciences, Inc.의 제품), IFN-베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 또는 IFN-베타-1b (BETASERON®), 올리고핵티드 예컨대 글라티라머 아세테이트 (COPAXONE®), CD40-CD40 리간드를 차단하는 작용제, 세포독성제 (예컨대 미토산트론 (NOVANTRONE®), 메토티렉세이트, 시클로포스파미드, 클로람부실, 레플루노미드, 및 아자티오프린), 1종 이상의 면역억제제 (예를 들어 아자티오프린, 6-메르캅토피린, 시클로스포린), 정맥내 면역글로불린 (감마 글로불린), 림프구-결핍 요법 (예를 들어, 미토산트론, 시클로포스파미드, CAMPATH™ 항체, 항-CD4, 클라드리빈), 자가반응성 B-세포의 Ig 수용체가 특이적으로 인식하는 면역제거 자가반응성 항원 또는 이의 단편을 포함하는 2개 이상의 도메인이 있는 폴리펩티드 구조물 (WO 2003/68822), 전신 방사선조사, 골수 이식, 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체 예컨대 에팔리주맵 (RAPTIV A®) (Genentech 시판), 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 나탈리주맵 (ANTEGREN®) (Biogen Idec 시판), 또는 상기 언급된 것들), 스테로이드 예컨대 코르티코스테로이드 (예를 들어, 메틸프레드니솔론 예컨대 주사용 SOLU-MEDROL™ 메틸프레드니솔론 소듐 숙시네이트, 프레드니손 예컨대 저용량 프레드니손, 텍사메타손, 또는 글루코코르티코이드 (전신성 코르티코스테로이드 요법 포함)), 비-림프구-결핍 면역억제 요법 (예를 들어, MMF 또는 시클로스포린), "스타틴" 클래스의 콜레스테롤-저하 약물 (세리바스타틴 (BAYCOL™), 플루바스타틴 (LESCOL™), 아토르바스타틴 (LIPITOR™), 로바스타틴 (MEVACOR™), 프라바스타틴 (PRAVACHOL™), 및 심바스타틴 (ZOCOR™) 포함), 에스트라디올, 테스토스테론 (임의로 상승된 투여량; [Stuve et al., Neurology 8:290-301 (2002)]), 안드로겐, 호르몬-대체 요법, TNF 억제제 예컨대 이태너셉트 (ENBREL®), 인플릭시맵 (REMICADE®), 및 아달리무맵 (HUMIRA™), 질환-변형 항-류머티스 약물 (DMARD), 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID), 혈장분리반출술 또는 혈장 교환, 트리메토프림-슈파메톡사졸 (BACTRIM™, SEPTRA™), 마이코페놀레이트 모페틸, H2-차단제 또는 양성자-펌프 억제제 (잠재적으로 궤양유발성인 면역억제 요법을 사용하는 동안), 레보티록신, 시클로스포린 A (예를 들어 SANDIMMUNE®), 소마타스타틴 유사체, 사이토카인, 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 항체 또는 길항제, 항대사물질, 재할 수술 또는 결장절제술, 방사성요오드, 갑상선절제술, BAFF 길항제 예컨대 BAFF 또는 BR3 항체 또는 면역부착소, 항-CD40 수용체 또는 항-CD40 리간드 (CD154), 항-IL-6 수용체 길항제 또는 항체, 항-IL-2 항체 예컨대 다클리주맵, 리툽시맵과 함께 또다른 B-세포 표면 길항제 또는 항체 예컨대 인간화 2H7 또는 기타 인간화 또는 인간 CD20 항체, 경구 코르티코스테로이드 (예를 들어 CD20 항체 또는 길항제로의 최초 치료 전 2년 이내), 프레드니손 (예를 들어, 2주 이상의 기간 동안 20 mg/일의 프레드니손 당량 용량), 이태너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 아미노살리실레이트 (예를 들어 3주 이상 동안의 안정적인 용량), 경구 코르티코스테로이드 (예를 들어 2주 이상 동안의 안정적인 용량), 6-MP (예를 들어, 4주 이상 동안의 안정적인 용량으로 3개월 동안 치료), 아자티오프린 (예를 들어, 4주 이상 동안의 안정적인 용량으로 3개월 동안 치료), 칼시네우린 억제제, 시클로스포린, 타크로리무스, 시로리무스, 메토티렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 국소용 직장 제제, 비-생물학적 세포-결핍 요법 예컨대 ADACOLUMN®, 항생제, 지사제, 담즙산 결

합제 예컨대 콜레스티라민, 경구 및/또는 국소용 5-ASA, 경구 및/또는 국소용 스테로이드, MLN-02, 메살라민, 코르티손 크림, 히드로코르티손 관장제, 술과살라진, 알살라진, 발살라지드, 메틸프레드니솔론, 히드로코르티손, ACTH, 정맥내 코르티코스테로이드, GELTEX™ (Genzyme), 항-CD3 항체 예컨대 비실리주맵 (NUVION®), OPC-6535, CBP 1011, 탈리도미드, ISIS 2302, BXT-51072, 성장 인자 예컨대 각질형성세포 성장 인자-2 (KGF-2; REPIFERMIN™), RPD-58, 안테그렌, FK-506 등이 포함된다.

<197> 바람직한 제2 의약에는 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및 아자티오프린 중 1개, 2개, 3개 또는 4개가 포함된다.

<198> 본원에서의 "조합 요법"의 한 바람직한 방법에서, 본 발명은 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 대상에게 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP) 및 아자티오프린으로 구성된 군으로부터 선택된 유효량의 제2 의약을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 활성 염증성 장 질환 (IBD)에 걸린 인간 대상에서 IBD를 치료하는 방법에 관한 것이다.

<199> 본원에서 사용된 "제2 의약"이라는 표현은 이것이 각각 제1 의약 이외의 유일한 의약이라는 것을 의미하지 않도록, 모든 이러한 제2 의약은 서로 조합되어 또는 단독으로 제1 의약과 함께 사용될 수 있다. 따라서, 제2 의약은 1종의 약물일 필요가 없고, 1종을 초과하는 이같은 약물로 구성되거나 이를 포함할 수 있다.

<200> 본원에 기재된 바와 같은 이러한 제2 의약은 기존에 사용된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 기존에 사용된 투여량의 1 내지 99%로 일반적으로 사용된다. 이같은 제2 의약이 임의로 조금이라도 사용되는 경우, 이에 의해 야기되는 부작용을 제거하거나 감소시키도록, 이는 제1 의약이 존재하지 않는 것보다 낮은 양으로 사용된다 (특히 제1 의약의 최초 투여 후에 후속 투여될 때). 예를 들어, 본원에서의 CD20 항체로의 치료법은 스테로이드 투여가 점점 감소되거나 중단되도록 한다.

<201> 본원에서의 조합 투여는 별도의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하는 공동-투여, 및 임의 순서의 연속 투여를 포함하고, 이때 바람직하게는 양쪽 (또는 모든) 활성 작용제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 존재한다.

<202> 본원에서의 재치료 방법을 위해, 제2 의약이 항체 세트의 용량들과 함께 유효량으로 투여되는 경우, 이는 임의 세트의 용량과 함께, 예를 들어, 오직 한 세트의 용량과 함께, 또는 1회를 초과하는 세트의 용량과 함께 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 의약은 최초 세트의 용량과 함께 투여된다. 또다른 실시양태에서, 제2 의약은 최초 및 2차 세트의 용량과 함께 투여된다. 또다른 실시양태에서, 제2 의약은 모든 세트의 용량과 함께 투여된다.

<203> 제2 의약의 조합 투여는 별도의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하는 공동-투여 (동시 투여), 및 임의 순서의 연속 투여를 포함하고, 이때 바람직하게는 양쪽 (또는 모든) 활성 작용제 (의약)가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 존재한다.

<204> 본원에서의 항체 또는 길항제는 비경구, 국소, 피하, 복강내, 폐내, 비강내 및/또는 병변내 투여가 포함되는 임의의 적절한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내 (i.v.), 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 경맥내 투여가 또한 구현된다 (예를 들어, [미국 특허 출원 2002/0009444 (Grillo-Lopez), [A concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody] 참조). 또한, 항체 또는 길항제는, 예를 들어, 항체 또는 길항제의 용량을 감소시키면서, 펄스 주입에 의해 적절하게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 정맥내 또는 피하 투여에 제공되고, 더욱 바람직하게는 정맥내 주입(들)에 의해 제공된다.

<205> 다중 세트의 용량의 항체가 제공되는 경우, 각 세트의 용량을 동일하거나 상이한 투여 수단을 사용하여 제공할 수 있다. 한 실시양태에서, 각 세트의 용량은 정맥내 투여에 의해 제공된다. 또다른 실시양태에서, 각 세트의 용량은 피하 투여에 의해 제공된다. 또다른 실시양태에서, 각 세트의 용량은 정맥내 및 피하 투여 모두에 의해 제공되고, 항체는 동일하거나 상이할 수 있다.

<206> 이같은 길항제 및 항체의 생산, 변형, 및 제형 방법의 논의가 하기에 이어진다.

<207> III. 길항제 및 항체의 생산

<208> 본 발명의 방법 및 물품은 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 또는 항체를 사용하거나, 또는 이러한 길항제 또는 항체가 혼입된다. 따라서, 이같은 항체의 생성 방법이 하기에 기술될 것이다.

<209> 길항제 또는 항체의 생산 또는 스크리닝에 사용될 B-세포 표면 마커는, 예를 들어, 원하는 에피토프를

함유하는, 가용성 형태의 항원, 또는 이의 일부일 수 있다. 별법으로 또는 추가로, B-세포 표면 마커를 세포 표면에 발현하는 세포를 사용하여 길항제 또는 항체를 생성시키거나 이를 스크리닝할 수 있다. 길항제 또는 항체의 생성에 유용한 다른 형태의 B 세포 표면 마커는 당업자에게 명백할 것이다. 바람직하게는, B-세포 표면 마커는 CD20 항원이다.

<210> 바람직한 길항제는 항체이지만, 항체 이외의 길항제가 본원에서 구현된다. 예를 들어, 길항제는 세포독성제 (예컨대 본원에 기술된 것들)에 임의로 융합 또는 접합된 소형 분자 길항제를 포함할 수 있다. 항원에 결합하는 소형 분자를 확인하기 위해, 소형 분자의 라이브러리를 본원에서의 당해 B-세포 표면 마커에 대해 스크리닝할 수 있다. 소형 분자는 추가로 길항성 성질에 대해 스크리닝되고/되거나 세포독성제에 접합될 수 있다.

<211> 또한 길항제는 합리적인 디자인에 의해 또는 파지 디스플레이 (예를 들어, 1998년 8월 13일 공개된 WO 98/35036 참조)에 의해 생성된 펩티드일 수 있다. 한 실시양태에서, 선택된 분자는 항체의 CDR을 기초로 디자인된 "CDR 모방체(mimic)" 또는 항체 유사체일 수 있다. 이같은 펩티드 자체가 길항성일 수 있지만, 펩티드의 길항성 성질을 부가하거나 증강시키도록 펩티드가 세포독성제에 임의로 융합될 수 있다.

<212> 본 발명에 따라 사용되는 항체의 생산을 위한 예시적인 기술이 하기에 기술된다.

<213> (i) 폴리클로날 항체

<214> 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 애주번트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (라이신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (식중, R 및 R^1 은 상이한 알킬기이다)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키흔 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

<215> 예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3배 용량의 프로인트 완전 애주번트와 합하고, 이 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써, 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 동물들을 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 애주번트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 혈청을 분석한다. 역가가 정체기(plateau)에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교결합 시약을 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅시킨다. 접합체는 또한 제조할 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 응답을 증강시킨다.

<216> (ii) 모노클로날 항체

<217> 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득되고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 개별적인 항체들의 혼합물이 아닌 것으로 항체의 특징을 가리킨다.

<218> 예를 들어, 모노클로날 항체는 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 제조할 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567)으로 제조할 수 있다.

<219> 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 상기 기술한 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 별법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포가 형성된다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).

<220> 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 어버이 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적절한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 어버이 골수종 세포에 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

<221> 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산

을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 마우스 골수종 세포주, 예컨대 [Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California USA)]로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 [American Type Culture Collection (Rockville, Maryland USA)]으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 또한, 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 기술되어 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

<222> 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관 내 결합 분석법, 예컨대 방사선면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)으로 측정한다.

<223> 모노클로날 항체의 결합 친화력은, 예를 들어, [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석법에 의해 결정할 수 있다.

<224> 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

<225> 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

<226> 모노클로날 항체는 재조합적으로 또한 생산될 수 있다. 통상적인 방법 (예를 들어, 마우스 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 쉽게 분리하고 서열분석한다. 하이브리도마 세포는 이같은 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 분리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이를 형질감염되지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 생산을 수득한다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 리뷰 논문에는 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992)]이 포함된다.

<227> 추가적인 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기술된 기술을 사용하여 항체 파지 라이브러리로부터 분리할 수 있다. [Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)]에는 파지 라이브러리를 사용한 마우스 및 인간 항체의 단리가 각각 기술되어 있다. 후속적인 문헌들에는 사슬 서플링에 의한 고친화력 (nM 범위) 인간 항체의 생산 ([Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783(1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 ([Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266(1993)])이 기술되어 있다. 따라서, 이러한 기술들은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.

<228> 또한, 예를 들어, 상동성 마우스 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 4,816,567; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 DNA를 변형시킬 수 있다.

<229> 전형적으로, 이같은 비-면역글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 한 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체가 생성된다.

<230> (iii) 인간화 항체

<231> 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 추가변 영역을 인간 항

체의 상응하는 서열에 대해 치환함으로써 Winter 및 공동 연구자의 방법 ([Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)])에 따라 본질적으로 수행할 수 있다. 따라서, 이같은 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인 보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

<232> 인간화 항체를 제조하는데 사용되는 인간 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 모두)을 선택하는 것은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "베스트-핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로서 허용한다 ([Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또다른 방법에서는 경쇄 또는 중쇄의 특정 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 다수의 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).

<233> 항원에 대한 높은 친화성 및 기타 유리한 생물학적 성질을 유지시키면서 항체를 인간화시키는 것이 또한 중요하다. 이러한 목적을 이루기 위해, 바람직한 방법에 따라, 어버이 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 어버이 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 프로세스에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 당업자가 이용가능하고, 이들에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이러한 디스플레이들의 정밀검사로 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성이 달성되도록 수용자 및 수입 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 조합시킬 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역은 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 관여한다.

<234> (iv) 인간 항체

<235> 인간화의 대안으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉(trnsgenic) 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제되는 것으로 기술되었다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 이같은 생식계열 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접촉시 인간 항체가 생산될 것이다. 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)]; 및 미국 특허 5,591,669, 5,589,369, 5,545,807 참조.

<236> 별법으로, 파지 디스플레이 기술 ([McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)])을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내에서 생산할 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 M13 또는 fd와 같은 섬유상 박테리오파지의 주요 또는 소수 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임(in-frame) 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로 디스플레이된다. 섬유상 입자가 파지 계능의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 성질을 기초로 하는 선택으로 이러한 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자가 선택된다. 따라서, 파지는 B-세포의 성질을 일부 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 이의 개관을 위해서는, 예를 들어, [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)] 참조. V-유전자 절편의 다양한 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이가 단리되었다. 본질적으로 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기술된 기술에 따라, 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체를 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 5,565,332 및 5,573,905 참조.

<237> 또한 인간 항체는 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조).

- <238> (v) 항체 단편
- <239> 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이러한 단편들은 무손상 항체의 단백질을 분해성 분해를 통해 유도되었다 (예를 들어, [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편이 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편이 형성될 수 있다 ([Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편이 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 기타 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 또다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조. 또한 항체 단편은, 예를 들어, 미국 특허 5,641,870에 기술된 것과 같이, "선형 항체"일 수 있다. 이같은 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.
- <240> (vi) 이중특이적 항체
- <241> 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 대표적인 이중특이적 항체는 B-세포 표면 마커의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 또다른 이같은 항체는 제1 B-세포 표면 마커에 결합할 수 있고, 추가로 제2 B-세포 표면 마커에 결합할 수 있다. 별법으로, 세포성 방어 메카니즘이 B 세포에 집중되도록, 항-B 세포 표면 마커 결합 팔(arm)이 Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) 및 Fc γ RIII (CD16)과 같은 IgG에 대한 Fc 수용체 (Fc γ R), 또는 T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2 또는 CD3)와 같은 백혈구 상의 촉발 분자에 결합하는 팔과 조합될 수 있다. 또한 이중특이적 항체를 사용하여 세포독성제를 B-세포에 국소화시킬 수 있다. 이러한 항체들은 B-세포 표면 마커-결합 팔, 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론- α , 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토타렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 팔을 갖는다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.
- <242> 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현을 기초로 하고, 여기서 두 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 ([Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성으로 인해, 이러한 하이브리도마 (쿼드로마(quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하고, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.
- <243> 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 적어도 일부의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이 바람직하다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체, 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA들을 별도의 발현 벡터에 삽입하고, 적절한 숙주 세포 내로 공-형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 동등하지 않은 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2개 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우 또는 비율이 특별한 의미를 갖지 않는 경우, 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입할 수 있다.
- <244> 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 팔 내의 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른쪽 팔 내의 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하여 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터의 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 발견되었다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성을 위한 추가적인 상세한 내용은, 예를 들어, [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)] 참조.
- <245> 미국 특허 5,731,168에 기재된 또다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의

CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동(cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

<246> 이종특이적 항체에는 가교결합된 또는 "이종접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이같은 항체들은, 예를 들어, 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해서 (미국 특허 4,676,980), 그리고 HIV 감염의 치료를 위해서 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 다수의 가교결합 기술과 함께, 적절한 가교결합체는 당업계에 주지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

<247> 항체 단편으로부터 이종특이적 항체를 생성시키는 기술 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이종특이적 항체를 제조할 수 있다. [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단시켜 F(ab')₂ 단편을 생성시키는 방법이 기술되어 있다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시켜 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이종특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이종특이적 항체를 효소의 선택적 고정을 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

<248> 최근의 진보로 대장균으로부터의 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수가 용이해졌고, 이를 화학적으로 커플링시켜 이종특이적 항체를 형성시킬 수 있다. [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에는 완전히 인간화된 이종특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산이 기술되어 있다. 각각의 Fab' 단편이 대장균으로부터 별도로 분비되었고, 시험관내에서 지향성으로 화학적 커플링되어, 이종특이적 항체가 형성되었다. 이렇게 형성된 이종특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상적인 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

<249> 제조할 세포 배양물로부터 직접적으로 이종특이적 항체 단편을 제조 및 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이종특이적 항체를 생산하였다. [Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결하였다. 항체 동종이량체의 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성시킨 후, 다시 산화시켜 항체 이종이량체를 형성시켰다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편의 별법의 제조 메카니즘을 제공하였다. 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인이 쌍을 이루게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또다른 단편의 상보적인 V_H 및 V_L 도메인과 쌍을 이루도록 강요됨으로써, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이종특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또다른 전략이 또한 보고되었다. [Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참조.

<250> 2가를 초과하는 항체도 구현된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)].

<251> IV. 길항제 또는 항체의 접합체 및 기타 변형

<252> 본원의 방법에서 사용된 또는 본원의 제조품 내에 포함된 길항제 또는 항체는 또다른 작용제, 예컨대 세포독성제, 또는 사이토카인 (예를 들어 IL2; 예를 들어, WO2005/016969 참조)에 임의로 접합될 수 있다.

<253> 접합은 공유 결합을 통해 통상적으로 달성될 것이고, 공유 결합의 정확한 성질은 CD20 길항제 또는 항체 폴리펩티드 상의 연결 부위 및 표적화 분자에 의해 결정될 것이다. 전형적으로, CD20 길항제 또는 항체에 이의 아미노산 측쇄, 탄수화물 사슬, 또는 화학적 변형에 의해 CD20 길항제 또는 항체 상에 도입된 반응성 기를 통해 접합되도록 하는 링커의 부가에 의해 비-펩티드성 작용제가 변형된다. 예를 들어, 라이신 잔기의 ε-아미노기를 통해, 유리 α-아미노기를 통해, 시스테인 잔기에 대한 디설피드 교환에 의해, 또는 슈프(Schiff)-염기 연결을 통해 다양한 친핵체를 함유하는 약물이 부착되도록 하는 과요오드산으로의 탄수화물 사슬 내의 1,2-디올의 산화

에 의해 약물이 부착될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,256,833 참조. 단백질 변형제에는 아민-반응성 시약 (예를 들어, 반응성 에스테르, 이소티오시아네이트, 알데히드, 및 술포닐 할라이드), 티올-반응성 시약 (예를 들어, 할로아세틸 유도체 및 말레이미드), 및 카르복실산- 및 알데히드-반응성 시약이 포함된다. CD20 길항제 또는 항체 폴리펩티드는 이관능성 가교 시약의 사용을 통해 펩티드성 작용제에 공유결합으로 연결될 수 있다. 이중이관능성 시약이 더욱 통상적으로 사용되고, 2개의 상이한 반응성 모이어티 (예를 들어, 아민-반응성 + 티올, 요오도아세트아미드, 또는 말레이티드)의 사용을 통해 2개의 상이한 단백질의 제어된 커플링을 허용한다. 이같은 연결제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, [Brinkley, 상기 문헌], 및 미국 특허 4,671,958 참조. 펩티드성 링커가 또한 사용될 수 있다. 별법으로, CD20 길항제 또는 항체 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 제조를 통해 펩티드성 모이어티에 연결될 수 있다.

<254> 추가적인 이관능성 단백질 커플링제의 예로는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디아소시아네이트 (예컨대 툴리엔 2,6-디아소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)이 포함된다.

<255> 별법으로, 예를 들어, 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 길항제 또는 항체 및 작용제를 포함하는 융합 단백질을 제조할 수 있다.

<256> 길항제 또는 항체의 또다른 변형이 본원에서 구현된다. 예를 들어, 길항제 또는 항체는 다양한 비-단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다.

<257> 본원에 개시된 길항제 또는 항체는 리포솜으로 또한 제형화될 수 있다. 길항제 또는 항체를 함유하는 리포솜은 당업계에 공지된 방법에 의해, 예컨대 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 1997년 10월 23일 공개된 W097/38731에 기술된 바와 같이 제조된다. 순환 시간이 증강된 리포솜이 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.

<258> 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 규정된 세공 크기의 필터를 통해 리포솜을 압출하여 원하는 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 디설파이드 상호교환 반응을 통해 [Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)]에 기술된 바와 같이 본 발명의 항체의 Fab' 단편이 리포솜에 접합될 수 있다. 화학요법제가 리포솜 내에 임의로 함유될 수 있다. [Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989)] 참조.

<259> 본원에 기술된 단백질 또는 펩티드 길항제 또는 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 구현된다. 예를 들어, 이것은 길항제 또는 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 성질을 개선시키는데 바람직할 수 있다. 길항제 또는 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이같은 변형에는, 예를 들어, 길항제 또는 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환이 포함된다. 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달되고, 단, 최종 구축물은 원하는 특성을 갖는다. 또한 아미노산 변화는 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 길항제 또는 항체의 번역후 프로세스를 변경시킬 수 있다.

<260> 돌연변이 유발에 바람직한 위치인 길항제 또는 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위해 유용한 방법은, [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기술된 바와 같이 "알라닌-스캐닝 돌연변이유발"으로 칭해진다. 여기서, 표적 잔기들의 잔기 또는 기가 확인되고 (예를 들어, Arg, asp, His, lys 및 Glu와 같은 대전 잔기), 중성 또는 음으로 대전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어, 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치를 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서 돌연변이의 성과를 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 항체 변이체들을 원하는 활성에 대해 스크리닝한다.

<261> 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복시 말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 길항제 또는 항체, 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 길항제 또는 항체가 포함된다. 길항제 또는 항체 분자의 다른 삽입 변이체에는 길항제 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소가 길항제 또는 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것이 포함된다.

<262> 또다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체는 길항제 또는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된 것이다. 항체 길항제의 치환 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 구현된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환"이라는 표제 하에 표 4에 제시된다. 이같은 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 표 4에서 "대표적 치환"으로 명명된, 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기술되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

표 4

<263>

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

<264> 길항제 또는 항체의 생물학적 성질에 있어서의 실질적인 변화는 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상과 같은, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조; (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지하는 것에 대한 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 수행된다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기 군으로 분류된다::

<265> (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

<266> (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

<267> (3) 산성: asp, glu;

<268> (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

<269> (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

<270> (6) 방향족: trp, tyr, phe.

<271> 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환함으로써 이루어질 것이다.

- <272> 길항제 또는 항체의 적당한 형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스템인 잔기가, 일반적으로 세린으로, 또한 치환되어 분자의 산화적 안정성이 개선되고 비정상적인 가교결합이 방지될 수 있다. 역으로, 시스템인 결합(들)이 길항제 또는 항체에 부가되어 이의 안정성이 개선될 수 있다 (특히, 길항제 또는 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).
- <273> 특히 바람직한 유형의 치환 변이체에는 어버이 항체의 1개 이상의 추가변 영역 잔기가 치환되는 것이 수반된다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 유래되는 어버이 항체에 비해 생물학적 성질이 개선될 것이다. 이같은 치환 변이체를 생성시키는 간편한 방법은 파지 디스플레이를 이용한 친화성 성숙이다. 간략하게, 몇몇 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성시킨다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 섬유상 파지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 기술된 바와 같이 이의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형에 대한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이 유발법을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 사이의 접촉 위치를 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보물이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체 패널을 본원에 기술된 바와 같이 스크리닝하고, 1종 이상의 관련 분석법에서 탁월한 성질을 갖는 항체를 추가적인 개발용으로 선택할 수 있다.
- <274> 길항제 또는 항체의 아미노산 변이체의 또다른 유형은 길항제 또는 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경은 길항제 또는 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 길항제 또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.
- <275> 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (식중 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신 또한 사용될 수 있다.
- <276> 길항제 또는 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 길항제 또는 항체가 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 이루어진다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 길항제 또는 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- <277> 길항제 또는 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙형 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 2003/0157108 A1 (Presta, L)에 기술되어 있다. 미국 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)를 또한 참조. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 W003/011878 (Jean-Mairet 등) 및 미국 특허 6,602,684 (Umana 등)에 참조되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내의 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 W097/30087 (Patel 등)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 W098/58964 (Raju, S.) 및 W099/22764 (Raju, S.) 참조.
- <278> 본원에서의 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 없는 Fc 영역을 포함한다. 이같은 변이체는 ADCC 기능이 개선된다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 더욱 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 유(Eu) 번호매김)에서의 치환을 추가로 포함할 수 있다. "푸코스제거된(defucosylated)" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 관련된 문헌의 예로는 미국 특허 출원 2003/0157108 A1 (Presta, L); WO 00/61739A1; W001/29246A1; 미국 2003/0115614A1; 미국 2002/0164328A1; 미국 2004/0093621A1; 미국 2004/0132140A1; 미국 2004/0110704A1; 미국 2004/0110282A1; 미국 2004/0109865A1; W003/085119A1; W003/084570A1; [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)]이 포함된다. 푸코스제거된 항체를 생산하는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 ([Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams 등), 특히 실시예 11),

및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자 *FUT8*이 녹아웃된 CHO 세포 ([Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)])가 포함된다.

- <279> 길항제 또는 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 분리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 길항제 또는 항체의 카세트 돌연변이유발이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- <280> 이펙터 기능과 관련하여, 예를 들어, 길항제 또는 항체의 항원-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체의존성 세포독성 (CDC)이 증강되도록, 본 발명의 길항제 또는 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체 길항제의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 시스템인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입함으로써, 이러한 영역 내에 사슬간 디설파이드 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포형 세포독성 (ADCC)를 가질 수 있다. [Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)] 참조. [Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같은 이중이관능성 가교제를 사용하여 항-종양 활성이 증강된 동종이량체 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작함으로써 보체 용해 및 ADCC 능력을 증강시킬 수 있다. [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)] 참조.
- <281> W000/42072 (Presta, L.)에는 인간 이펙터 세포의 존재 하에 ADCC 기능이 증강된 항체가 기술되어 있고, 이 항체는 Fc 영역 내에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, ADCC가 개선된 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에서의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 1개, 2개 또는 3개의 이러한 위치에서의 치환을 포함하는 또는 이러한 치환으로 구성되는 인간 IgG1 Fc 영역이다. 이같은 치환은 C1q 결합 및/또는 CDC를 증가시키는 치환(들)과 임의로 조합된다.
- <282> C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 변경된 항체가 W099/51642, 미국 특허 6,194,551B1, 미국 특허 6,242,195B1, 미국 특허 6,528,624B1 및 미국 특허 6,538,124 (Idusogie 등)에 기술되어 있다. 항체는 이의 Fc 영역의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334 (잔기의 유 번호매김) 중 1개 이상에서의 아미노산 치환을 포함한다. 위치 326, 327, 333 및/또는 334에서의 1개 이상의 잔기의 치환은 C1q 결합 및/또는 CDC 기능을 개선시킬 수 있다.
- <283> 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어, 미국 특허 5,739,277에 기술된 바와 같이 항체 (특히, 항체 단편) 내로 샬비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 혼입시킬 수 있다. 본원에 사용된 용어 "샬비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 것을 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다. Fc 영역에서의 치환을 갖고 혈청 반감기가 증가된 항체가 W000/42072 (Presta, L.)에 또한 기술되어 있다.
- <284> 신생아 수용체 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 W000/42072 (Presta, L.) 및 미국 2005/0014934A1 (Hinton 등)에 기술되어 있다. 이러한 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환이 있는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역은 위치 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 또는 434 (잔기의 유 번호매김) 중 1개 이상에서의 치환을 포함할 수 있다. FcRn 결합이 개선된 바람직한 Fc 영역-포함 항체 변이체는 이의 Fc 영역의 위치 307, 380 및 434 (잔기의 유 번호매김) 중 1개, 2개 또는 3개에서의 아미노산 치환을 포함한다.
- <285> 3개 이상 (바람직하게는 4개)의 기능성 항원 결합 부위가 있는 조작된 항체가 또한 구현된다 (미국 특허 출원 미국 2002/0004587 A1 (Miller 등)).
- <286> **V. 제약 제형**
- <287> 본 발명에 따라 사용된 길항제 또는 항체의 치료용 제형은 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 원하는 정도의 순도를 갖는 길항제 또는 항체를 임의의 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 ([Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합함으로써 보관용으로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌이 포함되는 항산화제; 방부제 (예컨대 옥타데실

디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀, 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만)의 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린이 포함되는 당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터 이온; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제가 포함된다.

<288> 대표적인 항-CD20 항체 제형이 WO 1998/56418에 기술되어 있다. 이러한 공개 공보에는 40 mg/ml 리톡시맵, 25 mM 아세트이트, 150 mM 트레할로스, 0.9 % 벤질 알콜, 0.02 % 폴리소르베이트 20 (pH 5.0)을 포함하는 액체 다중용량 제형이 기술되어 있고, 이의 최소 저장 기간은 2-8 °C에서 2년이다. 또다른 당해 항-CD20 제형은 9.0 mg/ml 염화나트륨, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 2수화물, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 및 무균 주사용수 (pH 6.5) 내의 10 mg/ml 리톡시맵을 포함한다.

<289> 피하 투여를 위해 채택된 동결건조 제형이 미국 특허 6,267,958 (Andya 등)에 기술되어 있다. 이같은 동결건조 제형은 높은 단백질 농도로 적절한 희석제로 재구성될 수 있고, 재구성된 제형이 본원에서 치료될 대상에게 피하 투여될 수 있다.

<290> 본원에서의 제형은 필요하다면 1종 초과와 활성 화합물 (상기 언급된 제2 의약), 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성을 갖는 것들을 또한 함유할 수 있다. 이같은 의약의 유형 및 유효량은, 예를 들어, 제형 내에 존재하는 길항제 또는 항체의 양, 및 치료될 대상의 임상 파라미터에 좌우될 수 있다. 바람직한 이같은 의약은 상기 언급되어 있다.

<291> 활성 성분은 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 예를 들어 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이같은 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

<292> 서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는 길항제 또는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로캡슐), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다.

<293> 생체내 투여에 사용될 제형은 반드시 무균성이어야 한다. 이는 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.

<294> VI. 제조품

<295> 본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기술된 IBD의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 한 양상에서, 제조품은 (a) B-세포 표면 마커 (예를 들어, CD20)에 결합하는 길항제 (예를 들어 항체) (임의로 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제 내)를 포함하는 용기; 및 (b) 인간 대상에서 IBD를 치료하기 위한 지침서가 있는 포장 삽입물을 포함한다.

<296> 모든 이러한 양상에서, 포장 삽입물은 용기 상에 있거나 또는 용기와 조합된다. 적절한 용기로는, 예를 들어, 병, 바이알(vial), 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 물질 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 IBD의 치료에 효과적인 조성물을 담고 있거나 함유하고, 멸균 접근 포트(port)를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 1종 이상의 작용제는 길항제 또는 항체이다. 표지 또는 포장 삽입물은, 제공된 길항제 또는 항체 및 임의의 기타 의약의 투여량 및 간격에 관한 구체적인 안내와 함께, 조성물이 치료에 적합한 인간 대상, 예를 들어 IBD (중등도 내지 중증 IBD 또는 UC 포함)에 걸린 또는 걸리기 쉬운 대상을 치료하는데 사용된다는 것을 가리킨다. 제조품은 제약상 허용가능한 희석제 완충제, 예컨대 정균처리된 주사용수 (BWF), 포스페이트-완충

염수, 링거액 및/또는 텍스트로스 용액을 포함하는 추가적인 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 기타 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여, 상업용 및 사용자의 관점에서 바람직한 기타 물질을 추가로 포함할 수 있다.

<297> 본원에서의 제조품은 제2 의약을 포함하는 용기를 임의로 추가로 포함하고, 이때 항체가 제1 의약이며, 제조품은 유효량의 제2 의약으로 대상을 치료하기 위한 포장 삽입물 상의 지침서를 추가로 포함한다. 제2 의약은 상기 기재된 것들 중 임의의 것일 수 있고, 대표적인 제2 의약은 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토피린 (6-MP), 및 아자티오프린이다.

<298> 본 발명의 추가적인 상세사항이 하기의 비제한적 실시예에 의해 설명된다. 명세서의 모든 인용문의 기재내용은 거명에 의해 본원에 명백하게 포함된다.

실시예

<299> **실시예 1**

<300> **IBD 치료법**

<301> 본 실시예는 포함 기준에서 정의된 바와 같은 활성 UC에 걸린 인간 대상에서의 리툭시맵의 평가이다. 유전자 마이크로어레이 데이터는 B-세포 유전자 및 CD20 발현이 인간 UC에서 상향조절되는 것을 나타냈다. 본 실시예는 UC 대상의 치료법에 대한 프로토콜을 제공한다.

<302> 이러한 프로토콜에 대한 연구 도식이 도 4에 도해된다.

<303> 본원에서의 치료법은 약 2주의 스크리닝 기간, 약 24주의 연구 기간, 및 24주의 추적 조사 기간을 포함하였다. 안정성의 정밀한 평가가 연구 전반에 걸쳐 수행되었다. 제-14일부터 제0일까지의 스크리닝 기간은 활성 질환을 확인하고 기준선 질환 활성 지수 (DAI) 점수를 결정하기 위하여 병력, 신체 검사, 실험실 평가, 일일 데이터의 수집, 및 생검의 가요성 S자형 결장경을 포함하였다. DAI 점수를 사용하여, 연구에 등록하기 위한 잠재적인 대상을 확인하고 리툭시맵의 임상 활성을 평가하였다.

<304> 제1일 및 제15일에 대상에게 1 g의 리툭시맵 (또는 위약)을 정맥내 (IV) 주입하였다. 모든 대상에게 하기의 것들 중 1종 이상을 안정적인 용량으로 적어도 제8주 동안 계속 투여하였다: 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-MP, 및/또는 아자티오프린. 모든 연구 방문 시 주기적인 실험실 및 신체 검사 평가와 함께 안정성 모니터링을 수행하였다. 제1일 및 15회의 방문 후, 제24주까지는 4주에 한번, 그후 제48주까지는 3개월에 한번으로 대상의 방문 일정을 계획하였다. 또한, 제2일 및 제16일에는 약동학 (PK) 샘플을 위해서만 대상이 돌아왔다. 조직학, 질환 평가 및 점막 B-세포 결핍의 평가를 위해 생검의 반복된 가요성 S자형 결장경이 제8주에 수행되었다. 질환 상태 및 결장 점막에서의 B-세포 결핍의 회복을 평가하기 위해 추가적인 생검의 S자형 결장경이 제24주에 수행되었다. 생검 검사물에서의 염증의 조직학적 평가를 표준화된 척도에 따라 점수를 매겼다 ([Geboes et al., Gut 47:404-409 (2000)]).

<305> DAI 점수를 제8주에 계산하여, 질환 완화가 달성된 대상의 비율을 결정하였다. DAI 점수를 제24주 방문 시에 또한 계산하였다. 가요성 S자형 결장경이 수행되지 않을 때 방문 시 임상 평가가 수행되었다 (즉, 제1일, 제15일, 제4주, 제12주, 제16주, 제20주, 제36주 및 제48주). 제48주까지 또는 B-세포 회복까지 (둘 중 더 긴 것까지), 연구자 또는 스폰서가 대상을 주시하였다. B-세포 회복은 기준선 (제1일) 또는 정상 하한치로 돌아간 B-세포 수준으로 정의되었다.

<306> 본 실시예는 활성 UC의 성인 대상에서의 리툭시맵의 안정성 및 관용성의 평가를 제공한다. 1차 안정성 결과 척도는 프로토콜-규정 UC 격화 (질환의 악화)의 표적화된 이벤트의 빈도이다

<307> B-세포 평가는 제48주까지 또는 B-세포 회복까지 (둘 중 더 긴 것까지) 계속되었다.

<308> 또한 본 실시예는 하기에 정의된 바와 같이 DAI 점수매김 시스템을 사용하여 UC에서의 리툭시맵의 치료적 임상 활성을 평가한다. UC 활성 평가를 위한 DAI 점수매김 시스템이 중추적인 임상 시험에서 사용되었다 ([Schroeder et al., N Engl J Med 317:1625-1629 (1987)]). 직장 출혈의 중단 및 파쇄성 점막의 치유로 증명되는 바와 같은, 활성 질환의 징후 및 증상의 완화가 임상 활성에 대한 2차 중점으로 선택되었다. 완화 기간이 또한 측정되었다. 제24주의 가요성 S자형 결장경 결과 및 DAI 점수, 및 제48주까지의 임상 추적 조사는 치료 효과의 기간을 평가할 수 있도록 하였다.

- <309> **결과 측정**
- <310> 1차 안정성 결과 척도
- <311> 1차 안정성 결과 척도는 연구 기간 (제1일 내지 제24주) 동안 발생한 프로토콜-규정 UC 격화의 표적화된 유해 사례 빈도였다.
- <312> 프로토콜-규정 UC 격화는 1종 이상의 하기 기준을 충족시켜야 한다:
- <313> • DAI 점수에서의 3점 이상의 증가
- <314> • 의심되거나 임박한 독성 거대결장증
- <315> • UC의 격화에 대한 입원 요구
- <316> • 연구자의 임상 판단에서, 의학적으로 유의한 질환 악화
- <317> 2차 결과 척도
- <318> 2차 결과 척도는 하기와 같다:
- <319> • 기타 안정성 결과 척도
- <320> • 입원 또는 IV 항생제를 필요로 하는 감염으로 정의되는 심각한 감염의 발생
- <321> • 미국 국립 암 연구소의 유해 사례의 통상적인 독성 기준 (NCI-CTCAE: National Cancer Institute Common Toxicity Criteria of Adverse Events), 버전 3.0에 따라 등급화된 모든 유해 사례 (심각 및 비-심각)의 발생
- <322> • 임상 실험 이상의 발생
- <323> • 제8주에 질환 완화가 달성된 대상의 비율
- <324> • 질환 완화는 0점 또는 1점의 S자형 결장경 점수 (파쇄성 없음) 및 0점의 직장 출혈 점수로 정의된다.
- <325> • 제8주에 임상 응답이 달성된 대상의 비율
- <326> • 임상 응답은 DAI 점수에서 3점 이상의 감소로 정의된다.
- <327> • 질환 완화까지의 시간
- <328> • 연구자에 의해 결정된 질환 완화의 기간
- <329> • 염증성 장 질환 질문서 (IBDQ)에서의 연구 기간 동안 기준선으로부터의 변화
- <330> 여러 약력학적 마커에 대한 리툭시맙의 효과를 기준선에서의 혈액, 혈청, 및 조직 샘플 및 치료 동안의 샘플을 비교함으로써 시험하였다. 이러한 평가는 하기와 같았다:
- <331> • B-세포 카운트 (CD19+ 및 기타 B-세포 표현형 부분집합)로의 혈액 림프구 패널
- <332> • 혈청 Ig 수준 (전체, IgA, IgG, 및 IgM)
- <333> • UC에 특이적인 항체 (p-ANCA)
- <334> • 면역조직화학 (IHC)에 의해 측정된, 결장 생검에서의 B-세포 결핍
- <335> **대상**
- <336> 포함 기준
- <337> 연구 참가 자격이 있기 위해서 대상은 하기의 기준들을 충족시켜야 한다:

- <338> • 서면작성 동의서
- <339> • 18-75세의 연령 및 연구 절차를 이해할 수 있음
- <340> • 스크리닝 시 6개월 이상 UC로 진단됨
- <341> • S자형 결장경 스크리닝 시 20 cm 이상의 활성 질환
- <342> • 스크리닝 시 6점 이상 내지 11점 이하의 DAI 점수, 2점 이상의 직장 출혈 및 2점 이상의 가요성 S자형 결장경으로 정의되는 활성 질환
- <343> • 스크리닝하기 전 2년 이내에 UC용 경구 코르티코스테로이드로 치료됨
- <344> • 치료 강도가 2주 이상의 기간 동안 20 mg/일의 프레드니손 당량 용량을 초과하여야 한다.
- <345> • 질환 정도의 정도에 대한 그리고 폴립을 배제하기 위한 과거 2년 2내의 결장경검사
- <346> • 10년 이상의 UC 질환의 경우 스크리닝하기 전 1년 이내에 형성이상을 배제하기 위해 적합한 생검의 결장경검사
- <347> • 임신 가능성이 있는 대상 (남성 및 여성)에 대하여, 연구 치료 동안, 그리고 연구 약물의 마지막 투여 후 1년 동안 신뢰할 수 있는 피임 수단 (예를 들어, 호르몬 피임, 패치, 질 링(ring), 자궁내 장치, 물리적 장벽)을 사용한다
- <348> • 무작위화하기 적어도 15주 전에 모든 기존의 조사용 생물학적 요법 (예를 들어, 이태너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 리툭시맵)의 철회
- <349> • 기준선 (제1일) 전에 지시된 기간 동안 안정적인 용량의 1종 이상의 하기 치료제로의 현행 치료:
- <350> 3주 이상 동안 안정적인 용량의 아미노살리실레이트
- <351> 2주 이상 동안 안정적인 용량의 경구 코르티코스테로이드
- <352> 3개월 기간 동안, 안정적인 용량으로 4주 이상 동안 6-MP
- <353> 3개월 기간 동안, 안정적인 용량으로 4주 이상 동안 아자티오프린
- <354> • 기존에 사용되었지만 제1일에 현재 사용되지 않는 상기 열거된 요법들에 대해, 기준선 전에 아미노살리실레이트를 2주 이상 동안, 그리고 아자티오프린 치료, 6-MP 치료, 또는 경구 코르티코스테로이드를 4주 이상 동안 대상에서 중단할 필요가 있다.
- <355> 배제 기준
- <356> 임의의 하기의 기준을 충족시키는 대상은 연구 참가에서 배제되었다:
- <357> • 대상이 기준선 (제1일)의 12주 이내에 칼시네우린 억제제의 시행 또는 결정절제술을 필요로 할 수 있다는 연구자의 판단에 의해 증명되는 중증 결장염
- <358> • 결장 천공 또는 독성 거대결장증의 임상적 혐의 또는 방사선촬영 증거
- <359> • 원발성 경화성 담관염의 병력
- <360> • 결장 형성이상 및/또는 결장에서의 샘종성 폴립의 병력
- <361> • 스크리닝하기 전 8주 이내에 시클로스포린, 타크로리무스, 시로리무스, 메토타렉세이트, 또는 마이코페놀레이트 모페틸로의 치료
- <362> • 스크리닝하기 전 2주 이내에 국소 직장용 제제로의 치료

- <363> • 기준선 전 4주 이내에 저-용량 아스피린 이외의 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID)의 사용
- <364> • 스크리닝 시, 알 또는 기생충에 대해 양성인 대변, 병원체에 대한 양성 대변 배양물, 또는 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*)에 대한 양성 대변 독소 분석
- <365> • 무작위화 전 4주 이내에 임의의 생백신의 수용/치료
- <366> • 임의의 비-생물학적 세포-결핍 치료제 예컨대 ADACOLUMN®으로의 이전 치료
- <367> • 결장 또는 소장 폐쇄 또는 절제의 병력
- <368> • 스크리닝 기간 동안 지사제 사용
- <369> • B형 또는 C형 간염의 병력
- <370> 일반적인 안전성에 대한 배제
- <371> • 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 완전한 인간 항체 또는 마우스 모노클로날 항체에 대한 중증 알러지성 또는 과민성 반응의 병력
- <372> • 현저한 심장 또는 폐 질환 (폐쇄성 폐 질환 포함)
- <373> • 현저한 제어되지 않는 동시 질환 예컨대 심혈관 질환 또는 신경계, 폐, 신장, 간, 내분비 또는 위장 장애의 증거
- <374> • 공지된 활성 박테리아, 바이러스, 진균류, 미코박테리아 또는 기타 감염 (결핵 또는 부정형 미코박테리아 질환이 포함되지만, 손톱 바닥의 진균류 감염은 배제됨) 또는 스크리닝 4주 이내에 입원 또는 IV 항생제 또는 스크리닝 2주 이내에 경구 항생제로의 치료를 필요로 하는 감염의 임의의 주요 에피소드
- <375> • 현저한 감염 재발 또는 박테리아 감염 재발의 병력
- <376> • HIV가 포함되는, 원발성 또는 2차 면역결핍증 (병력 또는 현재 활성)
- <377> • 고형 암 및 혈액 악성종양이 포함되는 암의 병력 (절개 및 치유된 피부의 기저 세포 및 편평 세포 암종 제외)
- <378> • 임신 여성 또는 수유 (젖을 먹이는) 어머니
- <379> • 스크리닝하기 전 6개월 이내에 알콜, 약물 또는 화학물질 남용의 병력
- <380> • 말초 정맥 접근의 결여
- <381> 실험실 배제 기준 (스크리닝 시)
- <382> • 혈청 크레아티닌 1.4 mg/dl 초과 (여성) 또는 1.6 mg/dl 이상 (남성)
- <383> • 정상 상한치의 2.5배 이상의 아스파테이트 아미노트랜스페라제 (AST) 또는 알라닌 아미노트랜스페라제
- <384> • 100,000/ μ l 미만의 혈소판 카운트
- <385> • 8.5 g/dl 미만의 헤모글로빈
- <386> • 1500/ μ l 미만의 호중구
- <387> • 100/ μ l 미만의 림프구 카운트
- <388> • 양성 B형 또는 C형 간염 혈청학

- <389> • 5.65 mg/ml 미만의 IgG
- <390> • 0.55 mg/ml 미만의 IgM
- <391> • 1.1 % 이하의 B-세포 카운트
- <392> • 이러한 연구에 참여함으로써 대상의 건강을 위태롭게 할 수 있다고 책임연구자가 결정한 현저한 심장 이상을 나타내는 심전도 (ECG)
- <393> **연구 치료**
- <394> **제형**
- <395> 리톡시맵이 9.0 mg/ml 염화나트륨, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 2수화물, 및 무균 주사용수 (pH 6.5) 내의 무균 제품으로서 IV 투여용으로 제형되었다. 항체는 10.0 mg/ml의 농도로 10-ml 및 50-ml 바이알로 시판용으로 공급되었다. 50-ml 바이알은 500 mg의 항체를 함유하였다. 바이알이 단일 사용에 대해 디자인되었기 때문에 방부제가 사용되지 않았다. 연구 지역에 500 mg 항체의 50-ml 바이알 및 걸맞는 위 약의 50-ml 바이알이 공급되었다.
- <396> **투여량, 투여 및 보관**
- <397> 연구 치료는 제1일 및 제15일에 IV 투여되는 1 g의 리톡시맵 또는 위약 당량으로 구성되었다. 각각의 주입을 시작하기 30-60분 전에 입으로 아세트아미노펜 (1 g) 및 디펜히드라민 HCl (50 mg), 또는 이들의 등가물로의 예방적 처치를 대상에게 제공하였다. 연구자의 재량으로, 특히 최초 주입의 경우, 관찰을 위해 대상을 입원시킬 수 있었다. 리톡시맵은 밀접한 관리 하에 투여되어야 하고, 완전한 소생 설비가 즉각적으로 이용가능하여야 한다. 2차 주입 전에 프로토콜-규정 UC 격화가 발생하는 경우, 2차 주입이 제지되었다.
- <398> 주입용 리톡시맵 용액은 2 °C-8 °C (36 °F-46 °F)에서 24시간 동안, 그리고 실온에서 추가로 24시간 동안 안정적이었다. 상자에 찍힌 유효 기간을 지나서 사용하지 않아야 한다. 리톡시맵과 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리에틸렌 백 간의 비-적합성은 관찰되지 않았다.
- <399> **동시 및 배제 요법**
- <400> 기준선 (제1일) 전에, 모든 대상에게 안정적인 용량의 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-MP, 및/또는 아자티오프린이 기준선 전의 다양한 기간 동안 투여되고 있었다. 연구 및 추적 조사 기간 전반에 걸쳐, 대상에서 이들의 일정한 용량의 아미노살리실레이트, 6-MP, 및/또는 아자티오프린이 유지되어야 하였다. 경구 코르티코스테로이드 용량은, 의학적으로 허용가능하다면, 제8주 이후까지 안정적으로 유지되어야 하였다. 제8주 이후에 의학적으로 지시된다면 점점 감소시키는 것이 시행되어야 하였다.
- <401> UC 이외의 질환 상태에 대한 치료법이, 하기에 언급된 것을 제외하고는, 지속될 수 있었다. 생(生) 바이러스 또는 박테리아 백신의 사용은 제-28일부터 연구 기간의 말기까지 금지되었다. 이러한 백신에는 홍역, 볼거리, 풍진, 회색질척수염, 칼메트-게랑(Calmette-Guerin) 간균, 황열병, 및 TY21a 장티푸스가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 살아있는 생물을 함유하지 않는 백신 (예를 들어, 인플루엔자, Pneumovax®, 파상풍)은 금지되지 않지만, 효과적이지 않을 수 있다. 대상의 예방접종 기록 및 가능한 요구사항을 재고하고, 필요하다면, 임의의 요구되는 예방접종/추가접종을 연구 약물 치료를 개시하기 적어도 28일 전에 제공하는 것이 권고된다.
- <402> 시클로스포린, 타크로리무스, 시로리무스, 메토티렉세이트, 또는 마이코페놀레이트 모페틸로의 치료는 스크리닝 8주 내에, 그리고 연구 동안 억제되었다. 프로토콜-규정 UC 격화에 대한 구조 약물처치로 연구자의 재량으로 임의의 제형 내의 시클로스포린을 사용할 수 있었다. 제8주 이전에 구조 약물처치가 필요한 경우, 대상은 비-응답자로 간주되었지만, 일정에 따른 연구 방문을 계속하여야 하였다.
- <403> 연구 기간 동안의 기타 배제 약물처치는 하기와 같았다:
- <404> • UC를 치료하기 위한 항생제
- <405> 항생제는 의학적으로 지시될 때 감염을 치료하기 위해서 사용될 수 있지만, UC의 치료법으로서는 사용될 수 없었다.

- <406> • NSAID, 단, 심혈관 예방을 위한 저-용량 아스피린은 제외
- <407> • UC를 위한 국소 직장용 치료제
- <408> • 지사제
- <409> • 설사제
- <410> • 담즙산 결합제 예컨대 콜레스티라민
- <411> • 조사용 약물 또는 치료가 금지된다
- <412> **분석 방법**
- <413> 평가 일정에 따른 시점에 혈청 샘플을 PK 및 HACA 분석용으로 수득하였다.
- <414> 리톡시맵 PK 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)을 사용하여 인간 혈청 샘플 내의 리톡시맵 수준을 측정하였다.
- <415> 리톡시맵 HACA ELISA는 포획 시약으로서의 리톡시맵 및 비오틴화-리톡시맵 및 스트렙티비딘-HRP를 검출을 위해 사용하는 가교 분석법이다. 이러한 분석법에서는 리톡시맵에 대한 친화력-정제 폴리클로날 염소 항체로 제조된 검정 곡선이 사용되었다; 따라서, 이러한 분석법으로부터의 결과는 상대적인 단위의 관점으로 이러한 폴리클로날 항체와 비교하여 보고되었다.
- <416> 모든 p-ANCA 분석은 중앙 실험실에서 수행되었다. 간접적인 면역형광을 사용하여, ANCA의 존재를 결정하였다. 또한, ELISA 분석법을 사용하여, 중앙 실험실에 의해 결정되는 바와 같이 골수세포형 과산화효소 또는 기타 관련 항원에 대한 ANCA의 특이성을 결정할 수 있었다.
- <417> **임상 활성 분석**
- <418> UC에서의 리톡시맵의 임상 활성을 평가하였다. 질환 완화를 경험한 대상의 비율 및 제8주에 임상 응답이 있는 대상의 비율을 추정하였고, 상응하는 95% 신뢰 구간이 각각의 치료 병기에 대해 생성되었다. 치료 차이 및 95% 신뢰 구간이 제공되었다.
- <419> 질환 완화의 기간을 치료 병기로 요약하였다. 설명적인 목적을 위해서만 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법을 사용하여 각각의 치료 병기에 대해 질환 완화 응답에 대한 정중 시간을 요약하였다.
- <420> 상기 기술된 바와 같이 리톡시맵 항체로 치료된 활성 UC 대상은 질환 완화 및/또는 임상 응답 (제8주까지 달성됨), 0점 또는 1점의 S자형 결장경 점수 및 0점의 직장 출혈 점수의 달성, DAI 점수에서의 감소 (3점 이상), 결장 점막 내에서의 B-세포의 감소, 및/또는 p-ANCA 항체 수준에서의 감소를 포함하여, UC의 징후 및 증상에서의 개선을 경험하였다.
- <421> 상기로부터, 본 발명의 구체적인 실시양태가 설명의 목적으로 본원에서 기술되었지만 본 발명의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 오직 첨부된 청구항에 의해서만 제한된다.

도면의 간단한 설명

- <33> 도 1A는 각각의 마우스 2H7 (서열 1), 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 2), 및 인간 카파 경쇄 아군 I (서열 3)의 경쇄 가변 도메인 (V_L)의 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7.v16의 V_L 의 CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 4), CDR2 (서열 5), 및 CDR3 (서열 6).
- <34> 도 1B는 각각의 마우스 2H7 (서열 7), 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 8), 및 중쇄 아군 III의 인간 컨센서스 (consensus) 서열 (서열 9)의 중쇄 가변 도메인 (V_H)의 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7.v16의 V_H 의 CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 10), CDR2 (서열 11), 및 CDR3 (서열 12).
- <35> 도 1A 및 도 1B에서, 지시된 바와 같이, 각각의 사슬 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각괄호 내에 둘러싸이고, 프레임워크 영역 FR1-FR4가 플랭킹된다. 2H7은 마우스 2H7 항체를 지칭한다. 두 열의 서열들 사이의 별표는 두 서열들 간에 상이한 위치를 가리킨다. 잔기 번호매김은 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest,

5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 따른 것이고, 삽입은 a, b, c, d, 및 e로 나타낸다.

<36> 도 2는 캐벗(Kabat) 가변 도메인 잔기 번호매김 및 유(Eu) 불변 도메인 잔기 번호매김으로 성숙형 2H7.v16 및 2H7.v511 경쇄 (각각 서열 13 및 15)의 정렬을 나타낸다.

<37> 도 3은 캐벗 가변 도메인 잔기 번호매김 및 유 불변 도메인 잔기 번호매김으로 성숙형 2H7.v16 및 2H7.v511 중쇄 (각각 서열 14 및 16)의 정렬을 나타낸다.

<38> 도 4는 실시예 1에서의 프로토콜에 대한 연구 도식을 도해한다.

도면

도면1A

경쇄 가변 도메인의 서열 정렬

		FR1		CDR1	
		10	20	30	40
2H7		QIVLSQSPAILSASPG	KEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * *	* * * *		
hu2H7.v16		DIQMTQSPSSLSASV	GDRVTITC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
				* * * *	
hum KI		DIQMTQSPSSLSASV	GDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
		FR2		CDR2	
		50	60	70	80
2H7		GSSEPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGSGT	SYSLTISRVEA
		** *		*	*** ****
hu2H7.v16		GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGT	DFTLTISLQ
		*	* * *		
hum KI		GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGT	DFTLTISLQ
				CDR3	
				90	100
2H7		EDAATYYC	[QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR	
		*		* * *	
hu2H7.v16		EDFATYYC	[QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR	
			**** *		
hum KI		EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	

도면1B

중쇄 가변 도메인의 서열 정렬

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT
	*** ** *		**
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA
		* * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50 a 60 70 80		
2H7	PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** ** ** *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL
	* * *		**
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLT
	CDR3	FR4	
	abc 90 100abcde 110		
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWFYFDV]	WGTGTTVTVSS
	** ** *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWFYFDV]	WGQGTLLVTVSS
		***** ** *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGTLLVTVSS

도면2

경쇄 정렬

	1 32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAP

hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP
	52
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG

hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG
	102
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
	152
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
	202 214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC

도면3

중쇄 정렬

	1	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	

hu2H7.v511	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
	37	52a 82abc
hu2H7.v16	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	

hu2H7.v511	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	
	83	100abcde 113
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLVTVSS	

hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGTLLVTVSS	
	118	
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPS	

hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPS	
	132	
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSKVHTEFPAVLQSSGLYS	

hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSKVHTEFPAVLQSSGLYS	
	182	
hu2H7.v16	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA	

hu2H7.v511	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA	
	232	
hu2H7.v16	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	

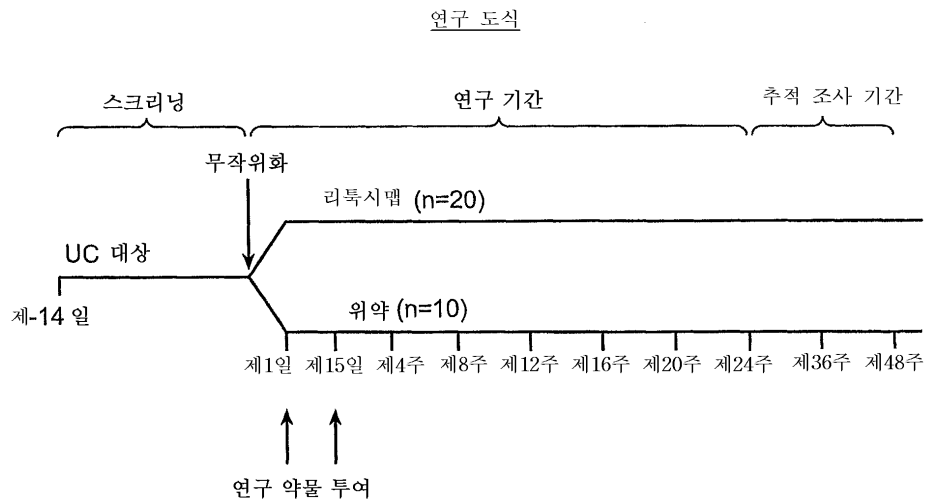
hu2H7.v511	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
	282	
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	

hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
	332	
hu2H7.v16	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	*	
hu2H7.v511	IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	382	
hu2H7.v16	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA	

hu2H7.v511	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA	
	432	447
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK	

hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK	

도면4



서열목록

<110> Gujrathi, Sheila

<120> TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

<130> P2211R1

<141> 2006-04-13

<150> US 60/671,902

<151> 2005-04-15

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
95 100 105

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 2

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> 3

<211> 108

<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 Gln Ser Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

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

80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

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

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

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

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

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

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

Ser Ser

<210> 8

<211> 122

<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 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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 9

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 Phe Thr Phe Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 13

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> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 14

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 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> 15

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 15

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> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 16

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
110 115 120

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> 17

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 17

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 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

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 18

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> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 19

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
110 115 120

Ser Ser

<210> 20

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 20

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					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

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 9

<223> Xaa is M or L

<400> 21

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
5 10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 4

<223> Xaa is S or A

<400> 22

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> Xaa is D or A

<400> 23

Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Xaa	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
1				5					10					15

Lys Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is N, A, Y, W or D

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is S or R

<400> 24

Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Xaa	Xaa	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
				5				10				