



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0114196
 (43) 공개일자 2007년11월29일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7022075

(22) 출원일자 2007년09월27일
 심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년09월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/006998

국제출원일자 2006년02월28일

(87) 국제공개번호 WO 2006/093923

국제공개일자 2006년09월08일

(30) 우선권주장

60/656,943 2005년02월28일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자

슈얼, 케이., 페아

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 원디엔에이 웨이제넨테크, 인크.

취안, 조안

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 원디엔에이 웨이제넨테크, 인크.

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 골 장애의 치료

(57) 요 약

CD20 항체와 같은 B-세포 표면 마커에 결합하는 유효량의 길항제를, 임의로 포유동물에서의 골다공증과 같은 다양한 골 질후의 치료제와 같은 유효량의 또 다른 의약과 함께 투여하는, 포유동물에서의 골다공증과 같은 다양한 골 질후의 치료 방법이 제공된다. 또한, 제조품이 제공된다. 또한, B-세포 표면 마커에 결합하는 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 단리된 치아전구세포 또는 골전구세포를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에서의 골용해의 억제 방법이 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

유효량의 CD20 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하며, 골 장애가 자가면역 질환 또는 자가면역 질환이 발병할 위험과 관련이 없는 것인, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 키메라, 인간 또는 인간화 항체인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체가 리툭시마브를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체가 서열 2 및 8에 가변 도메인 서열을 포함하는 인간화 2H7인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체가 서열 8에 변경(들) N100A 또는 D56A,N100A를 갖는 가변 중쇄 도메인, 및 서열 2에 변경(들) M32L, S92A 또는 M32L,S92A를 갖는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 인간화 2H7인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체가 서열 30의 경쇄 가변 영역 (V_L) 서열 및 서열 8의 중쇄 가변 영역 (V_H) 서열을 포함하는 인간화 2H7이고, 항체가 VH-CDR2에 D56A의 아미노산 치환을 추가로 함유하며, VH-CDR3의 N100이 Y 또는 W로 치환된 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 항체가 서열 31의 v511 경쇄 서열 및 서열 32의 v511 중쇄 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 항체가 네이키드 항체인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 항체가 또다른 문자와 컨쥬게이션된 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체가 골-표적화제에 공유 결합된 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 항체가 포유동물에의 투여시 주요 임상 반응을 유도하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 항체가 약 1개월의 기간 내에 약 1 내지 4회 투여량의 빈도로 약 400 mg 내지 약 1.3 g의 투여량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 각각의 투여량이 약 500 mg 내지 1.2 g인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 각각의 투여량이 약 750 mg 내지 1.1 g인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 항체가 2 내지 4회 투여량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 항체가 2 내지 3회 투여량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 항체가 약 2 내지 3주의 기간 내에 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 기간이 약 2주인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 항체가 관절에 국소 투여되는 것인 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 항체가 골 결손 부위에 국소 투여되는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 골 결손이 골절, 골 이식 부위, 임플란트 부위 또는 치주낭인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 항체가 전신 투여되는 것인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 항체가 정맥내 투여되는 것인 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 항체가 피하 투여되는 것인 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 제2 의약이 유효량으로 투여되고, CD20 항체가 제1 의약인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 제2 의약이 하나 초과의 의약인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 제2 의약이 파골세포-관련된 장애 치료제, 면역억제제, 질환-조절 항류마티스 약물 (DMARD), 세포독성제, 인테그린 길항제, 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 호르몬, 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 제2 의약이 파골세포-관련된 장애 치료제 또는 면역억제제, 또는 둘다인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 제2 의약이 면역억제제인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 면역억제제가 시클로포스파미드, 클로람부실, 레플루노미드, 아자티오프린 또는 메토트렉세이트인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 면역억제제가 시클로포스파미드 또는 메토트렉세이트인 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 제2 의약이 파글세포-관련된 장애 치료제인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 치료제가 오스테오프로테게린, 인터루킨, MMP 억제제, 베타 글루칸, 인테그린 길항제, 칼시토닌, 양성자 펌프 억제제, 프로테아제 억제제, 비스포스포네이트, 인슐린-유사 성장 인자-1, 혈소판-유래된 성장 인자, 표피 성장 인자, 전환 성장 인자-알파의 억제제, 전환 성장 인자-베타, 골 형태형성 단백질, 부갑상선 호르몬, 섬유모세포 성장 인자, 비타민 D, 칼슘, 플루오르화물, 마그네슘, 봉소, 비트로넥틴, 플라스미노겐-활성화제 억제제 또는 프로테아제 억제제인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 치료제가 사이토킨 또는 비스포스포네이트인 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 치료제가, CD20 항체가 치료제로 치료되는 포유동물에게 투여되지 않을 경우 사용되는 양보다 적은 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 37

제1항에 있어서, 포유동물이 CD20 항체로 이전에 치료되지 않았던 것인 방법.

청구항 38

제1항에 있어서, 골 장애가 골다공증, 골다공성 골절, 국소 골 소실, 골 결손, 소아기 특발성 골 소실, 치조골 소실, 하악골 소실, 치조골 소실, 치주염과 관련된 골 소실, 또는 다발성 골수종, 마크로글로불린혈증 또는 모노클로날 감마글로불린병증에서의 골 질환인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 골 장애가 국소 골 소실, 다발성 골수종, 마크로글로불린혈증 또는 모노클로날 감마글로불린 병증에서의 골 질환, 또는 골다공증인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 골 장애가 속발성 골다공증과 관련된 골 소실인 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 골 장애가 국소 골 소실인 방법.

청구항 42

제1항에 있어서, 유효량의 CD20 항체가 염증성 관절염증에서의 침식성 골 질환을 예방하는데 유효한 것인 방법.

청구항 43

(누락)

청구항 44

제1항에 있어서, 골 장애가 류마티스성 관절염 또는 류마티스성 관절염이 발병할 위험과 관련이 없는 것인 방법.

청구항 45

제1항에 있어서, 항체가 전달 비히클로 투여되는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 전달 비히클이 분말화된 골, 인산삼칼슘, 수산화인회석, 폴리메타크릴레이트, 생체분해성 폴리에스테르, 수성 중합체성 겔 또는 퍼브린 실란트인 방법.

청구항 47

B-세포 표면 마커에 결합하는 유효량의 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법.

청구항 48

B-세포 표면 마커에 결합하는 유효량의 길항제를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법.

청구항 49

- i. CD20 항체를 포함하는 용기; 및
- ii. 포유동물에서의 골 장애의 치료를 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물

을 포함하며, 상기 지시서는 유효량의 CD20 항체가 포유동물에게 투여됨을 지시하고, 골 장애는 자가면역 질환 또는 자가면역 질환이 발병할 위험과 관련이 없는 것인 제조품.

청구항 50

제49항에 있어서, 제2 의약을 포함하는 용기를 추가로 포함하며, CD20 항체가 제1 의약이고, 제2 의약으로 포유동물을 치료하기 위한 패키지 삽입물 상의 지시서를 추가로 포함하는 제조품.

청구항 51

제50항에 있어서, 제2 의약이 파글세포-관련된 장애 치료제, 면역억제제, 세포독성제, 인테그린 길항제 또는 호르몬인 제조품.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 제2 의약이 파글세포-관련된 장애 치료제 또는 면역억제제, 또는 둘다인 제조품.

청구항 53

B-세포 표면 마커에 결합하는 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 단리된 치아전구세포 또는 콜전구세포를 포유동물 내로 도입하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골용해의 억제 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 세포가 치아전구세포인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 포유동물이 치주염을 앓고 있거나 또는 치주염이 발병할 위험이 있는 것인 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 포유동물이 치주 질환으로 인한 치조골 소실을 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이

있는 것인 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 세포가 턱의 하악 구역의 치주 인대에 투여되는 것인 방법.

청구항 58

제53항에 있어서, 상기 세포가 골전구세포인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 세포가 상기 포유동물의 인공 관절 내로 임플란트되는 것인 방법.

청구항 60

제58항에 있어서, 상기 세포가 경골내 투여되는 것인 방법.

청구항 61

제58항에 있어서, 상기 세포가 대퇴내 투여되는 것인 방법.

청구항 62

제53항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 발현이 항생제 화합물에 의해 조절되는 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 항생제 화합물이 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유사체인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 미노사이클린을 상기 포유동물에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항생제 화합물이 전신 투여되는 것인 방법.

청구항 66

제53항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 파골세포-관련된 장애 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 치료제가 인터루킨-4, 또는 종양 괴사 인자-알파의 억제제인 방법.

청구항 68

제53항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 류마티스성 관절염을 앓고 있거나 또는 류마티스 성 관절염이 발병할 위험이 있는 것인 방법.

청구항 69

제53항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 류마티스성 관절염을 앓고 있지 않거나 또는 류마티스성 관절염이 발병할 위험이 없는 것인 방법.

청구항 70

제53항 또는 제58항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 치근단주위 또는 연골내 골 소실, 인공 관절 입자-유도된 골용해 또는 골용해성 골 전이를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있는 것인 방법.

청구항 71

제53항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CD20 항체인 방법.

명세서

<1> 본 출원은 그 전문이 본원에 참고로 도입된 2005년 2월 28일자로 출원된 미국 가출원 제60/656,943호로부터 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 주장한다.

기술 분야

<2> 본 발명은 CD20 또는 CD22와 같은 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항체, 예를 들어 CD20에 결합하는 항체를 사용한 콜 장애의 치료에 관한 것이다.

배경 기술

<3> 골 개형은 그에 의해 조직 질량 및 골격 구조가 유지되는 역동적인 프로세스이다. 상기 프로세스는 골 흡수와 골 형성 사이의 균형이며, 파골세포 및 골모세포라는 2가지 세포 종류가 주요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 골모세포는 새로운 골을 합성하고, 이를 파골세포에 의해 굴착된 공동 내로 침착시킨다. 골모세포 및 파골세포의 활동은 성장 인자를 비롯한 많은 인자에 의해 전신적 및 국소적으로 조절된다.

<4> 골은 생명에 필수적인 혈청 항상성의 유지를 위한 하기 기능을 수행하는 특수화된 역동적인 결합 조직이다: (a) 기계적, 지지 및 이동을 위한 근육 부착 부위; (b) 보호적, 중요한 기관 및 골수에 대한; (c) 대사적, 이온, 특히 칼슘 및 포스페이트의 저장으로서. 골은 집합적으로 개형으로서 공지된 프로세스인 연속적인 흡수 및 재생을 겪는다. 따라서, 골의 기계적 및 생물학적 통합은 그의 연속적인 파괴 (흡수) 및 수백만의 현미경적 부위에서의 연속적인 재건 (형성)에 의존한다. 성인의 삶 동안, 골 개형은 구조적으로 손상되거나 노화된 골을 제거하고 구조적으로 새로운 건강한 골로 대체하는데 중요하다. 완전한 골 질량을 유지하기 위해, 흡수 및 형성은 완벽한 평형으로 유지된다. 노화에 따라, 골 흡수와 형성 사이의 평형은 변경되고, 종종 흡수 쪽으로 기울며, 이는 골 질량의 감소, 골 구조의 악화, 스트레스에 대한 내성 감소, 골 약화 및 골절에 걸리기 쉬운 특성을 초래한다. 상기 증상의 대별은 골다공증으로 지칭된다.

<5> 파골세포는 골 매트릭스를 침식시키는 기능을 하는 큰 다핵 세포이다. 이는 대식세포 및 단핵구로 발달하는 다른 세포와 관련된다. 대식세포와 마찬가지로, 파골세포는 조혈 전구세포로부터 유래된다. 파골세포는 전신 및 국소 골 소실 둘다를 매개한다.

<6> 골 매트릭스 침식은 골모세포가 관여하는 프로세스인 골 매트릭스 형성과 협력하여 일어나는 프로세스인 정상적인 프로세스이다. 본질적으로, 골모세포는 골 매트릭스를 침식시키고, 골 내로 골모세포가 이어지는 터널을 형성하고, 터널의 벽을 줄세우고, 새로운 골 매트릭스를 형성한다. 전형적으로, 정상적인 성인에서, 연간 골의 약 5 내지 10%가 상기 프로세스에 의해 대체된다.

<7> 서구 사회에서 주요한 건강 문제인 골다공증은 지금까지 가장 널리 퍼진 질환이며, 건강 관리의 관점에서 가장 비용이 많이 듈다. 골다공증의 위험은 45세 초과의 여성에서 85% 및 남성에서 15%인 것으로 추정된다. 미국에서, 1700만 명의 폐경기후 여성이 그의 최대 골 질량의 10%를 소실하였으며, 940만 명이 25%를 소실하였고, 5만 명이 골다공증의 결과로서 골절을 앓았다. 골다공증은 진단되지 않은 것을 남겨둘 경우, 미국의 건강 관리 시스템은 종종 질환의 첫번째 증상인 척추 및 엉덩이 골절로부터 1년에 140억 달러 초과의 비용을 소비한다.

<8> 골다공증은 전형적으로, 골 흡수가 골 형성을 초과하게 하는 골격 전복의 불균형을 반영한다. 골 흡수는 조혈 구획, 보다 정확하게는 과립구-대식세포 콜로니-형성 단위 (GM-CFU)로부터 기원하는 단핵 전구체의 융합에 의해 형성된 다핵의 특수화된 골 세포이다. 파골세포는 골을 흡수하는 주요한 세포 종류이며, 골-형성 세포인 골모세포와 함께 골 질량, 골 형태 및 골 구조를 지시한다.

<9> 파제트병은 골다공증만큼 흔하거나 비용이 많이 들지는 않더라도 - 40세 초과의 집단의 3%, 및 80세 초과의 집단의 10%에 영향을 줌 -, 그럼에도 불구하고, 골절 유발을 제외하고 골관절염의 원인이 되고 신경계 질환의 원인이 될 수 있기 때문에 중요한 질환이다. 파제트병은 급속한 골 전복을 특징으로 하며, 이는 배아에서 및 성장 동안 초기에 형성되며 성인 골격으로부터 사실상 없는 조직 종류인 비틀린 골의 형성을 초래한다. 비틀린 골은 부서짐이 현저하며, 따라서 골절되고 구부러질 경향이 있다. 골은 확장되며, 종종 혈액 유동을 방해하고, 신경을 수축시키며, 이는 파제트병과 관련된 많은 신경계 증상을 초래한다.

- <10> 파골세포가 생각컨대 비정상적으로 높은 수준으로 골을 흡수하고 골모세포가 정상적인 수준으로 형성되는 질환, 예를 들어 골다공증에 대해, 합리적인 치료 표적은 파골세포일 것이며, 파골세포의 수 및/또는 기능을 감소시키는 것은 골 흡수와 형성 사이의 평형을 회복시킬 수 있다. 그리고, 사실상 골다공증에 대한 현재 이용가능한 치료법은 골 흡수를 억제하는 것으로 의도된다.
- <11> 파골세포는 단핵구-대식세포 쪽으로부터 유래된다. 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF)로 CFU-GM을 자극할 때, 단핵 포식세포 및 파골세포의 미성숙한 비부착 전구체인 전단핵구가 형성된다. 전단핵구는 이들이 노출되는 사이토킨에 따라 대식세포 경로와 함께 증식하고 분화하여, 결국 조직 대식세포를 형성시킬 수 있거나, 파골세포 경로와 함께 분화될 수 있다. 예를 들어, 골모세포의 막 표면 상에 발현되는 사이토킨인 수용체 활성화제 NF-κB 리간드 (RANKL) (문헌 [Simonet et al. Cell 89:309-319 (1997)])는 전단핵구가 대식세포보다는 파골세포로 분화되는데 영향을 주는 반면, M-CSF를 사용한 치료는 전단핵구가 대식세포로 발달하는 것을 유도한다. RANKL의 발현을 뒷받침하는 M-CSF 및 다른 사이토킨, 예를 들어 인터루킨-1 또는 TNF-α는 대식세포의 생성물이며, 상기 사이토킨 및 성장 인자의 발현을 변경시키는 면역조절 물질은 대식세포 뿐만 아니라 파골세포에도 영향을 줄 수 있는 것으로 추정될 수 있다.
- <12> 골다공증에 대한 다수의 치료 방식이 있으며, 비스포스포네이트 (문헌 [Fleisch H, "Development of bisphosphonates, "Breast Cancer Res. 4:30-34 (2002)], [Spencer, C P, Stevenson. J C "Oestrogen and anti-oestrogen for the prevention and treatment of osteoporosis." In Osteoporosis: Diagnosis and Management, Martin Muniz, England, 1998, pp 111-123]), 또는 "선택적 에스트로겐 수용체 조절제" (SERMS)를 들 수 있다.
- <13> 골모세포, 파골세포, 및 그의 전구체의 증식, 분화 및 활성에 영향을 주는 많은 단백질은 또한 연골 형성 (연골 형성)을 담당하는 세포인 연골세포에서 이러한 프로세스에 영향을 준다. 이러한 단백질로는 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 전환 성장 인자 베타 (TGF-β), 골 형태형성 단백질 (BMP) 및 연골-유래된 성장 인자 (CDGF)를 들 수 있다.
- <14> "zvegf3"으로 공지된 PDGF 상동체는 최근에 확인되었으며, 또한 "VEGF-R"로 지칭되었다 (WIPO 공개 WO 99/37671). Zvegf3/VEGF-R은 성장 인자의 PDGF/VEGF 쪽에 대한 유의한 상동성을 갖는 다중-도메인 단백질이다. Zvegf3은 골다공증과 같은 특정 골 장애의 치료에 유용한 것으로 밝혀졌다 (US 2004/0043031 및 미국 특허 제6,663,870호 참조).
- <15> 살아 있는 골전구세포 또는 치아전구세포로부터 제조된 조성물은 항염증성 폴리펩티드, 예를 들어 인간 인터루킨-4를 전달하여 골 조직을 생성하거나 재건한다 (US 2004/0126364 참조).
- <16> 최근에, 종양 괴사 인자 (TNF) 쪽의 수용체 및 리간드는 파골세포의 분화 및 활성에 필수적인 부분을 담당하며, 따라서 골 흡수에 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. TNF-α는 파골세포의 생성인 파골세포형성을 촉진하는 것으로 공지되어 있다. 당분야 및 본원에서 "NF-κB 리간드" (RANKL), "파골세포 분화 인자" (ODF), "오스테오프로테제린 리간드" (OPGL), 및 "TNF-관련된 활성화-유도된 사이토킨" (TRANCE)으로 호환적으로 지칭되는 TNF-유사 분자는, 파골세포 및 기질 세포 상에 존재하고/거나 그에 의해 분비되고, 파골세포 전구체 및 성숙한 파골세포의 막에 존재하는, 당분야 및 본원에서 "NF-κB 리간드의 수용체 활성화제" (RANK)로 지칭되는 TNF-수용체-유사 분자와 상호작용하고, 파골세포형성 및 성숙한 파골세포의 흡수 활성을 조절한다. 항체와 같은 TNF 억제제는 류마티스성 관절염의 치료에 이용된다. 문헌 [Suda et al. Endocrine Reviews 20(3):345-357 (1999)]에는 파골세포 분화 및 기능이 기재되어 있다. 문헌 [Filvaroff and Derynck (Curt: Biol. 8:R679-R682 (1998)]에는 골 개형 및 파골세포 조절에 대한 신호 시스템이 언급되어 있다. 또한, 문헌 [Goldring, Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 3(4):287-289 (2003)]; [Goldring, Rheumatology, 42 Suppl 2, piil 1-6 (May 2003)]; [Goldring and Goldring, Current Opinion in Orthopaedics, 13(5):351-362 (2002)]; 및 [Goldring, Current Opinion in Rheumatology 14(4):406-10 (2002)]을 참조한다. 또한, 마우스에게 발병할 수 있는 관절염은 매우 염증성이지만, RANKL/ODF 넉아웃 마우스는 골 침식을 갖지 않는다 (문헌 [Gravallese, "Bone destruction in arthritis" Ann. Rheum. Dis. 61 (suppl II): U84-6 (2002)]에서 검토된 바와 같음).
- <17> US 2004/0058889에는 골 소실 또는 낮은 골 밀도와 관련된 증상을 치료하는 베타-글루칸의 사용 방법, 및 증진된 골 성장이 바람직한 상황에서 골 성장을 촉진하기 위한 방법이 개시되어 있다.
- <18> CD20 항체 및 이를 사용한 요법
- <19> 램프구는 조혈 프로세스 동안 골수에서 생성되는 많은 종류의 백혈구 중 하나이다. 램프구에는 2가지 주요한

집단으로서, B 림프구 (B 세포) 및 T 림프구 (T 세포)가 있다. 본원에서 특정 관심의 림프구는 B 세포이다.

<20> B 세포는 골수 내에서 성숙하며, 골수를 떠나 그의 세포 표면 상에 항원-결합 항체를 발현한다. 그의 막-결합된 항체가 특이적인 항원을 천연 B 세포가 최초로 마주칠 경우, 세포는 급속하게 분열하기 시작하며, 그의 자손은 기억 B 세포, 및 "형질 세포"로 지칭되는 효과기 세포로 분화된다. 기억 B 세포는 보다 긴 수명을 가지며, 계속하여 원래 모 세포와 동일한 특이성을 갖는 막-결합된 항체를 발현한다. 형질 세포는 막-결합된 항체를 생성하지 않지만, 대신 분비된 형태의 항체를 생성한다. 분비된 항체는 체액성 면역의 주요한 효과기 분자이다.

<21> CD20 항원 (인간 B-림프구-제한된 분화 항원, Bp35로도 지칭됨)은 프리(pre)-B 및 성숙 B 림프구 상에 위치된, 분자량이 대략 35 kD인 소수성 막관통 단백질이다 (문헌 [Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989)]; 및 [Einfeld et al. EMBO J. 7(3):711-717 (1988)]). 항원은 또한 90% 초과의 B 세포 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종 (NHL)에서도 발현되지만 (문헌 [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 (문헌 [Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)]). CD20은 세포 주기 개시 및 분화에 대한 활성화 프로세스에 있어서 초기 단계(들)를 조절하며 (Tedder et al., 상기 문헌), 아마도 칼슘 이온 채널로서 기능한다고 여겨진다 (문헌 [Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)]).

<22> B-세포 림프종에서 CD20이 발현되면, 상기 항원은 이러한 림프종의 "표적화"를 위한 후보로서 기능할 수 있다. 본질적으로, 이러한 표적화는 하기와 같이 일반화될 수 있다: B 세포의 CD20 표면 항원에 특이적인 항체가 환자에게 투여된다. 상기 항-CD20 항체는 (표면상) 정상 및 악성 B 세포 둘다의 CD20 항원에 특이적으로 결합하며, CD20 표면 항원에 결합된 항체는 신생물성 B 세포의 파괴 및 고갈을 유발할 수 있다. 또한, 종양을 파괴하는 잠재성을 갖는 화학 작용제 또는 방사성 표지는 상기 작용제가 신생물성 B 세포에 특이적으로 "전달되도록" 항-CD20 항체에 컨쥬게이션될 수 있다. 상기 접근법과 관계없이, 주요한 목적은 종양을 파괴하는 것이며, 구체적인 접근법은 이용되는 특정 항-CD20 항체에 의해 결정될 수 있고, 따라서 CD20 항원을 표적화하는 이용가능한 접근법은 상당히 다양할 수 있다.

<23> 리툭시마브 항체 (미국에서 리툭산(RITUXAN)(등록상표)으로, 어딘가에서는 마브테라(MABTHERA)(등록상표)로 시판되는 제품의 활성제)는 CD20 항원에 대한 유전학적으로 조작된 키메라 뮤린/인간 모노클로날 항체이다. 리툭시마브는 1998년 4월 7일자로 허여된 미국 특허 제5,736,137호 (Anderson et al.)에서 "C2B8"로 지칭된 항체이다. 리툭시마브는 재발성 또는 난치성 저-등급 또는 소포성, CD20 양성, B 세포 비-호지킨 림프종을 갖는 환자의 치료에 대해 지시된다. 시험관내 작용 메카니즘 연구는 리툭시마브가 인간 보체에 결합하며 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 통해 림프양 B-세포주를 용해시킴을 입증하였다 (문헌 [Reff et al., Blood 83(2):435-445 (1994)]). 또한, 이는 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 대한 분석에서 유의한 활성을 갖는다. 보다 최근에, 리툭시마브는 삼중수소화 티미딘-흔입 분석에서 항-증식 효과를 가지며 직접적으로 아폽토시스를 유도하는 반면, 다른 항-CD29 및 항-CD20 항체는 그렇지 않은 것으로 나타났다 (문헌 [Maloney et al. Blood 88(10):637a (1996)]). 또한, 리툭시마브와 화학요법 및 톡신 사이의 상승작용은 실험적으로 관찰되었다. 특히, 리툭시마브는 약물-내성 인간 B-세포 림프종 세포주를 독소루비신, CDDP, VP-16, 디프테리아 독소 및 리신의 세포독성 효과에 대해 항원민감화시킨다 (문헌 [Demidem et al., Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997)]). 생체내 전임상 연구는 리툭시마브가 생각컨대 보체- 및 세포-매개된 프로세스를 통해 말초 혈액, 림프절, 및 시노몰구스 원숭이의 골수로부터 B 세포를 고갈시킴을 밝혀내었다 (문헌 [Reff et al., Blood 83:435-445 (1994)]).

<24> 리툭시마브는 1997년 11월에 미국에서 재발성 또는 난치성 저-등급 또는 소포성 CD20⁺ B-세포 NHL을 갖는 환자의 치료를 위해, 4회 투여량에 대해 매주 375 mg/m²의 투여량으로 승인되었다. 2001년 4월에, 식품 의약품 안전청 (FDA)은 저-등급 NHL의 치료에 대해 추가의 지시를 승인하였다: 재-치료 (4회 투여량 동안 매주) 및 추가의 투여량 처방 (8회 투여량 동안 매주). 300,000명 초과의 환자가 단일요법으로서, 또는 면역억제제 또는 화학요법 약물과 조합된 리툭시마브에 대해 노출되었다. 또한, 환자는 2년 이하 동안 유지 요법으로서 리툭시마브로 치료되었다 (문헌 [Hainsworth et al., J. Clin. Oncol. 21:1746-1751 (2003)]; [Hainsworth et al., J. Clin. Oncol. 20:4261-4267 (2002)]; [Edwards et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" N Engl. J. Med. 350:2572-82 (2004)]).

<25> 리툭시마브는 또한 B 세포 및 자가항체가 질환 병태생리에서 역할을 하는 것으로 보이는 다양한 비-악성종양 자가면역 장애에서 연구되었다 (문헌 [Edwards et al., Biochem Soc. Trans. 30:824-828 (2002)]). 리툭시마브

는 예를 들어 류마티스성 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 자반증 ([D'Arena et al., Leuk. Lymphoma 44:561-562 (2003)]; [Stasi et al., Blood, 98:952-957 (2001)]; [Saleh et al., Semin. Oncol., 27 (Suppl 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)]); 자가면역 빈혈 ([Zaja et al., Haematologica 87:189-195 (2002)] (정오표는 [Haematologica 87:336 (2002)]에 나타남), 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 ([DeVita 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)]), 난치성 심상성 친포창 ([Dupuy et al., Arch Dermatol., 140:91-96 (2004)]), 피부근육염 ([Levine, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)]), 쇼그伦 증후군 ([Sommer et al., Arthritis & Rheumatism, 49:394-398 (2003)]), 활동성 제II형 혼합 한랭글로불린혈증 ([Zaja et al., Blood, 101:3827-3834 (2003)]), 심상성 친포창 ([Dupay et al., Arch. Dermatol., 140:91-95 (2004)]), 자가면역 신경병증 ([Pestronk et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74:485-489 (2003)]), 부신생물 암구진탕-근경련 증후군 ([Pranzatelli et al. Neurology 60(Suppl. 1) P05.128:A395 (2003)]) 및 재발-진정 다발성 경화증 (RRMS) ([Cross et al. (abstract) "Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS" Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003)])의 징후 및 증상을 잠재적으로 완화시키는 것으로 보고되었다.

<26>

리툭시마브의 안전성 및 효능에 대한 48-주 추적 데이터를 제공하는 II상 연구가 류마티스성 관절염 (RA)을 갖는 환자에서 수행되었다 (문헌 [Emery et al. Arthritis Rheum 48(9):S439 (2003)]; [Szczepanski et al. Arthritis Rheum 48(9):S121 (2003)]). 총 161명의 환자를 4개의 처리군으로 고르게 무작위화시켰다: 메토트렉세이트, 리툭시마브 단독, 리툭시마브 + 메토트렉세이트, 및 리툭시마브 + 시클로포스파미드 (CTX). 리툭시마브의 치료 처방은 제1일 및 제15일에 정맥내 투여된 1 g이었다. RA를 갖는 대부분의 환자에서 리툭시마브의 주입은 대부분의 환자에 의해 잘 용인되었으며, 환자의 36%는 (위약을 투여받은 환자에서는 30%인데 비해) 그의 첫번째 주입 동안 하나 이상의 부작용을 경험하였다. 전체적으로, 대다수의 부작용은 중증도에 있어서 온전내지 중간인 것으로 간주되었으며, 모든 처리군에 걸쳐 잘 균형을 이루었다. 48주에 걸쳐 4개의 군 전체에 총 19건의 부작용이 있었으며, 리툭시마브/CTX 군에서 약간 보다 빈번하였다. 감염의 증상은 모든 군에 걸쳐 잘 균형을 이루었다. 상기 RA 환자 집단에서 평균 중증 감염 속도는 100명 환자-년당 4.66이었으며, 이는 공동체-기반 역학 연구에서 보고된 RA 환자에서 입원을 요하는 감염 속도 (100명 환자-년당 9.57)보다 낮았다 (문헌 [Doran et al., Arthritis Rheum. 46:2287-2293 (2002)]).

<27>

자가면역 신경병증 (Pestronk et al., 상기 문헌), 암구진탕-근경련 증후군 (Pranzatelli et al., 상기 문헌) 및 RRMS (Cross et al. 상기 문헌)를 비롯한 신경계 장애를 갖는 소수의 환자에서 리툭시마브의 보고된 안전성 프로파일은 종양학 또는 RA에서 보고된 것과 유사하였다. RRMS를 갖는 환자에서 인터페론-베타 (IFN- β) 또는 글라티라며 아세테이트와 조합된 리툭시마브의 진행된 연구자-임상 시험 (IST)에서, 쳐치된 10명의 환자 중 한명이 리툭시마브의 첫번째 주입 후 중간 정도의 열 및 오한을 경험한 후 밤새 관찰을 위해 입원한 반면, 다른 9명의 환자는 임의의 보고된 부작용 없이 4회-주입 처방을 완료하였다.

<28>

CD20 항체 및 CD20 결합 분자에 관한 특허 및 특허 공개로는 미국 특허 제5,776,456호, 제5,736,137호, 제5,843,439호, 제6,399,061호 및 제6,682,734호, 뿐만 아니라 US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson et al.); 미국 특허 제6,455,043호 및 WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez and White); WO 2000/27433 (GrMo-Lopez and Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO 2001/10461 (Rastetter and White); WO 2001/10460 (White and Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna and Hariharan); US 2002/0006404 및 WO 2002/04021 (Hanna and Hariharan); US 2002/0012665 및 WO 2001/74388 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan and Hanna); US

2002/0009444 및 WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C.); US 2002/0128488 및 WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); WO 2002/096948 (Braslawsky et al.); WO 2002/079255 (Reff and Davies); 미국 특허 제6,171,586호 및 WO 1998/56418 (Lam et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, 미국 특허 제6,194,551호, 미국 특허 제6,242,195호, 미국 특허 제6,528,624호 및 미국 특허 제6,538,124호 (Idusogie et al.); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd et al.); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al.); US 2002/0004587 및 WO 2001/77342 (Miller and Presta); US 2002/0197256 (Grewal, L.); US 2003/0157108 (Presta, L.); 미국 특허 제6,565,827호, 제6,090,365호, 제6,287,537호, 제6,015,542호, 제5,843,398호 및 제5,595,721호, (Kaminski et al.); 미국 특허 제5,500,362호, 제5,677,180호, 제5,721,108호, 제6,120,767호 및 제6,652,852호 (Robinson et al.); 미국 특허 제6,410,391호 (Raubitschek et al.); 미국 특허 제6,224,866호 및 WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930 및 WO 2000/74718 (Goldenberg and Hansen); US 2003/0219433 및 WO 2003/68821 (Hansen et al.); WO 2004/058298 (Goldenberg and Hansen); WO 2000/76542 (Golay et al.); WO 2001/72333 (Wolin and Rosenblatt); 미국 특허 제6,368,596호 (Ghetie et al.); 미국 특허 제6,306,393호 및 US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner and Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar et al.); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US 2002/0009427 및 US 2003/0185796 (Wolin et al.); WO 2003/061694 (Sing and Siegall); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US 2003/0219433 및 WO 2003/068821 (Hansen et al.); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US 2002/0136719 (Shenoy et al.); WO 2004/032828 (Wahl et al.); 및 WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter)을 들 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,849,898호 및 EP 330,191 (Seed et al.); EP 332,865 A2 (Meyer and Weiss); 미국 특허 제4,861,579호 (Meyer et al.); US 2001/0056066 (Bugelski et al.); WO 1995/03770 (Bhat et al.); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al.); WO 2004/035607 (Teeling et al.); WO 2004/056312 (Lowman et al.); US 2004/0093621 (Shitara et al.); WO 2004/103404 (Watkins et al.); WO 2005/000901 (Tedder et al.); 및 US 2005/0025764 (Watkins et al.)를 참조한다.

<29>

리툭시마브를 사용한 요법에 관한 간행물로는 문헌 [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., "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis, 상기 문헌]; [Leandro et al., "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" Arthritis and Rheumatism 44(9):S370 (2001)]; [Leandro et al., "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis and Rheumatism, 46:2673-2677 (2002)] (여기서, 2주 기간 동안, 각각의 환자는 리툭시마브 500-mg 2회 주입, 시클로포스파미드 750-mg 2회 주입, 및 고-투여량 경구 코르티코스테로이드를 투여받았으며, 치료된 환자 중 2명은 각각 7개월 및 8개월에 재발되었고, 재치료되었지만, 프로토콜은 상이하였음); ["Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" Weide et al., Lupus, 12: 779-782 (2003)] (여기서, 환자는 리툭시마브 (375 mg/m² x 4, 매주 간격으로 반복됨)로 치료되었고, 추가의 리툭시마브 적용은 매 5 내지 6개월마다에 전달되된 후, 유지 요법은 매 3개월마다 리툭시마브 375 mg/m²로 투여되었으며, 난치성 SLE를 갖는 제2 환자는 리툭시마브로 성공적으로 치료되었고, 매 3개월마다 유지 요법을 받았으며, 환자 둘다는 리툭시마브 요법에 잘 반응하였음); [Edwards and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocyte" 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): S 1350 (2002)]; [Edwards et al., "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" Biochem Soc. Trans., 상기 문헌]; [Edwards et al., "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibodies: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 46(9): S 197 (2002)]; [Edwards et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis," N. Engl J. Med. 350:2572-82 (2004)]; [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 a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And Rheumatism*, 48:(9) 9,S (SEP), page: 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), p922-4 (2002) Comment in *Ann Rheum Dis.* 61:863-866 (2002)]; ["Future Strategies in Immunotherapy" by Lake and Dionne, 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 Indusion 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 (<www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.aspx>)]; [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 Indusion of 완화 and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>]을 들 수 있다. 또한, 문헌 [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):S1 160 (2003)]을 참조한다.

<30>

파골세포 형성에서 B 림프구의 역할은, 파골세포형성 및 수명에 대한 B-계통 세포 자극성 및 억제성 효과 둘다가 보고되었기 때문에 쟁점이 된다. B-림프양 계통 세포는 파골세포 분화를 뒷받침하고 파골세포 전구체로서 기능하는 ODF/RANKL을 발현함으로써, 2가지 방식으로 파골세포형성에 참여할 수 있다 (문헌 [Manabe et al., *J. Immunol.*, 167 (5):2625-2631 (2001)]). 오스테오프로테이트는 B-세포 성숙 뿐만 아니라 골 대사를 조절한다 (문헌 [Yun et al., *J. Immunol.*, 166(3):1482-1491 (2001)]). B 세포는 세포에서 아폽토시스를 유도하는 인자인 전환 성장 인자-베타 (TGF-β)를 분비함으로써 파골세포 형성물의 형성을 억제하며, 성숙 파골세포 형성물의 수명을 단축하는 것으로 나타났다 (문헌 [Weitzmann et al., *J. Cell. Biochem.*, 78:(2):318-324 (2000)]). B-림프구 전구체는 기능성 파골세포를 유발할 수 있다 (문헌 [Grcevic et al., *Croatian Medical Journal*, 42(4):384-392 (2001)]).

<31>

래트 보조 관절염 연구에서의 비스포스포네이트는, 에트리드로네이트 및 클로드로네이트가 체중 감소, 발의 염

증 및 골 흡수를 감소시킴을 포함한다 (문헌 [Flora et al., *Arthritis Rheum.*, 22:340-346 (1978)]). NE58095는 실험적 관절염에서 골 침식을 방지하고 관절 구조를 보존하는 디포스포네이트이다 (문헌 [Francis et al., *Int. J. Tis. Res.*, 11:239-252 (1989)]). 콜레드로네이트는 실험적 염증성 관절염에서 전이성 골괴질내 결손을 보호한다 (문헌 [Pysklowec et al., *J. Orthop. Res.*, 15:858-861 (1997)]). 클로드로네이트 (20 mg/kg/일, 정맥내 주입)는 발의 염증 및 골 흡수를 감소시키지만, 또한 골 형성을 억제한다 (문헌 [Oelzner et al., *Inflamm. Res.*, 49: 424-433 (2000)]).

<32> 모든 승인된 비스포스포네이트 (파미드로네이트, 알렌드로네이트, 리세드로네이트, 콜레드로네이트)는 골 흡수의 생화학적 측정을 개선 (전신 골 소실을 감소)시킬 뿐만 아니라, 국소 골 침식의 진행을 억제한다 (Gravallese, 상기 문헌). 비스포스포네이트는 류마티스성 관절염에서 구조적 변화를 감속시키는 잠재적인 요법으로서 간주될 수 있고, 효능, 장기 용인성 및 독성을 공지되어 있지 않으며, 보다 많은 시험이 필요하다.

<33> 조직 성장 및 복구에서 성장 인자의 역할에 대한 지식이 증가되고 있지만, 당분야에는 골, 인대 및 연골의 성장의 촉진을 위한 물질 및 방법에 대한 필요가 남아 있다. 또한, 파골세포형성의 조절 및 성숙한 파골세포의 활성의 재흡수 방법에 대한 필요가 있다. 또한, 골 소실의 예방 및 골 질환의 치료 방법에 대한 필요가 있다.

발명의 요약

<35> 따라서, 본 발명은 청구된 바와 같다. 본 발명은 골 장애를 갖는 대상체에 있어서 안전하고 적극적인 치료 처방을 제공하는 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제의 투여를 포함한다.

<36> 제1 측면에서, 본 발명은 유효량의 CD20 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

<37> 또 다른 측면에서, 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 유효량의 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법에 관한 것이다.

<38> 또 다른 측면에서, 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 유효량의 길항제를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법을 제공한다.

<39> 추가의 측면에서, 본 발명은 CD20 항체, 또는 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 길항제를 포함하는 용기; 및 포유동물에서의 골 장애의 치료를 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하며, 상기 지시서는 CD20 항체, 또는 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 길항제가 유효량으로 포유동물에게 투여됨을 지시하는 것인 제조품을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 제조품은 치료용 항체 이외의 작용제를 포함하는 용기를 추가로 포함하며, 이러한 작용제를 사용한 포유동물의 치료에 관한 지시서를 추가로 포함한다.

<40> 상기 본 발명의 측면의 바람직한 실시양태에서, 골 장애는 골다공증, 또는 관절 침식 및 연골하 골 침식 (골 수)을 비롯한 국소 골 침식, 골 결손, 소아기 특발성 골 소실, 치조골 소실, 골절, 또는 관절-근부 골감소증과 같은 골감소증이거나, 류마티스성 관절염과 같은 자가면역 질환과 관련된 골 소실이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 CD20 항체를 류마티스성 관절염과 같은 염증성 관절염증에서의 침식성 골 질환을 앓고 있는 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 질환의 예방 방법을 제공한다. 또한, 본 발명 내에는, 자가면역 질환 (특히, 류마티스성 관절염) 또는 자가면역 질환의 발병 위험과 관련이 없는 골 장애의 치료 방법이 있다.

<41> 또 다른 바람직한 측면에서, 제2 의약이 유효량으로 포유동물에게 투여되며, CD20 항체, 또는 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 길항제는 제1 의약이다. 이러한 의약은 하나 이상의 의약일 수 있다. 보다 바람직하게는, 이러한 제2 의약은 파골세포-관련된 장애 치료제 (예를 들어, 오스테오프로테게린, MMP 억제제, 사이토킨, 예를 들어 IL-4, 베타 글루칸, 인테그린 길항제, 칼시토닌, 양성자 펌프 억제제, 프로테아제 억제제, 비스포스포네이트, 예를 들어 리세드로네이트, 에티드로네이트, 클로드로네이트, NE-58095, 콜레드로네이트, 파미드로네이트 또는 알렌드로네이트), 면역억제제, 질환-조절 항류마티스 약물 (DMARD), 세포독성제, 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 호르몬, 또는 이들의 조합이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 항체는 바람직하게는 정맥내 또는 피하 투여된다.

<42> 상기 마지막 측면의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 이전에 CD20과 같은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체로 치료되지 않았고/거나, 골 장애의 치료를 위해 CD20 항체를 비롯한 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 이외의 다른 의약은 포유동물에게 투여되지 않는다.

<43> 추가의 측면에서, 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체, 바람직하게는 CD20 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 단리된 치아전구세포 또는 골전구세포를 상기 포유동물 내로 도입하는 것을 포함하는, 포유동물에서의

골용해의 억제 방법을 제공한다. 세포가 치아전구세포일 경우, 상기 포유동물은 치주염, 또는 치주 질환으로 인한 치조골 소실을 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 치아전구세포는 턱의 하악 구역의 치주 인대에 투여될 수 있다.

<44> 또 다른 실시양태에서, 세포가 골전구세포일 경우, 이는 상기 포유동물의 인공 관절 내로 임플란트될 수 있으며, 경골내 또는 대퇴내 투여될 수 있다. 또한, 상기 항체의 발현은 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체와 같은 항생제 화합물에 의해 조절될 수 있으며, 또한 미노사이클린이 상기 포유동물에게 투여될 수 있다. 이러한 항생제 화합물은 바람직하게는 전신 투여된다.

<45> 인터루킨-4 또는 종양 과사 인자-알파 (TNF- α)의 억제제는 이러한 상황에서 포유동물에게 추가로 투여될 수 있다. 또한, 이러한 포유동물은 류마티스성 관절염 또는 치근단주위 또는 연골내 골 소실, 인공 관절 입자-유도된 골용해 또는 골용해성 골 전이를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있을 수 있다.

<46> 골 성장의 촉진이 유익한 상태로는 예를 들어 척추동물, 예를 들어 포유동물 (인간 포함)에서의, 골 이식의 강화, 척추 골유합의 유도, 장골 확대의 증진, 안면 재건, 상악 재건 및/또는 하악 재건 후 골 치유의 증진 등을 들 수 있다.

<47> 본 발명의 방법에 의해 달성된 파골세포 활성의 억제는, 임의의 이론에 구애되지는 않지만 파골세포의 흡수 메카니즘의 억제성 활성의 결과일 수 있거나, 전구세포로부터 모집된 파골세포의 수의 억제의 결과일 수 있거나, 둘다의 조합일 수 있다. 대부분의 노인, 특히 폐경기후 여성에게 영향을 주는 골다공증에서, 골모세포에 의한 골 형성은 감속되고, 골 흡수는 증가하며, 이는 노화 과정으로 인해 정상적으로 일어나는 현상이다. 본원의 방법은 그 중에서도 골모세포 형성을 증진시키고, 따라서 골 형성을 증가시키는 것을 의도한다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

<54> "B 세포"는 골수 내에서 성숙하는 림프구이며, 천연 B 세포, 기억 B 세포, 또는 효과기 B 세포 (형질 세포)를 들 수 있다. 본원에서 B 세포는 정상 또는 비-악성 B 세포일 수 있다.

<55> 본원에서 "B 세포 표면 마커" 또는 "B 세포 표면 항원"은 그에 결합하는 길항체와 표적화될 수 있는 B 세포의 표면 상에 발현된 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 마커 (설명에 대해서는, 문헌 [The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York] 참조)를 들 수 있다. 다른 B 세포 표면 마커로는 RP105, FcRH2, CD79A, C79B, CR2, CCR6, CD72, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BTLA, NAG14 (aka LRRK4), SLGC16270 (aka LOC283663), FcRH1, IRTA2, ATWD578 (aka MGC15619), FcRH3, IRTA1, FcRH6 (aka LOC343413) 및 BCMA (aka TNFRSF17)를 들 수 있다. 특정 관심의 B 세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B 세포 조직에 비해 B 세포 상에 선호적으로 발현되며, 전구체 B 세포 및 성숙 B 세포 둘다 상에 발현될 수 있다. 본원에서 바람직한 B 세포 표면 마커는 CD20 및 CD22이다.

<56> "CD20" 항원, 또는 "CD20"은 말초 혈액 또는 림프양 기관으로부터의 90% 초파의 B 세포의 표면 상에서 발견되는 비-글리코실화된 인단백질이다. CD20은 초기 프리-B 세포 발생 동안 발현되며, 혈장 세포 분화 때까지 남아 있다. CD20은 정상 B 세포 및 악성 B 세포 둘다에 존재한다. 문헌상 CD20에 대한 다른 명칭은 "B-림프구-제한된 항원" B1 및 "Bp35"이다. CD20 항원은 예를 들어 문헌 [Clark et al. PNAS (USA) 82: 1766 (1985)]에 기재되어 있다.

<57> BL-CAM 또는 Lyb8로도 알려진 "CD22" 항원, 또는 "CD22"는 분자량이 약 130 (감소됨) 내지 140 kD (비감소됨) 인 제1형 내재 막 당단백질이다. 이는 B-림프구의 세포질 및 세포막 둘다에서 발현된다. CD22 항원은 B-세포 림프구 분화의 초기에 CD19 항원과 대략 동일한 단계에서 나타난다. 다른 B-세포 마커와 달리, CD22 막 발현은 성숙 B 세포 (CD22+)와 혈장 세포 (CD22-) 사이에 포함된 후기 분화 단계에 제한된다. CD22 항원은 예를 들어 문헌 [Wilson et al. J. Exp. Med. 173:137 (1991)] 및 [Wilson et al. J. Immunol. 150:5013 (1993)]에 기재되어 있다.

<58> "길항체"는 B 세포 상의 CD20에 결합시 포유동물에서 B 세포를 파괴하거나 고갈시키고/거나, B 세포에 의해 유도된 체액성 반응을 감소시키거나 방지함으로써 하나 이상의 B 세포 기능을 방해하는 분자이다. 길항체는 바람직하게는 이로 치료되는 포유동물에서 B 세포를 고갈시킬 (즉, 순환 B 세포 수준을 감소시킬) 수 있다. 이러한

고갈은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC), B 세포 증식의 억제 및/또는 B 세포 사멸의 유도 (예를 들어, 아폽토시스를 통해)와 같은 다양한 메카니즘을 통해 달성될 수 있다. 본 발명의 범위 내에 포함되는 길항체로는 임의로 세포독성제와 컨쥬게이션되거나 세포독성제에 융합된 항체, 합성 또는 천연-서열 웹티드, 이뮤노어드헤신, 및 CD20에 결합하는, 소-분자 길항체를 들 수 있다. 바람직한 길항체는 항체를 포함한다.

<59> 본원에서 "항체 길항체"는 B 세포 상의 B-세포 표면 마커에 결합시 포유동물에서 B 세포를 파괴하거나 고갈시키고/거나, B 세포에 의해 유도된 체액성 반응을 감소시키거나 방지함으로써, 하나 이상의 B 세포 기능을 방해하는 분자이다. 항체 길항체는 바람직하게는 이로 치료되는 포유동물에서 B 세포를 고갈시킬 (즉, 순환 B 세포 수준을 감소시킬) 수 있다. 이러한 고갈은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC), B 세포 증식의 억제 및/또는 B 세포 사멸의 유도 (예를 들어, 아폽토시스를 통해)와 같은 다양한 메카니즘을 통해 달성될 수 있다.

<60> 본원에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 비손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 증가된 반감기, 및 모체 IgG의 태아에의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에의 개선된 결합을 갖는 항체 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])는 상기 정의에 포함되며, WO 00/42072 및 US 2005/0014934 A1에 기재되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는, 그 안에 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 개선된 FcRn 결합을 갖는 바람직한 Fc-영역 포함 항체 변이체는 그의 Fc 영역의 1, 2 또는 3개의 위치에 아미노산 치환을 포함한다.

<61> "항체 단편"은 전장 항체의 일부분, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

<62> 본원의 목적상, "비손상 항체"는 Fc 영역 뿐만 아니라 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것이다.

<63> "B-세포 표면 마커에 결합하는 항체"는 B-세포 표면 마커에 결합시 포유동물에서 B 세포를 파괴하거나 고갈시키고/거나, B 세포에 의해 유도된 체액성 반응을 감소시키거나 방지함으로써, 하나 이상의 B 세포 기능을 방해하는 분자이다. 항체는 바람직하게는 이를 사용해 치료되는 포유동물에서 B 세포를 고갈시킬 (즉, 순환 B 세포 수준을 감소시킬) 수 있다. 이러한 고갈은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC), B 세포 증식의 억제 및/또는 B 세포 사멸의 유도 (예를 들어, 아폽토시스를 통해)와 같은 다양한 메카니즘을 통해 달성될 수 있다. 바람직한 일 실시양태에서, 항체는 주요 임상 반응을 유도한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, B-세포 표면 마커는 각각 CD20 또는 CD22이며, 따라서 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체는 CD20 또는 CD22, 또는 각각 "CD20 항체" 또는 "CD22 항체"에 결합한다. CD22 항체의 예로는 EP 1,476,120 (Tedder and Tuscano), EP 1,485,130 (Tedder), 및 EP 1,504,035 (Popplewell et al.)에 기재된 것, 뿐만 아니라 US 2004/0258682 (Leung et al.)에 기재된 것을 들 수 있다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항체는 CD20 항체이다. 특히 바람직한 실시양태는 주요 임상 반응을 유도하는 CD20 또는 CD22 항체, 바람직하게는 CD20 항체이다. 본원의 목적상, "주요 임상 반응"은 연속적인 6개월 동안 미국 류마티즘 대학 70 반응 (ACR 70)을 달성하는 것으로 정의된다. ACR 반응 스코어는 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70으로 분류되며, ACR 70이 상기 평가 시스템에서 가장 높은 징후 및 증상 제어의 수준이다. ACR 반응 스코어는 관절 팽창 및 압통을 비롯한 류마티스 성 관절염 질환 활성, 통증, 무능의 수준, 및 전체 환자 및 의사 평가에서의 개선을 측정한다. FDA에 의해 인식된 바와 같고 본원에서 정의된 바와 같은 주요 임상 반응을 유도하는 여러가지 종류의 항체의 예는 에타네르셉트 (엔브렐(ENBREL)(등록상표))이다.

<64> CD20 항체의 예로는 현재 "리툭시마브" ("리툭산(RITUXAN)(등록상표)")로 지칭되는 "C2B8" (미국 특허 제 5,736,137호); "Y2B8" 또는 IDEC 파마슈티칼스, 인크.(IDEC Pharmaceuticals, Inc.)에서 시판되는 "이브리투모마브 티وخ세탄(Ibritumomab Tiuxetan)" (제발린(ZEVALIN)(등록상표))으로 지칭되는 이트륨-[90]-표지된 2B8 뮤린 항체 (미국 특허 제5,736,137호); 1993년 6월 22일자로 ATCC에 수탁 번호 HB11388로 기탁된 2B8; 코리사 (Corixa)에서 시판되는 임의로 ¹³¹I로 표지되어 "131I-B1" 또는 "요오드 I131 토시투모마브" 항체 (백사르 (BEXXAR)(상표명))를 생성하는, "토시투모마브(Tositumomab)"로도 지칭되는 뮤린 IgG2a "B1" (또한 미국 특허 제5,595,721호 참조); 뮤린 모노클로날 항체 "1F5" ([Press et al. Blood 69(2):584-591 (1987)] 및 "프레임워크 패치된" 또는 인간화 1F5를 비롯한 그의 변이체 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC 기탁 HB-96450); 뮤린

2H7 및 키메라 2H7 항체 (미국 특허 제5,677,180호); 인간화 2H7 (WO 2004/056312, Lowman et al.) 및 하기 설명된 바와 같음); 휴맥스(HUMAX)-CD20(상표명) 완전 인간 항체 (젠탱(Genmab), 덴마크; 예를 들어, [Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510 (2003)] 및 [Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003)] 참조); WO 2004/035607 (Teeling et al.)에 설명된 인간 모노클로날 항체; US 2004/0093621 (Shitara et al., 아플라이드 몰리큘라 에볼루션(Applied Molecular Evolution))에 설명된 바와 같은, 항체의 AME 계열과 같은 CD20 결합 분자, 예를 들어 AME-133(상표명) 항체; A20 항체 또는 키메라 또는 인간화 A20 항체와 같은 그의 변이체 (각각 cA20, hA20) (US 2003/0219433, 이뮤노메딕스(Immunomedics)); 및 인터내셔널 류코사이트 타이핑 워크샵(International Leukocyte Typing Workshop)에서 이용가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 ([Valentine et al., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))]를 들 수 있다. 본원에서 바람직한 CD20 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 CD20 항체, 보다 바람직하게는, 인간화 2H7 항체, 리툭시마브, 키메라 또는 인간화 A20 항체 (이뮤노메딕스) 및 휴맥스-CD20(상표명) 인간 CD20 항체 (젠탱)이다.

<65> 본원에서 "리툭시마브" 또는 "리툭산(등록상표)"이라는 용어는 CD20에 결합하는 능력을 보유하는 그의 단편을 비롯한, CD20 항원에 대한 유전학적으로 조작된 키메라 뮤린/인간 모노클로날 항체를 지칭하며, 미국 특허 제5,736,137호에서 "CD28"로 지칭된다.

<66> 순수하게 본원의 목적상, 그리고 달리 지시되지 않는다면, "인간화 2H7"은 인간화 CD20 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 지칭하며, 항체는 생체내에서 영장류 B 세포를 고갈시키는데 유효하고, 항체는 중쇄 가변 영역 (V_H)에 적어도 항-인간 CD20 항체로부터의 서열 12의 CDR H3 서열 (도 1B), 및 실질적으로 인간 중쇄 아군 III (V_H III)의 인간 컨센서스 프레임워크 (FR) 잔기를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 항체는 서열 10의 중쇄 CDR H1 서열, 및 서열 11의 CDR H2 서열을 추가로 포함하고, 보다 바람직하게는 서열 4의 경쇄 CDR L1 서열, 서열 5의 CDR L2 서열, 서열 6의 CDR L3 서열, 및 실질적으로 인간 경쇄 아군 I (VI)의 인간 컨센서스 프레임워크 (FR) 잔기를 포함하며, V_H 영역은 인간 IgG 쇄 불변 영역에 결합될 수 있고, 영역은 예를 들어 IgG1 또는 IgG3일 수 있다. 또한, WO 2004/056312 (Lowman et al.)를 참조한다.

<67> 바람직한 실시양태에서, 이러한 항체는 서열 8의 V_H 서열 (v16, 도 1B에 나타난 바와 같음)을 포함하며, 임의로 또한 서열 2의 V_L 서열 (v16, 도 1A에 나타난 바와 같음)을 포함하며, 중쇄에 D56A 및 N100A의 아미노산 치환, 및 경쇄에 S92A (v96)를 가질 수 있다. 바람직하게는, 항체는 각각 서열 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 비순상 항체 2H7.v16이다. 또 다른 바람직한 실시양태는 항체가 각각 서열 13 및 15의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 2H7.v31인 경우이다. 본원에서 항체는 아미노산 치환이 S298A/E333A/K334A, 보다 바람직하게는 서열 15의 중쇄 아미노산 서열을 갖는 2H7.V31인 것과 같은, ADCC 및/또는 CDC 활성을 개선시키는 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태는 항체가 2H7.v16의 상응하는 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 갖는 서열의 정렬인 도 2 및 3에 나타난 바와 같은 각각 서열 28 및 29의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 2H7.v138인 경우이다. 대안적으로, 이러한 바람직한 비순상 인간화 2H7 항체는 N434W의 아미노산 치환을 제외하고 2H7.v138의 경쇄 및 중쇄 서열을 갖는 2H7.v477이다. 임의의 상기 항체는 CDC 활성을 감소시키는 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어 치환 K322A를 포함한다. 미국 특허 제6,528,624B1호 (Idusogie et al.)를 참조한다.

<68> 일부 바람직한 인간화 2H7 변이체는 서열 2의 가변 경쇄 도메인 및 서열 8의 가변 중쇄 도메인을 갖는 것, 즉 Fc 영역에 치환이 있거나 없는 것, 및 서열 8에 변경 N100A 또는 D56A 및 N100A를 갖는 가변 중쇄 도메인, 및 서열 2에 변경 M32L, 또는 S92A, 또는 M32L 및 S92A를 갖는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 것, 즉 Fc 영역에 치환이 있거나 없는 것이다. 치환이 Fc 영역에서 이루어질 경우, 이는 바람직하게는 하기 표에 설명된 것 중 하나이다.

<69> 본 발명의 일부 다양한 바람직한 실시양태의 요약에서, 2H7 형태 16에 기반한 변이체의 V 영역은 하기 표에 지시된 아미노산 치환의 위치를 제외하고 v16의 아미노산 서열을 가질 것이다. 달리 지시되지 않는다면, 2H7 변이체는 v16의 경쇄와 동일한 경쇄를 가질 것이다.

2H7 형태	증쇄 (V _H) 변화	경쇄 (V _L) 변화	Fc 변화
16	-	-	-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
	D56A, N100A	S92A	
96	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
114	D56A, N100A	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

<70>

<71> 특히 바람직한 인간화 2H7은 가변 경쇄 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQQGTKVEIKR (서열 2);

<72>

<73> 및 가변 증쇄 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
 KFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFDWGQGTLTVSS

<74>

<75> (서열 8).

<76> 을 포함하는 비손상 항체 또는 항체 단편이다.

<77>

<78> 인간화 2H7 항체가 비손상 항체일 경우, 바람직하게는 이는 경쇄 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 13);

<79>

<80> 및 증쇄 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
 KFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFDWGQGTLTVSS
 TKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 14)

<81>

<82> 또는 증쇄 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
 KFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFDWGQGTLTVSS
 TKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 15).

<83>

<84> 을 포함한다.

<83> 또 다른 바람직한 실시양태에서, 비손상 인간화 2H7 항체는 경쇄 아미노산 서열

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCCLNNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 28)
```

<84>

<85> 및 중쇄 아미노산 서열

```
EVQLVESGGGLVQPSSRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQ
KFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYASYWYFDVWGQGTIVTVSSAS
TKCPSSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDGYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVLF
PPPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 29).
```

<86>

<87> 을 포함한다.

<88>

또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 2H7 항체는 서열 30의 경쇄 가변 영역 (V_L) 서열 및 서열 8의 중쇄 가변 영역 (V_H) 서열을 포함하며, 항체는 VH-CDR2에 D56A의 아미노산 치환을 추가로 함유하고, VH-CDR3의 N100은 Y 또는 W로 치환되고, 서열 30은 서열

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKEIKR (서열 30).
```

<89>

<90> 을 갖는다.

<91>

상기 마지막 인간화 2H7 항체의 일 실시양태에서, N100은 Y로 치환된다. 또 다른 실시양태에서, N100은 W로 치환된다. 더욱이, 추가의 실시양태에서, 항체는 VH-CDR3에 치환 S100aR을 포함하고, 바람직하게는 아미노산 치환 S298A, E333A, K334A, K326A를 포함하는 IgG1 Fc를 포함하는 것과 같은, ADCC 및/또는 CDC 활성을 개선시키는 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 대안적으로, 항체는 VH-CDR3에 치환 S100aR을 포함하고, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환 K322A를 포함하는 것, 뿐만 아니라 아미노산 치환 S298A, E333A, K334A를 추가로 포함하는 것과 같은, ADCC를 개선시키지만 CDC 활성을 감소시키는 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

<92>

특히 바람직한 일 실시양태에서, 항체는 2H7.v511 경쇄

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKEIKR (서열 31).
```

<93>

<94> 및 2H7.V511 중쇄

```
EVQLVESGGGLVQPSSRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRYWYFDVWGQGTIVTV
SSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDGYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELL
GGPSVFLPPPDKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPVYTLPPSR
EEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 32).
```

<95>

<96> 를 포함한다.

<97>

"항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 중성구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고, 이어서 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 주요한 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발

현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 제464면의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 당해 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같이 동물 모델에서 평가될 수 있다.

<98> "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하며 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 들 수 있으며, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다.

<99> "Fc 수용체" 또는 "FcR"이라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재하는데 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 것이며, 대립유전자 변이체를 비롯한 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII의 수용체, 및 대안적으로 상기 수용체의 스플라이싱된 형태를 들 수 있다. Fc γ RII 수용체는 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]의 리뷰를 참조한다). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에 검토되어 있다. 장래에 확인될 것을 포함하는 다른 FcR은 본원의 "FcR"이라는 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 모체 IgG의 태아에의 전달을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

<100> "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에서의 표적 세포를 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 동족체 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어, 항체)에의 보체 시스템 (Clq)의 제1 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석이 수행될 수 있다.

<101> "성장-억제성" 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지하거나 감소시키는 것이다. 예를 들어, 항체는 시험관내 및/또는 생체내에서 B 세포의 증식을 방지하거나 감소시킬 수 있다.

<102> "아폽토시스"를 유도하는 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (아폽토시스 바디라고 불림)의 형성과 같은 표준 아폽토시스 분석에 의해 측정되는 바와 같은, 예를 들어 B 세포의 프로그램된 세포 사멸을 유도하는 것이다.

<103> "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종 사량체성 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디슬피드 결합에 의해 중쇄에 결합되는 반면, 디슬피드 결합의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄내 디슬피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 많은 불변 도메인에 이어지는 가변 도메인 (V_H)을 하나의 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 (V_L) 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 가지며, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 믿어진다.

<104> "가변"이라는 용어는 가변 도메인의 특정 부분이 항체 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭하며, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘다에 있는 초가변 영역이라 불리는 3개의 절편에 집약되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 β -쉬트 구조를 연결하고 일부의 경우 그의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 β -쉬트 형태를 크게 채택하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각각의 쇄의 초가변 영역은 다른 쇄로부터의 초가변 영역과 함께 FR에 의해 가까이 근접하여 함께 수용되어 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여하지는 않지만, 항체가 항체 의존성 세포독성 (ADCC)에 참여하는 것과 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

<105> 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 잔여 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다.

<106> "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 영역은 단단한 비-공유 결합의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정하는 것은 이러한 형태이다. 집합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 낮은 친화도이기는 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.

<107> Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 헌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 소수의 잔기가 첨가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 본원의 지칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 헌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.

<108> 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 명백히 구별되는 형태 중 하나로 분류될 수 있다.

<109> 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 비순상 항체는 상이한 부류로 분류될 수 있다. 비순상 항체에는 5가지 주요한 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이는 "하위부류" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 더 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 삼차원 형태는 널리 공지되어 있다.

<110> "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 상기 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하도록 하는 V_H 과 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해서는 문헌 [Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

<111> "디아바디"라는 용어는 동일한 폴리펩티드 쇄 ($V_H - V_L$) 내의 가변 경쇄 도메인 (V_L)에 연결된 가변 중쇄 도메인 (V_H)을 포함하는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이룰 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루며, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 충분히 기재되어 있다.

<112> 본원에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터의 항체를 지칭하며, 즉 집단에 포함되는 개별 항체는 모노클로날 항체의 생성 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 (이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재함) 동일하고/거나 동일한 에피토프(들)에 결합한다. 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터의 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선별을 포함하는 과정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선별 과정은 하이브리도마 클론, 과지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀과 같은 다수의 클론으로부터 고유한 클론을 선별하는 것일 수 있다. 선별된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양물에서의 그의 생성을 개선시키고, 생체내에서 그의 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체를 생성하는 등을 위해 추가로 변경될 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 모노클로날 항체이다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조물과 반대로, 모노클로날 항체 제조물의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대한 것이다. 그의 특이성 이외에, 모노클로날 항체 제조물은 이들이 전형적으로 다른

이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 변형어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특징을 나타내며, 항체의 생성이 임의의 특정 방법에 의한 것을 요구하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 예를 들어 하이브리도마 방법(예를 들어, 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]; [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조), 파지 제시 기술(예를 들어, 문헌 [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 이뮤노글로불린 좌위 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서의 인간 또는 인간-유사 항체의 제조 기술(예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [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 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,591,669호(모두 젠팜(GenPharm)); 제5,545,807호; WO 1997/17852; 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호; [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

<113>

본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체, 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 당해 키메라 항체는 비-인간 영장류(예를 들어, 구세계 원숭이, 에이프 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체, 뿐만 아니라 "인간화" 항체를 포함한다.

<114>

비-인간(예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역으로부터의 잔기가, 목적하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여자 항체)의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린(수여자 항체)이다. 일부의 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형이 이루어져 항체 성능을 추가로 개량한다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프가 비-인간 이뮤노글로불린의 그것과 상응하는, 실질적으로 모든 하나 이상의, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 상기 설명된 바와 같은 FR 치환(들)을 제외하고는 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것을 포함할 것이다. 추가의 상세사항에 대해서는 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

<115>

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

<116> "네이키드 항체"는 세포독성 부분 또는 방사성표지와 같은 이종 분자와 컨쥬게이션되지 않은 항체이다.

<117> "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리되고/거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 간섭할 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바와 같이 항체 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과까지, (2) 스페닝 캠 서열분석기를 사용하여 15 잔기 이상의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 수득하는데 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시(Coomassie) 블루, 또는 바람직하게는 실버 염료를 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 동질성으로 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 동일계내에서 재조합 세포내의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

<118> 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 운동경기 또는 애완 동물을 비롯한 포유동물로 분류되는 임의의 동물, 예를 들어 개, 말, 고양이, 소 등을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 이러한 포유동물을 골 장애의 하나 이상의 징후, 증상 또는 다른 적응증을 앓고 있거나 앓은 적이 있고, 예를 들어 새롭게 진단되었거나 이전에 진단되었거나 골 장애로 진단되었고, 현재 재발을 경험하거나, 골 장애가 발병할 위험이 있는, 골 장애에 대한 치료에 적격인 환자를 포함하는 대상체이다. 포유동물은 CD20 항체로 이전에 치료되었거나 그렇게 치료되지 않았을 수 있다. 골 장애의 치료에 적격인 포유동물은 임의로 혈액에서 CD20 세포의 침윤의 상승된 수준에 대해 스크리닝될 때 확인될 수 있다.

<119> 본원에서 포유동물의 "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 수단 둘다를 지칭한다. 치료의 필요가 있는 것은 골 장애를 이미 갖는 것 뿐만 아니라 골 장애가 예방되어야 할 것을 포함한다. 따라서, 포유동물은 골 장애를 갖는 것으로 진단되었을 수 있거나, 골 장애에 걸리기 쉬울 수 있다. 본원에서 사용된 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 방지적 (예를 들어, 예방적), 완화적 및 치유적 처치를 포함한다. 본 발명의 방법은 감소된 골절 비율을 초래하는 골 형성을 초래한다. 본 발명은 골다공증 및 관련된 골 장애의 예방, 지연 및/또는 퇴화를 초래하는 골 형성을 증가시키는 방법을 제공함으로써 당업계에 유의하게 기여한다.

<120> 골 장애의 "증상"은 포유동물에 의해 경험되고 상기 설명된 것과 같은 질환의 지표인 구조, 기능 또는 감각에서 정상으로부터 임의의 병적인 현상 또는 이탈이다.

<121> "파골세포-관련된 장애 치료제"라는 어구는 본원에서 정의된 바와 같은 골 장애의 증상을 억제, 예방, 치료 또는 경감시키는데 사용될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 예로는 성장 인자 및 골 또는 결합 조직의 성장에 긍정적인 영향을 갖는 다른 치료제, 예를 들어 성장 인자, 예를 들어 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), PDGF, 알파-전환 성장 인자 (TGF- α)의 억제제, 베타-전환 성장 인자 (TGF- β), 표피 성장 인자 (EGF), 골 형태형성 단백질, 백혈병 억제성 인자, 섬유모세포 성장 인자, 사이토킨, 예를 들어 인터루킨-4 (IL-4) 및 US 2004/0126364에 기재된 바와 같은 IL-4의 돌연변이체, US 2004/0043031 및 미국 특허 제6,663,870호에 기재된 바와 같은 Zvegf3 단백질, 및 zvegf4 단백질, 뿐만 아니라 다른 치료제, 예를 들어 비타민 D, 비스포스포네이트, 칼시토닌, 에스트로겐, 부갑상선 호르몬, 오스테오케니, NaF, 오스테오프로테게린, 스타틴, 미국 특허 제6,682,739 B1호 및 제6,673,771 B1호에 기재된 바와 같은 파골세포 골 침식 활성의 억제에 유효한 TRANCE/RANK 억제제, US 20040058889에 기재된 바와 같은 골다공증 및 골 흡수의 다른 질환의 치료용 베타 글루칸, 골 형성에 유익한 당업계에 공지된 1종 이상의 화합물, 예를 들어 칼슘, 플루오르화물, 마그네슘, 봉소, 또는 이들의 조합; 미국 특허 제6,660,728호에 기재된 바와 같은 골 흡수의 억제제로서의 티에닐-치환된 아실글루아닌 및 비트로넥틴 수용체 길항제; 미국 특허 제6,602,878호에 기재된 바와 같은 아실쿠아닌 유도체; 글리콜산, 락트산, 콜라겐, 탈염화된 골, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 매트릭스를 들 수 있다. 피브로넥틴을 포함하는 제1 생물학적 활성 분자는 매트릭스의 일부분에 부착되어 골모세포 활성을 용이하게 하고, 골 형성의 증가를 촉진시킨다. 파골세포를 유인하고 파골세포 활성에 대한 억제 효과를 생성함으로써 골 흡수의 감소를 촉진시키는 그의 능력에 대해 선택된 비트로넥틴을 포함하는 제2 생물학적 활성 분자는 또한 US 2003/0219429에 기재된 바와 같은 매트릭스의 일부분에 부착되며, 플라스미노겐 활성화제 억제제는 2가지 부류가 있다. 상기 2가지 부류는 SERPIN (세핀 프로테아제 억제제) 및 넥신 I이다. SERPIN의 부류 내에는 2가지 유형의 억제제, 즉 PAI-1 및 PAI-2가 있다. PAI-1은 잠복성 및 활성 형태 둘다로 존재한다; 프로테오글리칸; 피브로넥틴 및 피브로넥틴 단편; 비트로넥틴 및 비트로넥틴 단편; 콜라겐 및 콜라겐 단편; 헤파린 및 헤파린 단편; 본 빌레브란트 인자; 본 시알로프로테인; 오스테오폰틴; 오스테오넥틴; 오스테오칼신; 셀렉틴 및 셀렉틴 단편; 세포 부착을 용이하게 하는 단백질 및 웹티드 (시클릭 형태 포함); RGD-유형 (Arg-Gly-Asp) 및 GPR (Gly-Pro-Arg) 등; GHK-유형 (Gly-His-Lys) 등; 라미닌 또는 라미닌 단편 등; EIL-유형 (Glu-Ile-

Leu) 등; LDV-유형 (Leu-Asp), LDV-NH₂ (Leu-Asp-Val-NH₂) 등; 아미노산의 RGD 또는 GHK 서열을 함유하는 합성펩티드; 오스테오넥틴 및 SPARC (분비된 단백질 산성 및 시스테인 풍부); 오스테오폰틴; 콜라겐, 제I형 및 제II형; 본 빌레브란트 인자 (세포의 구조에의 부착을 용이하게 하는 당단백질. 이는 세포에 연결시키는 능력을 가지며, 따라서 골모세포의 세포 표면 수용체에 대한 리간드일 잠재성을 갖는다); 골 시알로프로테인; 트롬보스폰딘; 오스테오칼신; 시토모들린; 골 형태형성 단백질 (BMP); 테나신; 섬유소용해 억제 인자; 성장 인자, 예를 들어, 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF) 등; 세포 표면 성분에 대한 항체, 예를 들어 β -1; 인테그린 항체; 플라스미노겐 활성화제 억제제 (PAI); 프로테아제 억제제; 및 메탈로프로테아제 억제제 (상기 기재에서, 통상적인 표시는 하기와 같다: R=Arg, G=Gly, D=Asp, S=Ser, C=Cys, V=Val, E=Glu, A=Ala, P=Pro, K=Lys, T=Thr, Y=Tyr, Q=Gln, H=His, L=Leu, I=Ile 및 F=Phe). 오스테오프로테게린, 인터루킨, MMP 억제제, 베타 글루칸, 인테그린 길항제, 칼시토닌, 양성자 펩트 억제제, 프로테아제 억제제, 비스포스포네이트, 인슐린-유사 성장 인자-1, 혈소판-유래된 성장 인자, 표피 성장 인자, 전환 성장 인자-알파의 억제제, 전환 성장 인자-베타, 골 형태형성 단백질, 부갑상선 호르몬, 오스테오프로테게린, 섬유모세포 성장 인자, 비타민 D, 칼슘, 플루오르화물, 마그네슘, 또는 붕소, 비트로넥틴, 플라스미노겐-활성화제 억제제, 또는 프로테아제 억제제, 예를 들어 메탈로프로테아제 억제제가 바람직하다. 치료제는 사이토kin 또는 비스포스포네이트인 것이 보다 바람직하다.

<122>

부가 요법을 위해 본원에서 사용된 "면역억제제"라는 용어는 환자의 면역계를 억제하거나 보호하는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 이러한 작용제는 사이토kin 생성을 억제하거나, 자가-항원 발현을 조절 또는 억제하거나, MHC 항원을 보호하는 물질을 포함할 것이다. 이러한 작용제의 예로는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 (미국 특허 제4,665,077호 참조), 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID); 간시클로비어, 타크롤리무스, 글루코코르티코이드, 예를 들어 코르티솔 또는 알도스테론, 항염증제, 예를 들어 시클로옥시게나제 억제제, 5-리폭시게나제 억제제, 류코트리엔 수용체 길항제; 퓨린 길항제, 예를 들어 아자티오프린 또는 미코페놀레이트 모페틸 (MMF); 알킬화제, 예를 들어 시클로포스파미드; 브로모크립틴; 다나졸; 다포손; 글루타르알데히드 (MHC 항원을 보호함, 미국 특허 제4,120,649호에 기재된 바와 같음); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린 A; 스테로이드, 예를 들어 코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코이드 유사체, 예를 들어 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 예를 들어 솔루-메드롤(SOLU-MEDROL)(등록상표) 메틸프레드니솔론 나트륨 숙시네이트, 및 텍사메타손; 디히드로폴레이트 리덕타제 억제제, 예를 들어 메토트렉세이트 (경구 또는 피하); 항-말라리아제, 예를 들어 클로로퀸 및 히드록시클로로퀸; 술파실라진; 레플루노미드; 사이토kin 또는 사이토kin 수용체 길항제, 예를 들어 항-인터페론-알파, -베타, 또는 -감마 항체; 항종양 괴사 인자 (TNF)- α 항체 (인플릭시마브 (레미카드(REMICADE)(등록상표)) 또는 아달리무마브); 항-TNF-알파 이뮤노어드헤신 (에타네르셉트), 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 길항제; 항-LFA-1 항체, 예를 들어 항-CD11a 및 항-CD18 항체; 항-L3T4 항체; 이종 항-림프구 글로불린; pan-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (WO 90/08187, 1990년 7월 26일자로 공개됨); 스트렙토키나제; 전환 성장 인자-베타 (TGF- β); 스트렙토도르나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 클로람부실; 데옥시스페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (Cohen et al., 미국 특허 제5,114,721호); T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al., Science 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; 및 WO 91/01133); 및 BAFF 길항제, 예를 들어 BAFF 항체 및 BR3 항체 및 zTNF4 길항제 (검토를 위해, 문헌 [Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002)] 참조, 및 하기 정의 참조); T 세포 헬퍼 신호를 방해하는 생물학적 작용제, 예를 들어 항-CD40 수용체 또는 항-CD40 리간드 (CD154), 예를 들어 CD40-CD40 리간드에 대한 차단 항체 (예를 들어, 문헌 [Durie et al., Science, 261:1328-30 (1993)]; [Mohan et al., J. Immunol., 154:1470-80 (1995)]) 및 CTLA4-Ig (문헌 [Finck et al., Science, 265:1225-7 (1994)]); 및 T 세포 수용체 항체 (EP 340,109), 예를 들어 T10B9를 들 수 있다. 본원에서 일부 바람직한 면역억제제로는 시클로포스파미드, 클로람부실, 아자티오프린, 레플루노미드, MMF 또는 메토트렉세이트를 들 수 있다.

<123>

본원에서 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소와 같은 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

<124>

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시클로포스파미드 시톡산(CYTOXAN)(등록상표); 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로슬판 및

피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 엘타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)(등록상표)); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)(등록상표)), CPT-II (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)(등록상표) 포함), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비신, 폐네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 II 및 칼리케아미신 오메가 II (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 디네미신 A를 비롯한 디네미신; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 크로모포어 및 관련된 크로모프로테인 에네디인 항생제 크로모포어), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캑티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닉티노마이신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)(등록상표), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-파롤리노-독소루비신, 독소루비신 HC1 리포좀 주사 (독실(DOXIL)(등록상표)) 및 태옥시독소루비신 포함), 에파루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴 및 조루비신; 항-대서물, 예를 들어 메토트렉세이트, 쟈시타빈 (젬자르(GEMZAR)(등록상표)), 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)(등록상표)), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)(등록상표)), 에포탈론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 펄룩수리딘; 항-아드레날제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 폴린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트伦; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 웬티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 암사미토신; 미토구아존; 미토크산트론; 모피단몰; 니트라에린; 웬토스타틴; 폐나메트; 폐라루비신; 로소크산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진 소재); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빙데신 (엘디신(ELDISINE)(등록상표), 필데신(FILDESIN)(등록상표)); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 폐포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오태파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)(등록상표)), 파클리탁셀의 알부민-유전자조작된 나노입자 제제 (아브라간(ABRAXANE)(상표명)) 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)(등록상표)); 클로란부실; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴, 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)(등록상표)); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토크산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)(등록상표)); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)(등록상표)); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이단드로네이트; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)(상표명))을 사용한 치료 처방에 대한 약어인 FOLFOX와 같은, 2 이상의 상기 것들의 조합을 들 수 있다.

<125> 상기 정의에는 또한, 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬체가 포함되며, 종종 전신 또는 전체-신체 치료의 형태이다. 이는 호르몬 자체일 수 있다. 예로는 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)(등록상표) 타목시펜 포함), 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)(등록상표)), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)(등록상표)); 항-프로게스테론; 에스트

로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 에스트로겐 수용체 길항제, 예를 들어 폴베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)(등록상표)); 난소를 억제하거나 닫는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 작동제, 예를 들어 류크롤리드 아세테이트 (루프론(LUPRON)(등록상표) 및 엘리가르드(ELIGARD)(등록상표)), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 아드레날효소-아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가스(MEGASE)(등록상표)), 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)(등록상표)), 포르메스탄, 파드로졸, 보로졸 (리비소어(RIVISOR)(등록상표)), 레트로졸 (페마라(FEMARA)(등록상표)) 및 아나스트로졸 (아리미렉스(ARIMIDEX)(등록상표))을 들 수 있다. 또한, 화학요법제의 이러한 정의는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)(등록상표) 또는 오스타크(OSTAC)(등록상표)), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)(등록상표)), NE-58095, 콜레드론산 /콜레드로네이트 (조메타(ZOMETA)(등록상표)), 알렌드로네이트 (포사막스FOSAMAX)(등록상표)), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)(등록상표)), 텔루드로네이트 (스텔리드(SKELID)(등록상표)), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)(등록상표)); 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상적 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 테라토프(THERATOPE)(등록상표) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로벡틴(ALLOVECTIN)(등록상표) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)(등록상표) 백신 및 박시드(VAXID)(등록상표) 백신; 토포이소메라제 1 억제제 (루르토테칸(LURTOTECAN)(등록상표)); rmRH (아바렐릭스(ABARELIX)(등록상표)); 라파티니브 디토실레이트 (GW572016으로도 공지된 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소-분자 억제제); 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

<126>

"사이토킨"이라는 용어는 세포내 매개자로서 다른 세포에 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토킨의 예는 림포킨; 모노킨; 인터루킨 (IL), 예를 들어 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, 예를 들어 프로루킨(PROLEUKIN)(등록상표) rIL-2 및 인간 IL-4 및 인간 IL-4의 변이체, 예를 들어, IL-2R 감마에의 결합에 관여하는 IL-4의 영역에 돌연변이를 함유하는 돌연변이체, 예를 들어 Arg 21이 Glu 잔기로 변화된 것; 종양 과사 인자, 예를 들어 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 다른 폴리펩티드 인자 (및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 비롯한 다른 폴리펩티드 인자를 들 수 있다. 본원에서 사용된 사이토킨이라는 용어는 천연 공급원으로부터, 합성적으로 제조된 소-분자 실체 및 그의 제약상 허용되는 유도체 및 염을 비롯한 재조합 세포 배양물 및 천연-서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

<127>

"호르몬"이라는 용어는 관을 갖는 선 기관에 의해 일반적으로 분비되는 폴리펩티드 호르몬을 지칭한다. 호르몬 중에서, 예를 들어 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 에스트라디올; 호르몬-대체 요법; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로페오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄 또는 테스토스테론; 프로렉신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 소포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체형성 호르몬 (LH); 프롤락틴, 태반 랍토겐, 마우스 생식선자극호르몬-관련된 펩티드, 생식선자극호르몬-방출 호르몬; 인히빈; 액티빈; 월리리안-억제 물질; 및 트롬보포이에틴이 포함된다. 본원에서 사용된 호르몬이라는 용어는 천연 공급원으로부터, 또는 합성적으로 제조된 소-분자 실체 및 그의 제약상 허용되는 유도체 및 염을 비롯한 재조합 세포 배양물 및 천연-서열 호르몬의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

<128>

"성장 인자"라는 용어는 성장을 촉진하는 단백질을 지칭하며, 예를 들어 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 혈관 내피 성장 인자; 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- β ; 혈소판-유래된 성장 인자; 전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 글유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- α , - β , 및 - γ ; 및 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF)를 들 수 있다. 본원에서 사용된 성장 인자라는 용어는 천연 공급원으로부터, 또는 합성적으로 제조된 소-분자 실체 및 그의 제약상 허용되는 유도체 및 염을 비롯한 재조합 세포 배양물 및 천연-서열 성장 인자의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

<129>

"인테그린"이라는 용어는 세포가 세포외 매트릭스에 결합하고 그에 반응하도록 하는 수용체 단백질을 지칭하며, 상처 치유, 세포 분화, 종양 세포의 귀환 및 아폽토시스와 같은 다양한 세포 기능에 관여한다. 이는 세포-세포 외 매트릭스 및 세포-세포 상호작용에 관여하는 세포 어드헤신 수용체의 큰 족의 일부이다. 기능성 인테그린은 비-공유 결합된 알파 및 베타로 지칭되는 2가지 막판통 당단백질 서브유닛으로 이루어진다. 알파 서브유닛은 모두 서로 약간의 상동성을 공유하며, 베타 서브유닛도 그러하다. 예로는 알파6베타1, 알파3베타1, 알파7베타

1, LFA-1 등을 들 수 있다. 본원에서 사용된 "인테그린"이라는 용어는 천연 공급원으로부터, 또는 합성적으로 제조된 소-분자 실체 및 그의 제약상 허용되는 유도체 및 염을 비롯한 재조합 세포 배양물 및 천연-서열 성장 인테그린의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

<130> 본원의 목적상, "종양 괴사 인자 알파 (TNF- α)"는 문헌 [Pennica et al., Nature, 312:721 (1984)] 또는 [Aggarwal et al., JBC, 260:2345 (1985)]에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 인간 TNF- α 분자를 지칭한다. 본원에서 "TNF- α 억제제"는 일반적으로 TNF- α에의 결합 및 그의 활성의 중화를 통해 TNF- α의 생물학적 기능을 일부 정도로 억제하는 작용제이다. 본원에서 구체적으로 고려되는 TNF 억제제의 예는 에타네르 셉트(엔브렐(ENBREL)(등록상표)), 인플리시마브(레미카드(REMICADE)(등록상표)) 및 아달리무마브 (후미라(HUMIRA)(등록상표))이다.

<131> "질환-조절 항류마트스 약물" 또는 "DMARD"의 예로는 히드록시클로로퀸, 술파살라진, 메토트렉세이트, 레플루노 미드, 에타네르 셉트, 인플리시마브 (플러스 경구 및 피하 메토트렉세이트), 아자티오프린, D-페니실라민, 금 염 (경구), 금 염 (근육내), 미노사이클린, 시클로스포린 A 및 국소 시클로스포린을 비롯한 시클로스포린, 스타필로코쿠스 단백질 A (문헌 [Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39 (2003)]), 및 그의 염 및 유도체 등을 들 수 있다.

<132> "비-스테로이드성 항염증 약물" 또는 "NSAID"의 예로는 아스피린, 아세틸살리실산, 이부프로펜, 나프록센, 인도메타신, 술린다크, 툴메틴, COX-2 억제제, 예를 들어 셀레콕시브 (셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)); 4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일) 벤젠술폰아미드 및 발데콕시브 (벡스트라(BEXTRA)(등록상표)), 및 멜록시캄 (모비크(MOBIC)(등록상표)), 및 그의 염 및 유도체 등을 들 수 있다. 바람직하게는, 이는 아스피린, 나프록센, 이부프로펜, 인도메타신 또는 툴메틴이다.

<133> 본원에서 "인테그린 길항제 또는 항체"의 예로는 LFA-1 항체, 예를 들어 에팔리주마브(рап티바(RAPTIVA)(등록상표)) (제넨테크(Genentech)에서 시판됨), 또는 알파 인테그린 항체, 예를 들어 나탈리주마브(티사브리(TYSABRI)(등록상표)) (바이오젠 아이디(Biogen Idee)에서 시판됨), 또는 디아자시클릭 폐닐알라닌 유도체 (WO 2003/89410), 폐닐알라닌 유도체 (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 및 WO 2003/53926), 폐닐프로 피온산 유도체 (WO 2003/10135), 엔아민 유도체 (WO 2001/79173), 프로피온산 유도체 (WO 2000/37444), 알칸산 유도체 (WO 2000/32575), 치환된 폐닐 유도체 (미국 특허 제6,677,339호 및 제6,348,463호), 방향족 아민 유도체 (미국 특허 제6,369,229호), ADAM 디스인테그린 도메인 폴리펩티드 (US 2002/0042368), 알파v베타3 인테그린에 대한 항체 (EP 633945), 아자-브릿지된 비시클릭 아미노산 유도체 (WO 2002/02556) 등을 들 수 있다.

<134> "코르티코스테로이드"는 천연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 증강시키는 스테로이드의 일반적 화학적 구조를 갖는 몇몇 합성 또는 천연 발생 물질 중 임의의 것을 지칭한다. 합성 코르티코스테로이드의 예로는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론, 예를 들어 솔루-메드롤(SOLU-MEDROL)(등록상표) 메틸프레드니솔론 나트륨 숙시네이트 포함), 텍사메타손 또는 텍사메타손 트리암시놀론, 히드로코르티손 및 베타메타손을 들 수 있다. 본원에서 바람직한 코르티코스테로이드는 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 히드로코르티손 또는 텍사메타손이다.

<135> 본원에서 사용될 경우 "BAFF," "BAFF 폴리펩티드," "TALL-1" 또는 "TALL-1 폴리펩티드" 및 "BLyS"는 "천연-서열 BAFF 폴리펩티드" 및 "BAFF 변이체"를 지칭한다. "BAFF"는 하기 나타난 아미노산 서열 중 임의의 것을 갖는 폴리펩티드로 주어진 명칭이다.

<136> 인간 BAFF 서열 (서열 16):

```

1 MDDSTEREQSRLTSCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGLLAATLLLALLSCC
61 LTVVSFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEPPAP
121 GEGNNSQNSRNKRKAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSALEE
181 KENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHЛИQRKKVHVGDELSVTLFRCIQNMPETL
241 PNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL

```

<137>

<138>

마우스 BAFF 서열 (서열 17):

```

1 MDESAKTLPPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLLALLSS
61 SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSRYGSATPAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSL
121 GHRNRRAFQGPEETEVDLAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADS DTP
181 TIRKGTYTFVPWLLSFKRGNALEEKENKIVVRQTYFFIYSQVLYTDPIFAMGHVIQRKK
241 VHVFGDELSLVTLFRCIQNMPKTLPPNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIIPRENAQISRNQDD
301 TFFGALKLL

```

<139>

<140> 및 천연 BAFF의 생물학적 활성을 갖는 그의 상동체 및 단편 및 변이체. BAFF의 생물학적 활성은 B 세포 생존의 촉진, B 세포 성숙 및 BR3에의 결합의 촉진으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. BAFF의 변이체는 BAFF 폴리펩티드의 천연 서열과 바람직하게는 80% 이상, 또는 100% 이하의 임의의 연속적인 정수, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다.

<141>

"천연-서열" BAFF 폴리펩티드는 천연으로부터 유래된 상응하는 BAFF 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, BAFF는 푸린-유형 프로테아제에 의한 세포 표면으로부터의 절단 후 가용성 형태로 존재한다. 이러한 천연-서열 BAFF 폴리펩티드는 재조합 및/또는 합성적 수단에 의해 제조될 수 있다.

<142>

"천연-서열 BAFF 폴리펩티드" 또는 "천연 BAFF"라는 용어는 구체적으로 천연 발생 말단절단된 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태), 및 폴리펩티드의 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. "BAFF"라는 용어는 문헌 [Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999)]; 젠뱅크(GenBank) 수탁 번호 AF 136293; 1998년 5월 7일자로 공개된 WO 1998/18921; 1998년 10월 7일자로 공개된 EP 869,180; 1998년 6월 25일자로 공개된 WO 1998/27114; 1999년 3월 18일자로 공개된 WO 1999/12964; 1999년 7월 8일자로 공개된 WO 1999/33980; 문헌 [Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)]; [Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999)] 및 [Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)]에 기재된 폴리펩티드를 포함한다.

<143>

본원에서 사용된 "BAFF 길항제"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, (1) 천연-서열 BAFF 폴리펩티드에 결합하거나, BAFF 폴리펩티드와의 BR3 상호작용을 부분적으로 또는 완전히 차단하도록 BR3의 천연-서열에 결합하고, (2) 천연-서열 BAFF 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. 바람직한 일 실시양태에서 차단되는 BAFF 수용체는 BR3 수용체이다. 천연 BAFF 활성은 다른 것들 중에서도 B-세포 생존 및/또는 B-세포 성숙을 촉진한다. 일 실시양태에서, BAFF 활성의 억제, 차단 또는 중화는 B 세포의 수의 감소를 초래한다. 본 발명에 따른 BAFF 길항제는 시험관내 및/또는 생체내에서 BAFF 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시킬 것이다. 일 실시양태에서, 생물학적 활성 BAFF는 시험관내 및/또는 생체내에서 하기 사건 중 임의의 하나 또는 조합을 강화시킨다: B 세포의 증가된 생존, IgG 및/또는 IgM의 증가된 수준, 형질 세포의 증가된 수, 및 골수 B 세포에서 NF-κ b2/100의 p52 NF-κ b로의 프로세싱 (예를 들어, 문헌 [Batten et al., J. Exp. Med. 192:1453-1465 (2000)]; [Moore et al., Science 285:260-263 (1999)]; [Kayagaki et al., Immunity 17:515-524 (2002)]).

<144>

상기 언급된 바와 같이, BAFF 길항제는 시험관내 또는 생체내에서 BAFF 신호화를 직접적 또는 간접적 방식으로 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 억제하거나, 중화시킨다. 예를 들어, 항체가 BAFF의 BR3에의 결합을 입체 장해하도록, 인간 BAFF의 잔기 162 내지 275, 및/또는 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 및 265로 이루어진 군으로부터 선택된 잔기의 이웃 잔기를 포함하는 영역 내에서 결합하는 BAFF 항체가 고려되며, 여기서 이러한 잔기 수는 서열 16을 지칭한다. 또 다른 예에서, 직접적 결합제는 BAFF 수용체의 세포외 도메인, 또는 천연 BAFF에 결합하는 그의 변이체와 같은 BAFF에 결합하는 BAFF 수용체의 임의의 부분을 포함하는 폴리펩티드이다. 또 다른 예에서, BAFF 길항제는 식 I의 서열을 포함하는 폴리펩티드의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

<145>

X₁-C-X₃-D-X₅-L-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-C-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇

(식 I) (서열 18)

<147> 상기 식에서, X₁, X₃, X₅, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₄, X₁₅ 및 X₁₇은 시스테인을 제외한 임의의 아미노산이고;

<148> X₁₆은 L, F, I 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고;

- <149> 폴리펩티드는 7개의 아미노산 잔기 식 I의 대부분의 N-말단 시스테인에 대한 N-말단 및 대부분의 C-말단 시스테인에 대한 C-말단 내에 시스테인을 포함하지 않는다.
- <150> 일 실시양태에서, 식 I의 서열을 포함하는 폴리펩티드는 디슬피드 결합에 의해 결합된 2개의 Cs를 가지며, X₅LX₇X₈은 L 및 X₇ 사이의 턴의 중심을 갖는 제I형 베타 턴 구조의 형태를 형성하고; X₈의 2면각 파이에 대한 양의 값을 갖는다. 일 실시양태에서, X₁₀은 W, F, V, L, I, Y, M 및 비-극성 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₁₀은 W이다. 또다른 실시양태에서, X₃은 M, V, L, I, Y, F, W 및 비-극성 아미노산으로 이루어진 군으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 또다른 실시양태에서, X₅는 V, L, P, S, I, A 및 R로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₇은 V, T, I 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₈은 R, K, G, N, H 및 D-아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₉는 H, K, A, R 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₁₁은 I 또는 V이다. 또 다른 실시양태에서, X₁₂는 P, A, D, E 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, X₁₆은 L이다. 구체적인 일 실시양태에서, 식 I의 서열은 ECFDLLVRAWVPCSVLK (서열 19), ECFDLLVRHWVPCGLLR (서열 20), ECFDLLVRRWVPCEMLG (서열 21), ECFDLLVRSWVPCHMLR (서열 22), ECFDLLVRHWVACGLLR (서열 23) 및 QCFDRLNAWVPCSVLK (서열 24)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이다. 바람직한 실시양태에서, BAFF 길항제는 서열 19, 20, 21, 22 및 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- <151> 또다른 예에서, BAFF 길항제는 식 II의 서열을 포함하는 폴리펩티드의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- <152> X₁-C-X₃-D-X₅-L-V-X₈-X₉-W-V-P-C-X₁₄-X₁₅-L-X₁₇
- <153> (식 II) (서열 25)
- <154> 상기 식에서,
- <155> X₁, X₃, X₅, X₈, X₉, X₁₄, X₁₅ 및 X₁₇은 시스테인을 제외한 임의의 아미노산이고;
- <156> 폴리펩티드는 7개의 아미노산 잔기 식 I의 대부분의 N-말단 시스테인에 대한 N-말단 및 대부분의 C-말단 시스테인에 대한 C-말단 내에 시스테인을 포함하지 않는다.
- <157> 일 실시양태에서, 식 II의 서열을 포함하는 폴리펩티드는 디슬피드 결합에 의해 결합된 2개의 Cs를 가지며, X₅LX₇X₈은 L 및 X₇ 사이의 턴의 중심을 갖는 제I형 베타 턴 구조의 형태를 형성하고; X₈의 2면각 파이에 대한 양의 값을 갖는다. 식 II의 또다른 실시양태에서, X₃은 M, A, V, L, I, Y, F, W 및 비-극성 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 식 II의 또다른 실시양태에서, X₅는 V, L, P, S, I, A 및 R로 이루어진 군으로부터 선택된다. 식 II의 또다른 실시양태에서, X₈은 R, K, G, N, H 및 D-아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 식 II의 또다른 실시양태에서, X₉는 H, K, A, R 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <158> 추가의 실시양태에서, 세포외 도메인으로부터의 BAFF 수용체 또는 그의 BAFF-결합 단편 또는 BAFF-결합 변이체는 TACI, BR3 또는 BCMA으로부터 유래된다. 대안적으로, BAFF 길항제는 시험관내 및/또는 생체내에서 BAFF 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 간접적 길항제는 인간 BR3의 BAFF에의 결합이 입체 장해되도록, 하기 정의된 바와 같은 인간 BR3의 잔기 23 내지 38 (서열 26) 또는 상기 잔기의 이웃 영역을 포함하는 BR3의 영역에 결합하는 항-BR3 항체이다.
- <159> 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 BAFF 길항제는 BAFF 수용체의 세포외 도메인, 또는 천연 BAFF에 결합하는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 BAFF 항체 및 이뮤노어드헤신을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 세포외 도메인 또는 그의 BAFF-결합 단편 또는 BAFF-결합 변이체가 유래되는 BAFF 수용체는 TACI, BR3 또는 BCMA이다. 또다른 실시양태에서, 이뮤노어드헤신은 서열 19, 20, 21, 22, 23, 및 24로 이루어진 군 중 임의의 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 비롯한, 식 I 또는 식 II의 아미노산 서열을 포함한다.
- <160> 일 실시양태에 따르면, BAFF 길항제는 100 nM 이하의 결합 친화도로 BAFF 폴리펩티드 또는 BR3 폴리펩티드에 결합한다. 또다른 실시양태에 따르면, BAFF 길항제는 10 nM 이하의 결합 친화도로 BAFF 폴리펩티드 또는 BR3 폴리펩티드에 결합한다. 또다른 실시양태에 따르면, BAFF 길항제는 1 nM 이하의 결합 친화도로 BAFF 폴리펩티드

또는 BR3 폴리펩티드에 결합한다.

<161> 본원에서 사용될 경우 "BR3", "BR3 폴리펩티드" 또는 "BR3 수용체"라는 용어는 "천연-서열 BR3 폴리펩티드" 및 "BR3 변이체" (본원에서 추가로 정의됨)를 포함한다. "BR3"은 천연 하기 아미노산 서열 및 그의 상동체, 및 BAFF에 결합하는 그의 변이체 또는 단편을 포함하는 폴리펩티드에 대해 주어진 명칭이다.

<162> 인간 BR3 서열 (서열 26):

```

1 MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRLRPRPKPAGASSPAPRTALQPO
61 ESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVGLVSWRRRQRRRLRGASSAEAPDGD
121 KDAPEPLDKVIIILSPGISDATAAPAWPPPGEDEPGTTPPGHHSVVPVATELGSTELVTTKTAG
181 PEQQ

```

<163> 본 발명의 BR3 폴리펩티드는 인간 조직 유형 또는 다른 공급원으로부터와 같은 다양한 공급원으로부터 단리되거나, 재조합 및/또는 합성적 방법에 의해 제조될 수 있다. BR3라는 용어는 WO 2002/24909 및 WO 2003/14294에 기재된 BR3 폴리펩티드를 포함한다.

<165> "천연-서열" BR3 폴리펩티드 또는 "천연 BR3"는 천연으로부터 유래된 상응하는 BR3 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연-서열 BR3 폴리펩티드는 천연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 및/또는 합성적 수단에 의해 제조될 수 있다. "천연-서열 BR3 폴리펩티드"라는 용어는 구체적으로 폴리펩티드의 천연 발생 말단절단된, 가용성 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드는 인간 BR3의 아미노산 잔기 1 내지 184의 연속적 서열 (서열 26)을 포함하거나 이로 이루어진 BR3 폴리펩티드를 포함한다.

<166> BR3 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막관통 및 세포질 도메인이 없는 BR3 폴리펩티드의 형태를 지칭한다. BR3의 ECD 형태는 인간 BR3의 아미노산 1 내지 77, 2 내지 62, 2 내지 71, 1 내지 61, 7 내지 71, 23 내지 38 및 2 내지 63으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명은 인간 BR3의 상기-언급된 ECD 형태, 및 천연 BAFF에 결합하는 그의 변이체 및 단편 중 임의의 하나를 포함하는 폴리펩티드인 BAFF 길항제를 고려한다.

<167> 미니-BR3은 BR3의 BAFF-결합 도메인의 26-잔기 코어 영역, 즉 아미노산 서열: TPCVPAECFD LLVRHCVACG LLRTPR (서열 27)이다.

<168> "BR3 변이체"는 천연-서열, 전장 BR3 또는 BR3 ECD의 아미노산 서열과 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 BR3 폴리펩티드를 의미하며, 천연-서열 BAFF 폴리펩티드에 결합한다. 임의로, BR3 변이체는 단일 시스테인-풍부 도메인을 포함한다. 이러한 BR3 변이체 폴리펩티드는 예를 들어 전장 아미노산 서열의 N- 및/또는 C-말단에서, 뿐만 아니라 하나 이상의 내부 도메인 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 첨가되거나 결실된 BR3 폴리펩티드를 포함한다. 천연 서열 BAFF 폴리펩티드에 결합하는 BR3 ECD의 단편이 또한 고려된다. 일 실시양태에 따르면, BR3 변이체 폴리펩티드는 인간 BR3 폴리펩티드 또는 그의 특정한 단편 (예를 들어, ECD)과 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 81% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 82% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 83% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 84% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 85% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 86% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 87% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 88% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 89% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 90% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 91% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 92% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 93% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 94% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 95% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 96% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 97% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 98% 이상의 아미노산 서열 동일성, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. BR3 변이체 폴리펩티드는 천연 BR3 폴리펩티드 서열을 포함하지 않는다. 또 다른 실시양태에 따르면, BR3 변이체 폴리펩티드는 약 10 아미노산 이상의 길이, 약 20 아미노산 이상의 길이, 약 30 아미노산 이상의 길이, 약 40 아미노산 이상의 길이, 약 50 아미노산 이상의 길이, 약 60 아미노산 이상의 길이, 또는 약 70 아미노산 이상의 길이이다.

<169> 바람직한 일 실시양태에서, 본원의 BAFF 길항제는 BAFF에 결합하는 BR3, TACI 또는 BCMA의 부분, 또는 BAFF에 결합하는 그의 변이체를 포함하는 이뮤노어드헤신이다. 다른 실시양태에서, BAFF 길항제는 BAFF 항체이다. "BAFF 항체"는 BAFF에 결합하는 항체, 바람직하게는 "BAFF" 정의하에서 본원에 개시된 인간 BR3 서열의 잔기 23

내지 38 (서열 26)을 포함하는 인간 BR3의 영역 내에서 BR3에 결합하는 것이다. 일반적으로, 본원에서 지칭된 인간 BAFF 및 인간 BR3의 아미노산 부분은 인간 BAFF 및 인간 BR3 하의 서열 넘버링에 따르면 "BAFF" 및 "BR3" 정의하에서 본원에 개시된, 각각 서열 16 및 26이다.

<170> BAFF-결합 폴리펩티드 또는 BAFF 항체의 다른 예는 예를 들어, WO 2002/092620, WO 2003/014294, 문헌 [Gordon et al., Biochemistry 42(20):5977-5983 (2003)], [Kelley et al., J. Biol. Chem., 279(16):6727-16735 (2004)], WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 및 WO 2000/40716에서 발견될 수 있다.

<171> "리포좀"은 포유동물에 약물 (예를 들어, 본원에 개시된 길항제)의 전달에 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 이루어진 소포이다. 리포좀의 성분은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열된다.

<172> 본원에서 사용된 "골 장애"라는 용어는 골 소실을 특징으로 하는 질환, 즉 골 질량 또는 밀도의 감소의 증상 또는 병리학을 갖는 질환, 상태, 장애 또는 증후군을 지칭한다. 골 소실을 특징으로 하는 질환의 예로는 골용해, 예를 들어 골 전이, 무균 인공 이완, 치주염, 골다공증, 파제트병, 전이성 골 질환, 및 류마티스성 관절염을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 골 장애는 루푸스 및 류마티스성 관절염과 같은 자가면역 질환과 관련된 것을 포함한다. SLE를 갖는 여성은 이전의 코르티코스테로이드 사용 상태와 관계없이 상승된 SLE 질환 손상이 없는 여성보다 유의하게 낮은 골 미네랄 밀도 T-스코어를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 골 장애는 또한 골 질량의 수준이 세계 보건 기구의 ["Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843"]에 의한 표준에서 정의된 바와 같은 연령 특이적 정상 미만인 상태를 비롯한, 낮은 골 질량과 관련된 상태를 포함한다. 낮은 골 질량과 관련된 상태(들)에는 원발성 및 속발성 골다공증이 포함된다. 또한, 치주 질환, 치조골 소실, 절골술후 및 소아기 특발성 골 소실, 뿐만 아니라 척추 만곡, 키 감소, 및 인공 수술과 같은 골다공증의 장기 합병증이 포함된다. 이러한 골 장애는 골다공증을 비롯한 상기 기재된 바와 같은 질환이 발병할 평균 기회보다 유의하게 높은 것으로 공지된 척추동물, 예를 들어 포유동물과 같은, 낮은 골 질량을 갖는 것 (예를 들어, 폐경기후 여성, 50세 초과의 남성)에 영향을 줄 수 있다. 장애는 골 회복을 비롯한 골-질량-증강 또는 -증진 방법, 골절 치유 속도의 증가, 골 이식 수술의 전체적인 대체, 성공적인 골 이식의 속도의 증진, 안면 재건 또는 상악 재건 또는 하악 재건 후 골 치유, 인공 내성장, 척추 골유합 또는 장골 확장으로 치료될 수 있다. 당업자는 골 질량이라는 용어가 사실상 때때로 (엄격하게 정확한 것은 아니지만) 골 미네랄 밀도로 지칭되는 단위 면적당 골 질량을 지칭함을 인지할 것이다.

<173> 본원에서 골 장애의 예로는 골다공증, 예를 들어 원발성 또는 속발성 골다공증, 및 글루코코르티코이드-유도된 골다공증, 국소 골 침식 또는 류마티스성 관절염으로부터의 것과 같은 질환, 및 변연 관절 침식 및 연골하 골 침식 (골수), 파제트병, 골 결손, 비정상적으로 증가된 골 전복, 치주 질환, 치아 소실, 인공주위 골용해, 불완전 골형성증, 전이성 골 질환, 악성 고칼슘혈증, 소아기 특발성 골 소실, 치조골 소실, 골절, 골감소증, 예를 들어 관절-근부 골감소증, 다발성 골수종에서의 골 질환 및 관련된 질환, 예를 들어 발데스트롬 마크로글로불린 혈증 및/또는 모노클로날 감마글로불린병증을 들 수 있다. 본원에서 바람직한 골 장애는 다발성 골수종에서의 골 질환, 마크로글로불린혈증 및 모노클로날 감마글로불린병증 및 골다공증, 보다 바람직하게는 속발성 골다공증, 보다 바람직하게는 염증 동안의 골 소실이다. 악성종양과 관련된 골 장애는 또한 본 발명의 범위 내에 있다.

<174> "속발성 골다공증"은 척추동물, 예를 들어 포유동물 (인간 포함)에서의 염증 동안의 골 소실, 글루코코르티코이드-유도된 골다공증, 갑상선기능항진증-유도된 골다공증, 고정-유도된 골다공증, 혜파린-유도된 골다공증 및 면역억제제-유도된 골다공증을 포함한다. 본원에서 사용된 "골 흡수"라는 용어는 파골세포 활성에 의해 적어도 부분적으로 유발된 바람직하지 않은 골의 소실을 지칭한다.

<175> "골 용해"는 과국적 골 소실, 또는 류마티스성 관절염, 골 전이, 무균 인공 이완 및 치주염을 비롯한 질환 상태의 스펙트럼의 쇠약화된 병리학적 결과를 지칭한다. 류마티스성 관절염 (RA)은 대개 장기 불능 및 증가된 사망률을 초래하는 만성 염증성 질환이다.

<176> "골전구체"는 골 기질 세포로부터 유래된 분화된 골 전구세포를 지칭한다.

<177> "치아전구체"는 치주 인대로부터 유래된 분화된 골 전구세포를 지칭한다.

<178> 본원에서 사용된 "억제하다"라는 용어는 특정 활성의 양, 질 또는 효과를 감소시키는 것을 의미하며, "감소시키다", "최소화하다" 및 "경감시키다"라는 용어와 호환적으로 사용되고, 예를 들어 치료 유효량의 본 발명의 화합

물의 포유동물에의 투여에 의해 유발된 파골세포 골 침식 활성의 감소를 지칭한다. 본원에서 정의된 바와 같은 골 장애의 치료는 골 흡수, 파골세포형성 또는 파골세포 기능의 억제 및 골 소실을 특징으로 하는 질환의 치료를 포함한다.

<179> 본원에서 사용된 "유효량"이라는 용어는 골 장애의 치료에 유효한 유효량의 항체 또는 길항체를 지칭하는 것을 의미한다. 따라서, 일 측면에서, 골 소실과 관련된 상태의 치료 또는 골 성장의 촉진이 유익한 상태에 사용하기 위한 조성물의 "유효량"은 골 소실을 억제시키고/거나 골 형성을 증가시키거나 파골세포 활성의 억제하는데 충분한 양이다. 보다 구체적인 또는 대안적인 측면에서, 유효량의 화합물은 치료 유효량의 화합물이 골 소실을 특징으로 하는 질환에 걸리기 쉽거나 이를 앓고 있는 개체에게 투여될 경우 개체에서의 골 소실의 속도의 감소로서 관찰되는 의학적 효과를 생성한다. 유효량은 전형적으로 활성 성분을 포함하지 않는 조성물 (즉, 대조군)이 유사한 상황의 개체에게 투여될 경우 관찰되는 효과에 비해 이들이 갖는 효과에 의해 측정된다. 또한, 조성물의 "유효량"은 통계적으로 유의한 효과, 예를 들어 골절 복구의 속도의 통계적으로 유의한 증가, 끌다공증에서 골 소실의 반전, 관절 손상의 치유의 속도의 증가, 연골 결손의 반전의 증가, 인공 장치 내로의 골 성장의 증가 또는 가속화, 치아 결손의 개선된 복구 등을 생성하는 양이다.

<180> "패키지 삽입물"은 지시, 용법, 투여량, 투여, 금기, 패키지화된 제품과 조합되는 다른 치료 생성물, 및/또는 이러한 치료 생성물의 용도에 관한 경고 등을 함유하는 치료 생성물의 상업적 패키지에 통상적을 포함되는 지시서를 지칭한다.

<181> "의약"은 골 장애 또는 그의 증상 또는 부작용을 치료하는 활성 약물이다.

II. 요법

<183> 일 측면에서, 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항체, 바람직하게는 항체 (보다 바람직하게는, CD20 항체)를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골 장애의 치료 방법을 제공한다.

<184> 정확한 투여량은 치료될 상태의 성질 및 중증도, 길항체의 종류, 포유동물/환자 특징 등을 고려하여 허용되는 표준에 따라 임상의에 의해 결정될 것이다. 투여량의 결정은 당업자의 수준 내에 있다. 투여 경로 및 방법에 따라, 단백질은 연장된 주입으로서 단일 투여량으로, 또는 연장된 기간에 걸쳐 간헐적으로 투여될 수 있다. 정맥내 투여량은 1 내지 수 시간의 전형적인 기간에 걸쳐 블루스 주사 또는 주입에 의해서일 것이다. 서방형 제제가 사용될 수 있다. 일반적으로, CD20 길항체의 치료 유효량은 골절 복구에 필요한 시간의 임상적으로 유의한 감소, 공극 또는 다른 결손의 부피의 유의한 감소, 골 밀도의 유의한 증가, 이환률의 유의한 감소, 또는 유의하게 증가된 조직학적 스코어와 같은, 치료되는 상태의 임상적으로 유의한 변화를 생성하는데 충분한 양이다.

<185> 바람직한 실시양태에서, 투여량은 약 1개월의 기간 내에 약 1 내지 4회 투여량의 빈도로, 약 400 mg 내지 1.3 g, 보다 바람직하게는 약 500 mg 내지 1.2 g, 보다 더 바람직하게는 약 750 mg 내지 1.1 g이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 약 2 내지 4회 투여량으로, 보다 바람직하게는 약 2 내지 3회 투여량으로, 가장 바람직하게는 약 2회 투여량으로 투여된다. 보다 더 바람직한 실시양태에서, 항체는 약 2 내지 3주의 기간 내에, 보다 바람직하게는 약 2주 내에 투여된다.

<186> 사용되는 투여량의 특정 수 (1, 2 또는 3회, 또는 그 이상)는 예를 들어 치료될 골 장애의 종류, 사용될 항체의 종류 (상기 설명된 바와 같은 어떤 종류의 제2 의약이, 얼마나 많이 사용되든지), 및 투여 방법 및 빈도에 의존한다. 1회 초과의 투여량이 투여될 경우, 나중의 투여량 (예를 들어, 제2 또는 제3 투여량)은 이전의 투여량이 투여된 시간으로부터 바람직하게는 약 1 내지 20일부터, 보다 바람직하게는 약 6 내지 16일부터, 가장 바람직하게는 약 14 내지 16일부터 투여된다. 개별 투여량은 바람직하게는 약 1일 내지 4주, 보다 바람직하게는 약 1일 내지 20일의 전체 기간 내에 (예를 들어, 6 내지 18일의 기간 내에) 투여된다. 이러한 일 측면에서, 개별 투여량은 대략 매주 투여되며, 제2 투여량은 제1 투여량으로부터 약 1주에 투여되고, 임의의 제3 또는 후속 투여량은 제2 투여량으로부터 약 1주에 투여된다. 항체의 각각의 개별 투여량은 바람직하게는 약 0.5 내지 1.5 g, 보다 바람직하게는 약 0.75 내지 1.3 g이다.

<187> 국소 적용을 위해, 예를 들어 골절 또는 다른 골 결손에서 골의 재생을 위해, 단백질은 상처 면적의 약 0.1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 범위로 적용될 수 있다.

<188> 그러나, 상기 설명된 바와 같이, 길항체의 상기 제안된 양은 많은 치료 결정에 적용된다. 적절한 투여량 및 스케줄링을 선택하는데 있어서 중요한 인자는 상기 지시된 바와 같은 얻어지는 결과이다. 예를 들어, 상대적으로 더 많은 투여량은 진행성 및 급성 질환의 치료에 초기에 필요할 수 있다. 후속 투여량은 초기 투여량보다 높을 수 있다. 가장 효율적인 결과를 얻기 위해, 질환 또는 장애에 따라, 길항체는 가능한 한 질환 또는 장애의 최

초 정후, 진단, 출현 또는 발생에 가깝게 투여되거나, 질환 또는 장애의 완화 동안 투여된다.

<189> 길항제는 비경구, 피하, 복막내, 흡입, 경막내, 관절내 및 비내를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여되며, 국소 면역억제 치료가 바람직할 경우, 병변내 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 길항제는 적합하게는 예를 들어 길항제의 감소하는 투여량으로 펠스 주입에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여량은 주사로 주어지며, 가장 바람직하게는 투여가 부분적으로 간단한지 만성인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사로 주어진다.

<190> 당업자는 예를 들어 저 투여량으로 시작하고 투여량을 적정하여 유효량을 결정함으로써, 포유동물이 맞추어진 포유동물의 나이, 활성의 수준, 호르몬 균형, 일반 건강과 같은 인자를 고려할 것이다. 본원에 기재된 연구에 의해, 베타 글루칸의 증가하는 농도는 파글세포 활성의 억제를 반드시 증가시키지는 않으며, 파글세포 활성의 억제를 사실상 감소시킬 수 있음이 밝혀졌다. 100 pg에서, 효과는 비스포스포네이트로 얻어진 효과와 유사하며, 이는 다양한 형태로 골다공증의 제어를 위한 약물로서 사용된다.

<191> 포유동물은 약 2회 이상의 길항제/항체의 노출과 같은 투여량의 1회 초파의 노출 또는 설정, 예를 들어 약 2 내지 60회의 노출, 보다 특히 약 2 내지 40회의 노출, 가장 특히 약 2 내지 20회의 노출이 주어짐에 의해, 길항제/항체로 재-치료될 수 있다. 이러한 노출은 예를 들어 약 24 내지 28주 또는 48 내지 56주 또는 그 이상과 같은 다양한 간격으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 노출은 각각의 약 24 내지 26주 또는 약 38 내지 42주의 간격으로 투여된다. 일 실시양태에서, 각각의 길항제/항체 노출은 길항제/항체의 단일 투여량으로서 제공된다. 대안적인 실시양태에서, 각각의 길항제/항체 노출은 항체의 별개 투여량으로 제공된다. 그러나, 모든 길항제/항체 노출이 단일 투여량으로서 또는 별개 투여량으로서 제공될 필요는 없다.

<192> 바람직한 길항제는 항체, 예를 들어 세포독성제에 컨쥬케이션되지 않은 리툭산(등록상표)과 같은 항체이다. 본원에서 설명된 방법에서, B-세포 표면 마커 또는 CD20 항체는 네이키드 항체일 수 있거나, 골-표적화제에 공유 결합된 것과 같이 또 다른 문자와 컨쥬케이션될 수 있다. 본원에서 바람직한 CD20 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 CD20 항체, 보다 바람직하게는 리툭시마브, 인간화 2H7 (예를 들어 서열 2 및 8에 가변 도메인 서열을 포함하거나, 서열 8에 변경 N100A 또는 D56A 및 N100을 갖는 가변 중쇄 도메인, 및 서열 2에 변경 M32L, 또는 S92A, 또는 M32L 및 S92A를 갖는 가변 경쇄 도메인을 포함하거나, 서열 30의 경쇄 가변 영역 (V_L) 서열 및 서열 8의 중쇄 가변 영역 (V_H) 서열을 포함하고, 항체는 VH-CDR2에 D56A의 아미노산 치환을 함유하며, VH-CDR3에서 N100은 Y 또는 W로 치환되고, 특히 서열 31의 v511 경쇄 서열 및 서열 32의 v511 중쇄 서열을 포함함), 키메라 또는 인간화 A20 항체 (이뮤노메딕스), 또는 휴맥스-CD20(상표명) 인간 CD20 항체 (젠팩)이다. 리툭시마브 또는 인간화 2H7이 보다 더 바람직하다. 또 다른 측면에서, 바람직한 항체는 상기 정의된 바와 같은 주요 임상 반응을 포함한다.

<193> 본원의 모든 방법의 추가의 실시양태에서, 포유동물은 골 장애를 치료하기 위해, 파글세포-관련된 장애 치료제 또는 면역억제제(들)과 같은 약물(들)로 이전에 치료되지 않았고/거나 B-세포 표면 마커에 대한 길항제 또는 항체로 이전에 치료되지 않았다 (예를 들어, CD20 항체로 이전에 치료되지 않았다). 추가의 측면에서, 포유동물은 투여량의 초기 또는 후기 항체 설정 후를 포함하여, 골 장애가 재발되거나, 임의의 상기 방법에서 치료되기 전 신장 손상과 같은 다른 조직 손상을 앓았을 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 포유동물은 적어도 초기 치료 전에 이러한 재발을 갖지 않았다.

<194> B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제는 인간 및 비-인간 동물 둘다에서 골의 생성을 자극하는 것이 바람직하든지 사용될 수 있다. 수의학 용도는 가축 및 반려 동물을 비롯한 가축에서의 용도를 포함한다. 특정 용도로는 콜절, 예를 들어 비-통합 콜절 및 타협된 치유, 예를 들어 당뇨병, 알코올중독 및 노화를 갖는 환자에서의 골절; 골 이식; 방사선-유도된 골괴사 후 골 치료; 임플란트, 예를 들어 관절 대체 및 치아 임플란트; 수술로부터 발생된 골 결손의 복수, 예를 들어 종양 제거 후 머리-턱얼굴 복구, 외상후 손상 후 외과적 성형, 유전 또는 다른 물리적 비정상의 복구, 및 성형 수술에서의 골 치유의 촉진; 치주 질환의 치료 및 다른 치아 결손의 복구; 골 암의 치료적 처치 후 골 결손의 치료; 신연 골생성 동안 골 형성의 증가; 관절 손상의 치료, 예를 들어 연골 및 인대의 복구; 골관절염을 앓은 관절의 복구; 힘줄 복구 및 재-부착; 골다공증의 치료 (연령-관련된 골다공증, 폐경기후 골다공증, 글루코코르티코이드-유도된 골다공증, 및 불용 골다공증 포함) 및 증가된 골 소실 또는 감소된 골 형성을 특징으로 하는 다른 상태; 월경전 여성에서 최대 골 질량의 상승; 경질막과 관련된 결합 조직의 치유에서의 용도를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<195> 본원의 임의의 방법에서, B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 또는 항체와 함께 유효량의 제2 의약 (B-세포 표

면 마커에 결합하는 길항체 또는 항체 (예를 들어, CD20 항체)가 제1 의약일 경우)을 포유동물에게 투여할 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 척수 융합 케이지, 척수 융합 하드웨어, 내부 및 외부 골 고정 장치, 스크류 및 핀과 같은 정형외과적 장치와 함께 사용될 수 있다. 제2 의약은 하나 이상의 의약일 수 있으며, 예를 들어 파글세포-관련된 장애 치료제, 세포독성제, 면역억제제, 항-통증제, 또는 이들의 임의의 조합을 들 수 있다. 당업자에게 공지된 다른 다양한 요법은 또한 적용될 수 있다. 이러한 제2 의약의 종류는 골 장애의 종류, 골 장애의 중증도, 포유동물의 상태 및 연령, 사용되는 제1 의약의 종류 및 투여량 등을 비롯한 다양한 인자에 의존한다.

<196>

이러한 추가의 의약의 예로는 파글세포-관련된 장애 치료제, 화학요법제, 인터페론 부류 약물, 예를 들어 인테페론-알파 (예를 들어, 아마릴로 바이오사이언시즈, 인크.(Amarillo Biosciences, Inc.) 제품), IFN- β -1a (레비프(REBIF)(등록상표) 및 아보넥스(AVONEX)(등록상표)) 또는 IFN- β -1b (베타스테론(BETASERON)(등록상표)), 올리고펩티드, 예를 들어 글라티라며 아세테이트 (코파손(COPAXONE)(등록상표)), CD40-CD40 리간드 차단제, 세포독성제 또는 면역억제제 (예를 들어, 미톡산트론 (노반트론(NOVANTRONE)(등록상표))), 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 클로람부실, 레플루노미드, 및 아자티오프린), 정맥내 이뮤노글로불린 (감마 글로불린), 림프구-고갈 요법, 예를 들어, 미톡산트론, 시클로포스파미드, 캄파트(CAMPATH)(상표명) 항체, 항-CD4, 클라드리빈, 탈-면역화된 자가반응성 항원 또는 자가반응성 B-세포의 Ig 수용체에 의해 특이적으로 인식되는 그의 단편을 포함하는 2개 이상의 도메인을 갖는 폴리펩티드 구조물 (WO 2003/68822), 전체 신체 방사선, 골수 이식, 인테그린 길항체 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체, 예를 들어 에팔리주마브/랍티바(RAPTIVA)(등록상표), 제넨테크에서 시판됨, 또는 알파 4 인테그린 항체, 예를 들어 나탈리주마브/티사브리(TYSABRI)(등록상표), 바이오젠 아이디시판, 또는 상기 설명된 바와 같은 다른 것들), 스테로이드, 예를 들어 코르티코스테로이드 (예를 들어, 메틸프레드니솔론, 예를 들어 솔루-메드롤(SOLU-MEDROL)(상표명) 주사용 메틸프레드니솔론 나트륨 숙시네이트, 프레드니손, 예를 들어 저-투여량 프레드니손, 텍사메타손, 또는 글루코코르티코이드, 예를 들어, 전신 코르티코스테로이드 요법을 비롯한 관절 주사를 통해), 비-림프구-고갈 면역억제 요법 (예를 들어, MMF 또는 시클로스포린), "스타틴" 부류의 콜레스테롤-저하 약물 (세리바스타틴 (바이콜(BAYCOL)(상표명)), 플루바스타틴 (레스콜(LESCOL)(상표명)), 아토르바스타틴 (리피토르(LIPITOR)(상표명)), 로바스타틴 (메바코르(MEVACOR)(상표명)), 프라바스타틴 (프라바콜(PRAVACHOL)(상표명)), 및 심바스타틴 (조코르(ZOCOR)(상표명))), 에스트라디올, 테스토스테론 (임의로 상승된 투여량으로; 문헌 [Stuve et al. Neurology 8:290-301 (2002)]), 안드로겐, 호르몬-대체 요법, TNF 억제제, 예를 들어 TNF- α 에 대한 항체, DMARD, NSAID, 혈장교환술 또는 혈장 교환, 트리메토프림-술파메톡사졸 (박트림(BACTRIM)(상표명), 셉트라(SEPTRA)(상표명)), 미코페놀레이트 모페틸, H2-차단제 또는 양성자-펌프 억제제 (잠재적으로 케양유발성 면역억제 요법 동안), 레보티록신, 시클로스포린 A (예를 들어, 샌드이뮨(SANDIMMUNE)(등록상표)), 소마타스타틴 유사체, 사이토킨, 항대사물, 면역억제제, 재활 수술, 방사성요오드, 갑상선절제술, BAFF 길항체, 예를 들어 BAFF 또는 BR3 항체 또는 이뮤노어드헤신, 항-CD40 수용체 또는 항-CD40 리간드 (CD154), 항-IL-6 수용체 길항제/항체, 또다른 B-세포 표면 길항제 또는 항체, 예를 들어 인간화 2H7, 또는 리툭시마브와 다른 인간화 또는 인간화 CD20 항체 등을 들 수 있다.

<197>

바람직한 이러한 의약은 파글세포-관련된 장애 치료제, 화학요법제, 세포독성제, 항-인테그린, 감마 글로불린, 항-CD4, 클라드리빈, 트리메토프림 술파메톡사졸, H2-차단제, 양성자-펌프 억제제, 코르티코스테로이드, 시클로스포린, 스타틴 부류의 콜레스테롤-저하 약물, 에스트라디올, 테스토스테론, 안드로겐, 호르몬-대체 약물, TNF 억제제, DMARD, NSAID (예를 들어, 근골격계 증상 치료용), 레보티록신, 시클로스포린 A, 소마타스타틴 유사체, BAFF 길항체, 예를 들어 BAFF 항체 또는 BR3 항체, 특히 BAFF 항체, 면역억제제, 및 또다른 B-세포 표면 마커 항체, 예를 들어 리툭시마브 및 인간화 2H7 또는 다른 인간화 CD20 항체의 조합물이다.

<198>

보다 바람직한 이러한 의약은 파글세포-관련된 장애 치료제, 예를 들어 사이토킨, 면역억제제, 예를 들어 TNF- α 에 대한 항체, CD40-CD40 리간드에 대한 항체, 및 BAFF 길항제, 예를 들어 BAFF 또는 BR3 항체, DMARD, 세포독성제, 인테그린 길항제, NSAID, 호르몬, 또는 이들의 조합이다. 예를 들어 주요 기관 발달을 갖는 매우 활성 질환에 대한 면역억제제가 필요할 수 있으며, 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)(등록상표)), 클로람부실, 레플루노미드, MMF, 아자티오프린 (이뮤란(IMURAN)(등록상표)) 및 메토트렉세이트를 들 수 있다. 효능을 위한 제1 의약과 조합된 BAFF 길항제가 유용할 수 있다.

<199>

파글세포-관련된 장애 치료제, 예를 들어 사이토킨, 예를 들어 IL-4, 면역억제제, 또는 이들의 조합이 보다 더 바람직하고, 가장 바람직하게는 파글세포-관련된 장애 치료제 및/또는 면역억제제, 가장 바람직하게는, 비스포스포네이트 및/또는 메토트렉세이트이다.

<200>

특히 바람직한 일 실시양태에서, 제2 의약은 하나 이상의 파글세포-관련된 장애 치료제이거나 이를 포함할 수

있다.

<201> 보다 특히 바람직한 측면에서, 제2 의약은 면역억제제, 보다 바람직하게는 시클로포스파미드, MMF, 클로람부실, 아자티오프린, 레플루노미드, 또는 메토트렉세이트이며, 바람직하게는 적어도 초기 항체 투여량으로 투여된다. 일 실시양태에서, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 또는 MMF가 완화의 유지를 위해 시클로포스파미드 대신 사용된다.

<202> 추가의 바람직한 측면에서, 제2 의약은 하나 이상의 파골세포-관련된 장애 치료제 및 면역억제제의 조합이다.

<203> 모든 상기 제2 의약은 서로 조합으로, 또는 제1 의약과 함께 그자체로 사용될 수 있으며, 본원에서 사용된 "제2 의약"이라는 표현은 이것이 각각 제1 의약 이외에 의약만을 의미하지 않는다. 따라서, 제2 의약은 하나의 의약 일 필요는 없지만, 하나 초과의 이러한 의약으로 이루어지거나 이를 포함할 수 있다.

<204> 본원에서 설명된 상기 제2 의약은 일반적으로 동일한 투여량으로, 및 상기 사용된 바와 같은 투여량 또는 여기 예-사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 이러한 제2 의약이 꼭 사용될 경우, 이는 제1 의약이 존재하지 않을 경우보다 적은 양으로, 특히 그에 의해 유발되는 부작용을 제거하거나 감소시키도록, 제1 의약의 초기 투여량 초과의 후속 투여량으로 사용된다. 조합된 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 이용한 공동-투여, 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함하며, 바람직하게는 활성제 둘다 (또는 전부)가 동시에 그의 생물학적 활성을 발휘하는 시기가 있다.

<205> 본원에서 제2 의약이 항체의 투여량 세트로 유효량으로 투여되는 재-치료 방법을 위해, 이는 임의의 투여량 세트로, 예를 들어 단지 하나의 투여량 세트로, 또는 하나 초과의 투여량 세트로 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, 제2 의약은 초기 투여량 세트로 투여된다. 또다른 실시양태에서, 제2 의약은 초기 및 제2 투여량 세트로 투여된다. 추가의 실시양태에서, 제2 의약은 모든 투여량 세트로 투여된다.

<206> 제2 의약의 조합된 투여는 별개 제제 또는 단일 제약 제제를 이용한 공동투여 (동시 투여), 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함하며, 바람직하게는 활성제 둘다 (또는 전부)가 동시에 그의 생물학적 활성을 발휘하는 시기가 있다.

<207> 본원에서 항체 또는 길항체는 비경구, 국소, 피하, 복막내, 폐내, 비내 및/또는 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입의 예로는 근육내, 정맥내 (i.v.), 동맥내, 복막내 또는 피하 투여를 들 수 있다. 경막내 투여가 또한 고려된다 (예를 들어, CD20 항체의 경막내 전달에 관한 US 2002/0009444, Grillo-Lopez, A.). 또한, 항체 또는 길항체는 적합하게는 펠스 주입에 의해, 예를 들어 항체 또는 길항체의 감소하는 투여량으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여량은 정맥내 또는 피하로, 보다 바람직하게는 정맥내 주입(들)에 의해 주어진다.

<208> 항체의 다회의 투여량 세트가 제공될 경우, 각각의 투여량 세트는 동일하거나 상이한 투여 수단을 이용하여 제공될 수 있다. 일 실시양태에서, 각각의 투여량 세트는 정맥내 투여에 의한다. 또다른 실시양태에서, 각각의 투여량 세트는 피하 투여에 의해 주어진다. 또다른 실시양태에서, 투여량 세트는 정맥내 및 피하 투여 둘다에 의해 주어지며, 항체는 동일하거나 상이할 수 있다.

<209> 이러한 길항체 및 항체의 제조, 변형 및 제제화 방법의 논의가 이어진다.

III. 길항체 및 항체의 제조

<211> 본 발명의 방법 및 제조품은 B-세포 표면 마커에 결합하는 길항체를 사용하거나 이를 혼입시킨다. 따라서, 이러한 길항체의 생성 방법이 본원에서 기재될 것이다.

<212> 길항체(들)의 생성 또는 길항체(들)에 대한 스크리닝에 사용되는 B-세포 표면 마커는 예를 들어 목적하는 예피 토프를 함유하는 항원 또는 그의 부분의 가용성 형태일 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 그의 세포 표면에서 B-세포 표면 마커를 발현하는 세포는 길항체(들)을 생성하거나 이에 대해 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 길항체의 생성에 유용한 B-세포 표면 마커의 다른 형태는 당업자에게 명백할 것이다. 바람직하게는, B-세포 표면 마커는 CD19 또는 CD20 항원이다.

<213> 바람직한 길항체는 항체이지만, 항체 이외의 길항체가 본원에서 고려된다. 예를 들어, 길항체는 세포독성제 (예를 들어, 본원에 기재된 것)에 임의로 융합되거나, 이와 컨쥬게이션된 소분자 길항체를 포함할 수 있다. 소분자의 라이브러리는 항원에 결합하는 소분자를 확인하기 위해 본원에서 관심의 B 세포 표면 마커에 대해 스크리닝될 수 있다. 소분자는 추가로 그의 길항체성 특성에 대해 스크리닝되고/거나 세포독성제와 컨쥬게이션될

수 있다.

<214> 길항제는 또한 합리적인 설계에 의해 또는 과지 제시에 의해 생성된 웨티드일 수 있다 (예를 들어, 1998년 8월 13일자로 공개된 WO98/35036 참조). 일 실시양태에서, 선택의 분자는 "CDR 모방체" 또는 항체의 CDR을 기반으로 설계된 항체 유사체일 수 있다. 이러한 웨티드는 그 자체가 길항제성일 수 있지만, 웨티드는 웨티드의 길항제성 특성을 부가하거나 증진시키기 위해 임의로 세포독성체와 융합될 수 있다.

<215> 본 발명에 따라 사용되는 항체 길항제의 제조를 위한 예시적인 기술에 대한 기재가 이어진다.

(i) 폴리클로날 항체

<217> 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복막내 (ip) 주사에 의해 동물에서 발생된다. 이는 면역화되어야 할 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 이관능성 또는 유도체화제를 이용한 대두 트립신 억제제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 컨쥬게이션), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)에 관련 항원을 컨쥬게이션하는데 유용할 수 있다.

<218> 동물을 예를 들어 프로인트 완전 아주반트 3 부피를 갖는 단백질 또는 컨쥬게이트 (토끼 또는 마우스에 대해 각각) 100 μg 또는 5 μg 를 배합하고, 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써 항원, 면역원성 컨쥬게이트 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후, 동물을 다중 부위에 피하 주사에 의해 프로인트 완전 아주반트 중 웨티드 또는 컨쥬게이트의 원래 양을 1/5 내지 1/10으로 추가주사한다. 7 내지 14일 후, 동물을 채혈하고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 동물을 역가가 안정수준에 달할 때까지 추가주사한다. 바람직하게는, 동물을 동일한 항원의 컨쥬게이트로 추가주사하지만, 상이한 단백질 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 컨쥬게이션하기도 한다. 컨쥬게이트는 또한 단백질 융합물로서 재조합 세포 배양물로 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제가 면역 반응을 증진시키는데 적합하게 사용된다.

(ii) 모노클로날 항체

<220> 모노클로날 항체는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득되며, 즉 집단에 포함되는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이체를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형어 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다.

<221> 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조될 수 있다.

<222> 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 생물을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구를 시험판내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 림프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합화제를 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

<223> 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 씨딩하고, 바람직하게는 비융합된 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없을 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이들의 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

<224> 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고-수준 생산을 뒷받침하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 미국 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 살크 인스티튜트 세포 분화 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들, 및 미국 메릴랜드주 로크빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)에서 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포와 같은 뮤린 골수종 세포주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 기재되었다 (문헌 [Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984)]; 및 [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

- <225> 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 항원에 대한 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법에 의해, 또는 방사성면역분석 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석에 의해 측정된다.
- <226> 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐챠드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.
- <227> 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킨다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 상기 목적에 적합한 배양 배지로는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 들 수 있다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서의 복수 종양으로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.
- <228> 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 적합하게는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 항체 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수 액, 또는 혈청으로부터 분리한다.
- <229> 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고, 시퀀싱된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 단리하면, DNA를 발현 벡터 내에 놓은 후, 이. 콜라이(*E. Coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 다르게는 항체 단백질을 생산하지 않는 글수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포 내의 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문으로는 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)]을 들 수 있다.
- <230> 추가의 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여, 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에는 각각 파지 라이브러리를 이용한 뮤린 및 인간 항체의 단리가 기재되어 있다. 후속 간행물에는 사슬 셀플링에 의한 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합적 감염 및 생체내 재조합이 기재되어 있다 (문헌 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)]). 따라서, 상기 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- <231> DNA는 또한 예를 들어 동종 뮤린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다.
- <232> 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 이들로 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.
- <233> (iii) 인간화 항체
- <234> 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되었다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 그의 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입 (import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라, 초가변 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행된다 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 비손상인 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 제4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

- <235> 인간화 항체의 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘다의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "최적(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 그 후, 설치류의 것과 가장 가까운 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로서 수용한다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 이용한다. 동일한 프레임워크는 몇몇 여러가지 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).
- <236> 항체가 항원에 대한 고 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것은 또한 중요하다. 상기 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체를 모 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적인 인간화 생성물의 분석의 방법에 의해 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 예시 및 제시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 디스플레이의 점검은 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린의 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선택하고, 수여자 및 도입 서열로부터 결합하여 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 목적하는 항체 특징이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는 것에 관여한다.
- <237> (iv) 인간 항체
- <238> 인간화에 대한 대안법으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화시 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식 계열 돌연변이체 내의 항체 중쇄 결합 영역 (J_H)의 동종접합 성 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다고 기재되었다. 이러한 생식 계열 돌연변이체 마우스 내의 인간 생식 계열 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제5,591,669호, 제5,589,369호 및 제5,545,807호를 참조한다.
- <239> 대안적으로, 파지 제시 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)])을 이용하여 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자로부터 시험관내에서 생산할 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 프레임 내에서 M13 또는 fd와 같은 필라멘트성 박테리오파지의 주요 또는 부 코팅 단백질 유전자 내로 클로닝하고, 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 제시한다. 필라멘트성 입자가 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기재로 하는 선별은 또한 상기 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자의 선별을 초래한다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 제시는 다양한 형태로 수행될 수 있으며, 그의 검토를 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 절편의 몇몇 공급원은 파지 제시에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있으며, 항원의 다양한 어레이에 대한 항체 (자가-항원 포함)은 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호를 참조한다.
- <240> 또한, 인간 항체는 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).
- <241> (v) 항체 단편
- <242> 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비손상 항체의 단백질분해성 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 상기 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터

터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택의 항체는 단일체 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

<243> (vi) 이중특이적 항체

<244> 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 B 세포 표면 마커의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 이러한 항체는 제1 B 세포 마커에 결합하고, 또한 제2 B 세포 표면 마커에 결합할 수 있다. 대안적으로, 항-B 세포 마커 결합 팔(arm)은 T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2 또는 CD3)와 같은 백혈구, 또는 Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) 및 Fc γ RIII (CD16)와 같은 Fc 수용체 상의 촉발 분자에 결합하는 팔과 결합되어 B 세포에 대한 세포 방어 메카니즘에 집중할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 B 세포에 위치화시키는데 사용될 수 있다. 상기 항체는 B 세포 마커-결합 팔, 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)을 결합시키는 팔을 갖는다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

<245> 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 쇄가 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 한다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위적 구분 때문에, 상기 하이브리도마 (콰드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정체는 다소 번거로우며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차는 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

<246> 상이한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)는 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 이는 하나 이상의 융합물에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합물, 및 필요할 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터 내로 삽입되며, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염된다. 이는 구축에 사용되는 3개의 폴리펩티드 쇄의 비동일한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시예에서, 3개의 폴리펩티드의 상호 비율을 조정하는 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드 쇄의 동일한 비율의 발현이 높은 수율을 초래할 경우 또는 비율이 특정 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터 내의 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

<247> 상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 팔에 혼성 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 단지 절반 내의 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 목적하는 이중특이적 화합물의 원하지 않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터의 분리를 용이하게 한다. 상기 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 보다 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

<248> 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 항체 분자의 쌍 사이의 계면을 유전자조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이중이량체의 퍼센트를 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 적어도 일부의 C_H3 도메인을 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)으로 대체된다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보충적 "공동"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

<249> 이중특이적 항체는 가교된 또는 "헤테로컨쥬게이트" 항체를 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨쥬게이트 내의 항체

중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위한 것으로 제안된다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

<250> 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 또한 문헌에 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]에는 비손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 상기 단편을 티올 착물화제 나트륨 아르세나이트의 존재하에서 환원시켜 근접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬퍼드 형성을 방지한다. 그 후, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸아민을 사용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 다른 Fab'-TNB 유도체의 동물량과 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

<251> 최근의 진보는 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접적 회수를 용이하게 했다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 제조가 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분리하고, 지정 시험관내 화학적 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체 및 정상 인간 T 세포를 과발현하는 세포에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

<252> 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리하는 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 제조될 수 있다 (문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)]). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웹티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 후, 재산화시켜 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 제조에 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하는 별법의 메카니즘을 제공하였다. 단편은, 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이룰 수 없는 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 또 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하는 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

<253> 2 이상의 결합가(valence)를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]).

<254> IV. 길항체의 컨쥬게이트 및 다른 변형

<255> 본원에서 방법에 사용되거나 제조품에 포함되는 길항체는, 예를 들어 본 발명의 전신적으로 투여된 조성물의 전달이 표적화 분자에 대한 CD20 길항체를 컨쥬게이션함으로써 증진될 수 있도록, 골-표적화제와 같은 또 다른 작용제와 임의로 컨쥬게이션된다. "표적화 분자"는 관심의 조직에 결합하는 분자이다. 예를 들어, 골-표적화 분자로는 테트라사이클린, 칼세인, 비스포스포네이트, 폴리아스파르트산, 폴리글루탐산, 아미노포스포슈거, 골의 미네랄 상과 관련된 것으로 공지된 웹티드 (예를 들어, 오스테오넥틴, 골 시알로프로테인 및 오스테오플린), 골-특이적 항체, 골 미네랄 또는 골 세포 결합 도메인을 갖는 단백질 (예를 들어, 칼시토닌) 등을 들 수 있다. 예를 들어, EP 512,844; EP 341,961; 및 문헌 [Brinkley, *Bioconjugate Chem.*, 3:2-13 (1992)]의 개시사항을 참조한다.

<256> 컨쥬게이션은 통상적으로 공유 결합을 통해 달성될 것이며, 표적화 분자 및 CD20 길항체 폴리웹티드 상의 연결 부위에 의해 결정될 정확한 성질이다. 전형적으로, 비-웹티드성 작용제는 화학적 개질에 의해 그의 아미노산 측쇄, 탄화수소 쇄, 또는 CD20 길항체 상에 도입된 반응성 기를 통해, CD20 길항체에 컨쥬게이션을 허용하는 링커의 첨가에 의해 개질된다. 예를 들어, 약물은 리신 잔기의 ε-아미노기를 통해, 유리 α-아미노기를 통해, 시스테인 잔기로 디슬퍼트 교환에 의해, 또는 주기적인 산을 갖는 탄화수소 쇄에서 1,2-디올의 산화에 의해 부착되어 쉬프(Schiff)-염기 연결을 통해 다양한 친핵체를 함유하는 약물의 부착을 가능하게 한다. 예를 들어,

미국 특허 제4,256,833호를 참조한다.

<257> 단백질 개질제로는 아민-반응성 시약 (예를 들어, 반응성 에스테르, 이소티오시아네이트, 이소티오시아네이트, 알데히드, 및 술포닐 할라이드), 티올-반응성 시약 (예를 들어, 할로아세틸 유도체 및 말레이미드), 및 카르복실산- 및 알데히드-반응성 시약을 들 수 있다. CD20 길항제 폴리펩티드는 이관능성 가교 시약의 사용을 통해 웨პ티드성 작용제에 공유 결합될 수 있다. 헤테로이관능성 시약은 보다 통상적으로 사용되며, 2가지 상이한 반응성 잔기의 사용을 통해 2가지 상이한 단백질의 제어된 커플링을 가능하게 한다 (예를 들어, 아민-반응성 플러스 티올, 요오도아세트아미드 또는 말레이미드). 이러한 연결제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 브링클리(Brinkley)의 상기 문헌 및 미국 특허 제4,671,958호를 참조한다. 웨პ티드성 링커가 또한 고려될 수 있다. 대안적으로, CD20 길항제 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 제조를 통해 웨პ티드성 잔기에 연결될 수 있다.

<258> 추가의 이관능성 단백질 커플링제의 예로는 N-숙신이미딜-3-(2-파리딜디티올) 프로페오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 툴리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 폴루오르 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 들 수 있다.

<259> 대안적으로, 길항제 및 작용제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

<260> 길항제의 다른 변형이 본원에서 고려된다. 예를 들어, 길항제는 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다.

<261> 본원에서 개시된 갤항제는 또한 리포좀으로서 제제화될 수 있다.

<262> 길항제를 함유하는 리포좀은 문헌 [Epstein et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 1997년 10월 23일자로 WO 97/38731에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포좀은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

<263> 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 갖는 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포좀은 한정된 공극 크기의 필터를 통해 압출되어 목적하는 직경을 갖는 리포좀을 수득한다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같은 리포좀에 컨쥬게이션될 수 있다. 화학요법제는 임의로 리포좀 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)]을 참조한다.

<264> 본원에 기재된 단백질 또는 웨პ티드 길항제의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 길항제의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 길항제의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 길항제 핵산 내로 도입함으로써, 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 길항제의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구조물이 목적하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구조물에 도달한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 길항제의 번역후 과정을 변화시킬 수 있다.

<265> 돌연변이유발에 바람직한 위치인 길항제의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발법"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기의 기 (예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu와 같은 하전된 잔기)를 확인하고, 이를 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 준다. 그 후, 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 상기 아미노산 위치를 치환 부위에서, 또는 그에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 예정되는 반면, 돌연변이의 성질 그 자체는 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 돌연변이의

성능을 주어진 부위에서 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 변이체를 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

<266> 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 길항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 길항체를 들 수 있다. 길항체 분자의 다른 삽입 변이체는 길항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 또는 길항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에의 융합을 포함한다.

<267> 또다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 상기 변이체는 상이한 잔기로 대체된 길항체 분자 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이유발법에 가장 큰 관심 부위로는 초가변 영역 또는 CDR을 들 수 있지만, FR 또는 Fc 영역 변경도 고려된다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"이라는 표제하에 나타나 있다. 이러한 치환이 생물학적 활성에 변화를 초래할 경우, 표 1의 "예시적인 치환"으로 명명된, 또는 아미노산 부류에 대해 하기에 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물이 스크리닝될 수 있다.

표 1

원래 잔기	예시적인 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

<268>

<269>

- <270> 길항제의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 쉬트 또는 나선 형태로서의 치환의 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기를 유지하는 그의 효과에 있어서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다.
- <271> 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기반한 기로 나누어질 수 있다.
- <272> (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- <273> (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr;
- <274> (3) 산성: Asp, Glu;
- <275> (4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- <276> (5) 쇄 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및
- <277> (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- <278> 비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원으로 또 다른 구성원을 교환하는 것을 수반할 것이다.
- <279> 또한, 일반적으로 길항제의 완전한 형태를 유지하는데 관련되지 않는 임의의 시스테인 잔기를 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)을 길항제에 첨가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히 길항제가 Fv 단편과 같은 항체 단편일 경우).
- <280> 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 제시를 사용한 친화도 성숙을 포함한다. 간략히, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성할 수 있다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에의 융합으로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 일가 형태로 제시된다. 그 후, 파지-제시된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발법을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 사이의 접촉 지점을 확인하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에 설명된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.
- <281> 길항제의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 길항제의 원래 글리코실화 패턴을 변경한다. 변경은 길항제에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분을 결실시키고/거나 길항제에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다.
- <282> 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 상기 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당, 즉 N-아세틸갈اكت오사민, 갈اكت오스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록실리신도 사용될 수 있다.
- <283> 글리코실화 부위의 길항제에의 첨가는 편리하게는 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대해). 변경은 또한 원래 길항제의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 그것으로의 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해).
- <284> 길항제의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 상기 방법으로는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위-지정) 돌연변이유발에 의한 제조, PCR 돌연변이유발, 및 길항제의 초기 제조된 변이체 또는 비

-변이체 형태의 카세트 돌연변이유발을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<285> 예를 들어 길항체의 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 증진시키기 위해, 본 발명의 길항체를 효과기 기능에 대해 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체 길항체의 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성을 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입하여 상기 영역에서 쇄간 디솔피드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체성 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 증진된 항종양 활성을 갖는 동종이량체성 항체는 또한 문헌 [Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이종이관능성 가교체를 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖고 그에 의해 증진된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가지도록 유전자 조작될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

<286> 길항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 구조 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 길항체 (특히 항체 단편) 내로 훈입할 수 있다. 본원에 사용된 "구조 수용체 결합 에피토프"라는 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

V. 제약 제제

<288> 본 발명에 따라 사용되는 길항체의 조성물의 치료 제제는 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 목적하는 정도의 순도를 갖는 길항체를 혼합함으로써 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]), 일반적으로 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 퀼레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터-이온; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스 (PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 들 수 있다.

<289> 예시적인 항-CD20 항체 제제는 WO 1998/56418에 기재되어 있다. 상기 간행물에는 2 내지 8°C에서 2년 저장의 최소 저장 수명을 갖는, pH 5.0에서 40 mg/mL 리툭시마브, 25 mM 아세테이트, 50 mM 트레할로스, 0.9% 벤질 알코올, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하는 액상 다회투여량 제제가 기재되어 있다. 관심의 또 다른 항-CD20 제제는 염화나트륨 9.0 mg/mL 중 10 mg/mL 리툭시마브, 7.35 mg/mL 나트륨 시트레이트 디히드레이트, 0.7 mg/mL 폴리소르베이트 80, 및 주사용 멸균수 (pH 6.5)를 포함한다.

<290> 피하 투여에 적합한 동결건조된 제제는 미국 특허 제6,267,958호 (Andya et al.)에 기재되어 있다. 이러한 동결건조된 제제는 적합한 희석제로 고 단백질 농도로 재구성될 수 있으며, 재구성된 제제는 본원에서 치료되어야 할 포유동물에 피하 투여될 수 있다.

<291> 본원의 제제는 또한 필요할 경우 하나 초과의 활성 화합물 (상기 설명된 바와 같은 제2 의약), 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 주지 않는 상보적인 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. 이러한 의약의 종류 및 유효량은 예를 들어 제제에 존재하는 길항체, 및 치료될 포유동물의 임상적 파라미터에 의존한다. 바람직한 이러한 의약은 상기 설명되어 있다.

<292> 활성 성분은 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀젼에서, 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

- <293> 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 매트릭스가 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로 캡슐 형태인 항체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)(상표명) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 들 수 있다.
- <294> 본원에서 추가의 제약상 허용되는 전달 비히클은 분말화된 골, 세라믹, 생체분해성 및 비-생체분해성 합성 중합체, 및 천연 중합체; 조직 접착제 (예를 들어, 피브린-기반); 수성 중합체성 겔; 수용액; 리포좀 등을 비롯한 생체적합성 고체 또는 반-고체 매트릭스를 포함한다. 예시적인 제제 및 전달 비히클은 하기에 개시되어 있다. 상기 개시는 예시적이며, 당업자는 구체적으로 거명된 물질의 유도체 및 물질의 조합을 비롯한 적합한 대안을 용이하게 인지할 것이다. 제제는 1종 이상의 추가의 성장 인자, 부형제, 보존제, 가용화제, 완충제, 바이알 표면 상의 단백질 소실을 방지하는 알부민 등을 추가로 포함할 수 있다. 제제화 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th ed., 1995]에 개시되어 있다.
- <295> CD20 길항제는 조직 접착제의 성분으로서 전달될 수 있다. 피브린-기반 조직 접착제는 당업계에 공지되어 있으며, 혈장으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 제조될 수 있다. 조직 접착제는 트롬빈이 가교를 활성화시키는 데 사용하기 직전에 첨가되는 피브리노겐 및 인자 XIII을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제4,414,976호; 제4,427,650호; 및 제4,928,603호를 참조한다. 조직 접착제의 사용은 결합 조직이 찢어진 인대 또는 힘줄과 같은 복구되어야 하는 상태의 치료에 특히 유익할 수 있다. CD20 길항제는 또한 콜라겐-기반 접착제와 조합될 수 있다. 콜라겐은 천연 또는 재조합 공급원으로부터 단리될 수 있다.
- <296> 고체 및 반고체 매트릭스는 불유합 골절, 공동, 및 다른 골 결손의 충전을 위한 전달 장치로 제조된다. 상기 매트릭스는 천연 골을 위한 스플라이스-충전 대용물을 제공하며, 골 대체제, 예를 들어 인산삼칼슘, 수산화인회석, 인산삼칼슘 및 수산화인회석의 조합, 폴리메틸메타크릴레이트, 알루미네이트 및 다른 세라믹, 및 탈염화된 동결-건조된 괴질 골을 들 수 있다. 고체 및 반고체 매트릭스는 또한 다양한 중합체성 물질로부터 제조될 수 있다. 반-고체 매트릭스는 이들이 골 결손의 정확한 충전을 제공하도록 성형될 수 있도록, 유연성의 이익을 제공한다. 매트릭스는 다른 활성 또는 불활성 성분을 포함할 수 있다. 조직 성장 또는 침윤을 촉진하는 작용제는 특히 흥미롭다. 골 성장을 촉진하는 작용제로는 골 형태형성 단백질 (미국 특허 제4,761,471호 및 WO 90/11366), 오스테오계닌 (문헌 [Sampath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7109-7113 (1987)]), 및 NaF (문헌 [Tencer et al., J. Biomed. Mat. Res. 23: 571-589 (1989)])를 들 수 있다.
- <297> 생체분해성, 합성 중합체로는 폴리에스테르, 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리카르보네이트, 폴리푸마레이트, 폴리히드록시부티레이트, 비닐 중합체 등을 들 수 있다. 구체적인 예로는 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드/폴리글리콜리드 공중합체, 폴리디옥사논, 폴리글리콜리드/트리메틸렌 카르보네이트 공중합체, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 및 폴리비닐 알코올을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 물질은 골에의 부착 또는 골 내로의 삽입을 위해 필름, 플레이트, 핀, 막대, 스크류, 블록, 격자 등을 비롯한 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,863,297호; 및 WO 93/20859를 참조한다. 상기 물질은 알부민, 폴리옥시에틸렌소르비탄 세정제 또는 글루탐산과 같은 담체를 추가로 포함할 수 있다. 원칙상, 중합체 분해를 증진시키거나, 매트릭스에서 공극을 생성하거나, 성장 인자(들)의 매트릭스로의 흡수를 감소시키는 임의의 물질은 담체로서 사용될 수 있다. 담체로서 유용한 폴리옥시에틸렌소르비탄 세정제로는 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트, 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노팔미테이트, 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노스테아레이트 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 트리올레이트를 들 수 있다. 가소화제가 또한 포함될 수 있다.
- <298> 일반적으로, 본원에서 기재된 바와 같은 필름 또는 장치는 손상 부위의 골에 적용된다. 적용은 일반적으로 표준 수술 절차를 이용한 골 내로의 임플란트 또는 표면에의 부착에 의한다.
- <299> 생체분해성 중합체 필름은 인공 장치 및 외과적 임플란트를 위한 코팅으로서 특히 유용하다. 이러한 필름은 예를 들어 외과적 스크류, 막대, 핀, 플레이트 등의 외부 표면 주위에 싸여질 수 있거나, 그 자체가 권취되거나, 다르게는 다양한 형태로 형성될 수 있다. 이러한 종류의 임플란트 가능한 장치는 정형외과적 수술에 통상적으로 사용된다. 필름은 또한 수산화인회석 블록, 탈염화된 골 매트릭스 플러그, 콜라겐 매트릭스 등과 같은 골 충전

물질을 코팅하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 "공중합체"라는 용어는 2종 이상의 종류의 단량체 단위를 함유하는 임의의 중합체를 포함한다.

<300> 매트릭스의 분해 및 결과로서 그로부터의 성장 인자의 방출은 문자량, 공중합체 구조, 공중합체 비율, 매트릭스 두께, 및 다공성과 같은 파라미터를 조정함으로써, 및 상기 개시된 바와 같은 담체를 포함시킴으로써 조절될 수 있다. PLA/PGA 필름은 예를 들어 일반적으로 75:25 내지 25:75, 보다 통상적으로 65:35 내지 35:65의 PLA:PGA 비율을 제공하도록 제제화된다. 일반적으로, 잠플란트는 10,000 내지 200,000 달톤의 문자량을 갖는 공중합체를 이용하여 제조될 것이다. 일반적으로, 저분자량 공중합체는 보다 높은 문자량 제제보다 급속하게 분해될 것이며, 랜덤 공중합체는 덜 결정질이어서, 공중합체의 다른 종류보다 빨리 분해되며, 거울상이성질체 격자의 중합체는 결정질이어서, 그의 라세미 반대물보다 분해에 더 내성이다.

<301> 중합체 매트릭스는 당업계에 공지된 절차에 따라 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 제4,902,515호; 문헌 [Gilding and Reed, Polymer 20:1459-1464 (1979)]; 및 미국 특허 제3,773,919호를 참조한다. 예를 들어, PLA/PGA 공중합체 잠플란트는 적합한 용액 (예를 들어, 클로로포름 또는 메틸렌 클로라이드)에서 목적하는 양의 PLA/PGA 공중합체 과립을 배합하고, 생성된 용액을 성형하고, 용액을 완전히 증발시킴으로써 제조된다. 대안법에서, PLA/PGA 잠플란트는 압축 성형, 압출, 또는 다른 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 매트릭스를 로딩하기 위해, CD20 길항제 및 담체를 분말 또는 액체 용액으로서 적용한다. 예를 들어, 동결건조된 CD20 길항제 및 알부민은 중합체 필름의 한 표면, 및 풀딩된 필름의 한 면에 걸쳐 균일하게 분산될 수 있다. 반복된 상기 과정에 의해, 중합체 및 CD20 길항제의 다중층 "샌드위치"가 구축될 수 있다. 대안법에서, 단백질은 건조가 가능한 수용액으로서 (예를 들어, 인산염 완충 염수 또는 0.1 M 아세트산 중) 적용될 수 있다. 다공성 잠플란트는 CD20 길항제의 용액 (임의로 다른 성분 함유)에 흡인되고, 액체 증발될 수 있다. CD20 길항제는 유연성 중합체성 매트릭스로 제조된 후, 매트릭스는 목적하는 형태로 형성되고, 승온 (예를 들어, 60 내지 65°C)에서 경화될 수 있다. 다공성 잠플란트는 진공하에서 매트릭스를 경화시킴으로써 제조될 수 있다.

<302> CD20 길항제는 또한 생체분해성 스폰지, 예를 들어 젤라틴, 콜라겐, 셀룰로스 또는 키틴 스폰지와 조합되어 전달될 수 있다. 이러한 스폰지는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제2,465,357호; 미국 특허 제4,271,070호; 및 WO 90/13320을 참조한다. CD20 길항제의 용액, 임의로, 1종 이상의 치료제는 스폰지 내로 주입되고, 스폰지는 수분 함량을 50% 미만, 바람직하게는 10% 미만으로 감소시키는데 충분한 시간 동안 30 내지 100°C의 온도에서 공기-건조된다.

<303> 젤은 또한 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 성장 인자의 전달을 위한 수성 중합체성 젤의 사용은 예를 들어 미국 특허 제5,427,778호; 제5,770,228호; 제4,717,717호; 및 제5,457,093호에 개시되어 있다. 젤은 물에서 점성 용액을 형성하는 생체적합성, 수용성 또는 수팽창성 중합체를 포함한다. 이러한 중합체로는 다당류, 예를 들어 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 텍스트란, 전분, 키토산 및 알긴산; 글리코사미노글리칸, 예를 들어 히알루론산, 콘드로이틴, 콘드로이틴 술페이트, 헤파린 및 헤파린 술페이트; 단백질, 예를 들어 콜라겐, 젤라틴 및 피브로네틴; 및 아크릴아미드, 예를 들어 폴리아크릴아미드 및 폴리메타크릴아미드를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 젤은 일반적으로 200 cps 내지 100,000 cps, 보다 통상적으로 약 1000 cps 내지 30,000 cps의 점도로 실온에서 제조되며, 후자의 범위는 물 중 약 0.25 내지 10% 히드록시에틸 셀룰로스에 상응한다. 보다 높은 점도는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,427,778호). 점도는 성분 중합체(들)의 농도 및/또는 길이를 다양화함으로써 조정될 수 있다. 젤은 중합체를 중성 또는 약산성 pH의 저 이온 농도 시트레이트, 포스페이트, 또는 아세테이트 완충액과 같은 적합한 완충액과 배합함으로써 제조된다. 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤질 알코올 등과 같은 보존제 (항균제)가 일반적으로 포함된다. 철저한 혼합 후, 용액은 적합한 수단 (예를 들어, 오토클레이빙)에 의해 멸균된다. 혼합물을 냉각되고, 필터-멸균된 CD20 길항제가 첨가된다.

<304> CD20 길항제의 국소 전달을 위한 대안적인 수단으로는 삼투성 미니펌프 (예를 들어, 알제트(ALZET)(등록상표) 미니펌프; 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재하는 알자 코포레이션(Alza Corporation)); WO 92/03125에 개시된 바와 같은 전기적으로 하전된 텍스트란 비드; 문헌 [Ksander et al. (Ann. Surg. 211:288-294, 1990)]에 개시된 것과 같은 콜라겐-기반 전달 시스템; 및 문헌 [Edelman et al. (Biomaterials, 12:619-626, 1991)]에 개시된 바와 같은 알기네이트-기반 시스템을 들 수 있다. 골에서의 지속된 국소 전달을 위한 당업계에 공지된 다른 수단으로는 치료제, 및 그 안에 혼입된 치료 조성물을 갖는 고체 플라스틱 막대가 함유될 수 있는 다공성 코팅된 금속 보철물을 들 수 있다.

<305> CD20 길항제는 또한 치료 유효량의 CD20 길항제를 개체에게 투여함으로써 골다공증의 치료에 사용될 수 있다.

CD20 길항체 단백질은 생체내 투여량 분석을 이용하여 비손상 동물에서 시험될 수 있다. 전형적인 투여량은 피하, 복막내 또는 경구 투여에 의해 달성될 수 있으며, 주사, 서방형 또는 다른 전달 기술에 의해 수행될 수 있다. CD20 길항체의 투여를 위한 기간은 다양할 수 있다 (예를 들어, 28일 및 35일이 적절할 수 있다).

<306> CD20 길항체는, 골모세포 증식이 일어나고 골 성장이 자극되도록 CD20 길항체가 골모세포와 접촉하도록 포유동물 신체에 임플란트될 수 있다. 예를 들어, CD20 길항체는 골 형태형성 단백질 (BMP)과 결합되어 매트릭스에 위치될 수 있다. BMP는 중간엽 골모세포 전구체의 부위로의 이동을 유도하며, 또한 중간엽 세포의 골모세포로의 분화를 유도한다. 그 후, CD20 길항체는 골모세포의 추가의 증식을 자극할 것이다. 적합한 매트릭스는 다공성 물질의 입자로 이루어진다. 공극은 전구세포 이동 및 후속의 분화 및 증식을 가능하게 하는 치수여야 하며, 일반적으로 70 내지 850 μm , 통상적으로 150 μm 내지 420 μm 이다. CD20 길항체를 함유하는 매트릭스는 골 결손을 포함하는 형태로 성형될 수 있다. 매트릭스 물질의 예는 미립자, 탈염화된, 구아닌 추출된, 종-특이적 골이다. 다른 잠재적으로 유용한 매트릭스 물질로는 콜라겐, 글리콜산 및 락트산이 단독중합체 및 공중합체, 수산화인회석, 인산삼칼슘, 및 다른 인산칼슘을 들 수 있다. CD20 길항체는 골모세포의 증식을 촉진하는데 충분한 농도로, 바람직하게는 매트릭스의 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도로 매트릭스 내로 적용될 수 있다. CD20 길항체의 용액은 또한 골절 부위 내로 직접적으로 주사되어 골절의 치유를 촉진시킬 수 있다. BMP의 예 및 제조를 위한 매트릭스의 사용은 WO 92/07073, WO 91/05802, 미국 특허 제5,645,591호 및 미국 특허 제5,108,753호에 개시되어 있다.

<307> 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

<308> 또 다른 실시양태 내에서, 본 발명은 시험관내에서 골-형성 세포, 또는 그의 전구체의 성장 및/또는 분화의 자극 방법을 제공한다. 상기 방법을 이용하여, 일반적으로 상기 개시된 바와 같이 세포를 환자로부터 수거하고, 생체외에서 확장시키고, 환자에게 보낸다. 분화-자극제의 존재하에서 배양되어 그 중에서도 골모세포, 파골세포 및 연골세포로 발달될 수 있는 골수 세포의 성장 및/또는 분화가 특히 흥미롭다. 일차 배양물 내의 분화된 세포의 확인은 주로 표현형적이다. 예를 들어, 골모세포에 대한 표현형적 마커는 알칼리성 포스파타제의 발현 (문헌 [Manduca et al., J. Bone Min. Res. 8:281 (1993)]), 제1형 콜라겐 합성 (문헌 [Kurihara et al., Endocrinol. 118(3):940-947 (1986)]), 오스테오칼신의 생성 (문헌 [Yoon et al., Biochem. 27:8521-8526 (1988)]) 및 부갑상선 호르몬에 대한 반응성 (문헌 [Aubin et al., J. Cell Biol. 92:452-461 (1982)])을 포함한다. 골모세포는 전형적으로 탄소 공급원, 질소 공급원, 필수 아미노산, 비타민, 미네랄 및 일반적으로 소태아 혈청에 의해 공급된 성장 인자를 포함하는 성장 배지에서 5% CO_2 에서 37°C에서 배양되며, 다양한 적합한 배지는 당업계에 공지되어 있다. CD20 길항체 폴리펩티드는 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 약 1000 ng/mL 의 농도로 상기 세포 유형에 대한 조직 배양 배지에 첨가된다. 당업자는 CD20 길항체 단백질이 유리하게는 배양 배지에서 다른 성장 인자와 조합될 수 있음을 인지할 것이다.

<309> 골 결손은 또한 B-세포 표면 마커에 대한 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 환자에게 투여되는 유전자-요법 접근법을 이용하여 복구될 수 있다. 이러한 관점에서 유용한 유전자 전달 시스템으로는 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스, 및 네이키드 DNA 벡터를 들 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,399,346호; 문헌 [Mann et al., Cell 33:153 (1983)]; 미국 특허 제4,650,764호; 미국 특허 제4,980,289호; 문헌 [Markowitz et al., J. Virol. 62:1120 (1988)]; 미국 특허 제5,124,263호; WO 95/07358; 및 문헌 [Kuo et al., Blood 82:845 (1993)]을 참조한다. 치주낭, 골절, 관절, 임플란트 부위, 또는 인공 부착 부위에의 벡터의 국소 적용과 같은 침범된 조직의 국소 감염이 특히 흥미롭다.

<310> 대안적인 유전자-요법 접근법에서, US 2004/0126364에는 본원에 적용가능한 방법인 살아 있는 치아전구세포 또는 골전구세포 (OPC)를 이용한 골 조직 성장의 촉진을 위한 포유동물의 폴리펩티드의 전달이 개시되어 있다. 세포는 본원의 항체를 부위-특이적, 조절된 방식으로 전달하는 세포-기반 플랫폼으로서 기능하는 자가 또는 동종이형 세포 이식에 사용될 수 있다. 전신 세포-기반 전달, 뿐만 아니라 골용해성 병변의 부위에서 CD20 항체와 같은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체의 세포-기반 전달이 고려된다. 후자는 항체가 염증성 효과기 세포, 예를 들어 대식세포, 및 골용해성 효과기 세포, 예를 들어 파골세포 전구세포가 위치된 염증성 부위 근처에 놓여져도록 할 수 있다. 세포는 일반적으로 골용해를 억제하는 골에서의 임플란트의 특정 부위에서 항체의 발현을 지정하는 조절가능한, 유도성, 골모세포-특이적 프로모터를 함유하는 유전학적으로 조작된 바이러스 또는 비-바이러스 플라스미드를 함유한다.

<311> 상기 방법의 목적을 위한 세포는 전형적으로 골모세포 계통으로 수용된다. 예를 들어, 골 기질 세포를 자가 또는 동종이형 치주 인대로부터 단리하고, 수여자 환자 내로 임플란트되기 전 생체외에서 조작한다. 골수 기질

세포 또는 인대 유래된 세포의 분화된 상태는 마트리겔(MATRIGEL)(상표명) (벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson))과 같은 세포외 매트릭스 (ECM) 성분 또는 다른 시판되는 매트릭스 제조물의 존재하에서, 바람직하게는 BMP-2, -4, 또는 -6과 같은 1종 이상의 골-형태형성 단백질 (BMP)의 존재하에서 배양에 의해 유도된다. 전구세포로의 분화의 유도는 세포의 유전적 조작 전후에 수행되지만, 상기 단계는 바람직하게는 분화된 세포가 1종 이상의 항체를 코딩하는 유전자를 함유하는 레트로바이러스 발현 벡터로 형질도입되기 전에 수행된다.

<312> 분화된 전구세포는 비분화된 기질 세포에 비해 골 조직을 형성하는 증진된 능력을 갖는다. OPC 또는 치아전구세포는 알칼리성 포스파타제의 생성, 오스테오칼신의 발현, 및 골 시알로프로테인의 발현 (치아전구체의 경우 상아질 시알로프로테인의 발현 이외에)에 의해 골 기질 세포 (뿐만 아니라, 지방, 근육, 또는 연골 세포 또는 조직)으로부터 구별된다.

<313> OPC는 골수 흡인물로부터의 기질 세포로부터 단리되고 확장되며, ECM의 존재하에서 생체외에서 분화되었다. 자가 골수 기질 세포는 확장된다. 세포를 임의로 동결시키고, 분화되고 형질도입되기 전의 기간 동안 액체 질소에서 저장한다. 상기 "뱅키드(banked)" 자가 세포는 장기간에 걸쳐 다회 접종을 가능하게 하며, 이는 류마티스 성 관절염이 수 년 동안 지속될 수 있기 때문에 유익하다.

<314> 임상적 이익이 이러한 세포의 사용에 의해 주어지는 것으로 예상되기 때문에, 추가의 측면에서, 본원의 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체, 바람직하게는 CD20 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 단리된 치아전구세포 또는 골전구세포를 포유동물 내로 도입하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 골용해의 억제 방법을 고려한다. 포유동물은 예를 들어 치주염, 또는 골 소실, 예를 들어 치조골 소실을 유발할 수 있는 다른 골 장애를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있는 인간 환자이다. 본원에서 기재된 방법은 또한 수의학 용도, 예를 들어 개, 고양애, 말을 치료하는데 적용된다.

<315> OPC는 골모세포로 분화된 세포에서 선호적으로 연결되는 핵산의 전사를 지정하는 프로모터에 작동적으로 연결된 본원의 항체를 코딩하는 핵산을 함유하도록 유전학적으로 변형된다. 레트로바이러스 발현 벡터가 전형적으로 구축된다. 이러한 구조물에 바람직한 프로모터는 상기 확인된 미국 특허 출원에 기재된 바와 같은 오스테오칼신, 골 시알로프로테인, 또는 상아질 시알로프로테인 프로모터 서열을 갖는 것, 및/또는 역 트랜스활성화제 테트라사이클린 활성화제 (rtTA) 유전자의 전사를 개시하고, 다시 치료 항체의 생성을 조절하는 프로모터와 같은 골모세포-특이적 프로모터이다. 또한, 치아전구세포 또는 OPC에서 (다른 세포 종류에 비해) 전사를 선호적으로 지정하는 기능을 하는 이러한 프로모터의 말단절단된 단편이 사용될 수 있다. 바람직하게는, OPC는 알파-5 인테그린 수용체의 발현을 증가시키도록 변형될 수 있다. 상기 변형은 세포가 생체내에서 임플란트될 경우 골 매트릭스 단백질에 부착하도록 하며, 이는 OPC가 골용해성 부위 내로 이전의 캡슐화 없이, 예를 들어 다공성 인산 칼슘 세라믹 큐브 또는 다른 종류의 캡슐화된 장치에 직접적으로 삽입될 수 있는 추가의 이익을 부여한다. 항체를 코딩하는 핵산의 발현은 바람직하게는 유도성이다. 골모세포 또는 상아질모세포 전사 조절 DNA는 전사 단위에서 항체의 발현을 제어하는데 사용될 수 있다. 조절 서열, 예를 들어 시스-작용 세포-특이적 전사 조절 요소는 전사 단위에서 항체-코딩 핵산 서열에 5' 위치될 수 있다.

<316> 항체-코딩 서열의 발현은 예를 들어, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유사체 (예를 들어, 미노사이클린 또는 독시사이클린)과 같은 항생제 화합물과 세포를 접촉시킴으로써 조절될 수 있으며, 특정 일 실시양태에서, 테트라사이클린은 미노사이클린과 함께, 함께 또는 별개로 포유동물에게 주어진다. 이러한 항생제 화합물은 바람직하게는 전신 투여된다.

<317> 예를 들어, 테트라사이클린은 치주 수술 적어도 2일 전에, 예를 들어 본 발명의 세포가 임플란트되기 전, 및/또는 수술 및/또는 임플란트 적어도 2일 전에 전신 투여된다. 세포에 의한 항체의 발현은 항생제가 조직에 존재하는 동안, 즉 세포 임플란트 수여자에 투여되는 동안 전환된다. 항체의 발현은 항생제의 투여가 중단된 후 감소되고 중단된다. 전형적으로, 항생제는 수술 8 내지 12일 전 및 수술 8 내지 12일 후에 투여된다. 유사하게, 항생제는 정형외과적 수술, 예를 들어 인공 관절로부터의 연골 제거, 또는 전이성 골 종양의 제거를 위한 수술 전후 (세포가 임플란트되거나 질환을 갖는 조직에 인접한 부위)에 투여된다.

<318> 세포가 치아전구세포일 경우, 상기 포유동물은 치주염, 또는 치주 질환으로 인한 치조골 소실을 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있을 수 있다. 세포는 치아 정형외과적 보철물의 임플란트 전, 동안, 또는 후에 임플란트될 수 있다. 진행된 치주 질환의 치료를 위해, 세포는 턱의 하악 구역의 치주 인대에 국소 투여될 수 있다.

<319> 골 장애의 치료를 위해, 골전구세포는 수여자 포유동물의 골수 내로 또는 포유동물의 인공 관절 내로 임플란트

될 수 있다. 예를 들어, 세포는 경골내 또는 대퇴내 투여된다. 세포는 국소로, 예를 들어 골 소실 부위에서 또는 이러한 부위에 인접하게, 예를 들어 골수에서 임플란트된다.

<320> 포유동물의 골수 내로 세포를 이식하는 방법은 예를 들어 미국 특허 제4,188,486호에서와 같이 당엽계에 공지되어 있다. 투여되는 세포의 투여량은 이식의 위치에 적합한 부피로 1×10 세포 내지 1×10^{10} 세포 범위이다 (예를 들어, 대퇴부의 골수 내로 임플란트에 비해 하약 조직 또는 치주 인대 내로의 임플란트에는 보다 적은 부피가 사용된다). 이러한 임플란트 절차의 임상적 프로토콜은 당엽계에 공지되어 있다. 예를 들어, 체중 kg당 1×10^8 세포의 투여량은 대퇴 골수로 투여될 수 있다. 반복된 임플란트는 류마티스성 관절염과 같은 장기 질환에 필요할 수 있다.

<321> 파골세포-관련된 장애 치료제는 임의로 또한 예를 들어 IL-4, 특히 재조합 인간 IL-4와 같은 항체, 또는 TNF- α 에 대한 억제제와 함께 투여된다. 또한, 아스파린, 일부프로펜 및 인도메타신을 비롯한 NSAID 또는 항-통증제, 뿐만 아니라 비스아릴 COX-2 억제성 화합물 (예를 들어, 미국 특허 제5,994,379호) 및 (메틸술포닐)-페닐-2-(5H)-푸라논 (예를 들어, 미국 특허 제6,020,343호)과 같은 다른 제2 의약은 임의로 투여될 수 있다. 보다 바람직하게는, IL-4 또는 TNF- α 에 대한 억제제가 또한 투여된다.

<322> 단리된 유전학적으로 변형된 OPC는 류마티스성 관절염, 골다공증, 치근단주위 또는 연골내 골 소실, 인공 관절 입자-유도된 골용해, 골절 또는 골 결손, 원발성 또는 속발성 부갑성 선기능항진증, 전이성 골 질환, 골용해성 골 질환, 성형수술후, 인공관절 수술후와 같은 골 소실 장애를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있는 개체의 치료에 사용된다. 보다 바람직하게는, 이러한 포유동물은 류마티스성 관절염 또는 치근단주위 또는 연골내 골 소실, 인공 관절 입자-유도된 골용해, 또는 골용해성 골 전이를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있을 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 항체를 분비하도록 유전자조작된 OPC는 임플란트-유도된 골용해의 발달로 인한 인공 관절 대체의 교정을 겪고 있는 환자, 뿐만 아니라 류마티스성 관절염으로 인한 및 중증 치주질환으로 인한 구강에서 골 소실을 앓고 있는 환자에서 임플란트될 수 있다.

VI. 제조품

<324> 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 골 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 일 측면에서, 제조품은 (a) B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 (예를 들어, CD20 항체를 비롯한, 이렇게 결합하는 항체)를 포함하는 용기 (바람직하게는, 길항제 또는 항체 및 용기 내에 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 용기); 및 (b) 환자와 같은 포유동물에서의 골 장애의 치료를 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하며, 지시서는 길항제 또는 항체가 유효량으로 투여됨을, 예를 들어 약 400 mg 내지 1.3 g의 길항제 또는 항체의 투여량이 1 내지 4회의 투여량의 빈도로 약 1개월의 기간 내에 환자에게 투여됨을 지시한다.

<325> 바람직한 실시양태에서, 본원의 제조품은 제2 의약을 포함하는 용기를 추가로 포함하며, 길항제 또는 항체는 제1 의약이다. 상기 제조품은 유효량의 제2 의약으로 환자에게 치료를 위한 패키지 삽입물에 대한 지시서를 추가로 포함한다. 제2 의약은 상기 설명된 임의의 것일 수 있으며, 예시적인 제2 의약은 파골세포-관련된 장애 치료제, 면역억제제, 세포독성제, 인테그린 길항제, 또는 호르몬이다. 바람직한 제2 의약은 상기 설명된 바와 같은 바람직한 것들이며, 파골세포-관련된 장애 치료제 또는 면역억제제 또는 둘다가 가장 바람직하다.

<326> 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) B-세포 표면 마커에 결합하는 길항제 (예를 들어, CD20 항체를 비롯한, 이렇게 결합하는 항체)를 포함하는 용기 (바람직하게는, 길항제 또는 항체 및 용기 내에 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 용기); 및 (b) 환자와 같은 포유동물에서의 골 장애의 치료를 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하며, 지시서는 항체의 양이 초기 항체 투여량 세트를 제공한 후, 제2 항체 투여량 세트를 제공하는데 유효하며, 제2 노출은 초기 투여량 세트로부터 약 16 내지 54주까지 제공되지 않음을 지시한다.

<327> 바람직하게는, 이러한 패키지 삽입물은 포유동물에서의 골 장애의 치료를 위한 지시서가 제공되며, 지시서는 항체의 양이 약 0.5 내지 4 g의 초기 항체 노출을 제공한 후, 약 0.5 내지 4 g의 제2 항체 노출을 제공하는데 유효하며, 제2 노출은 초기 노출로부터 약 16 내지 54주까지 제공되지 않고, 각각의 항체 노출은 약 1 내지 4회 투여량으로서, 바람직하게는 단일 투여량으로서 또는 2 내지 4회의 항체의 별개의 투여량으로서 제공됨을 지시한다.

<328> 본 발명의 측면의 바람직한 실시양태에서, 본원의 제조품은 제2 의약을 포함하는 용기를 추가로 포함하며, 항체는 제1 의약이고, 제조품은 유효량의 제2 의약으로 포유동물을 치료하기 위한 패키지 삽입물에 관한 지시서를

추가로 포함한다. 제2 의약은 상기 설명된 임의의 것일 수 있으며, 예시적인 제2 의약은 파골세포-관련된 장애 치료제, 면역억제제, 세포독성제, 인테그린 길항제, 또는 호르몬이다. 바람직한 제2 의약은 상기 설명된 바와 같은 바람직한 것들이며, 파골세포-관련된 장애 치료제 또는 면역억제제 또는 둘다가 가장 바람직하다.

<329> 모든 상기 측면에서, 패키지 삽입물은 용기 상에 있거나, 용기와 결합된다. 적합한 용기로는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 들 수 있다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 골 장애의 치료에 유효한 조성물을 보유하거나 함유하며, 멀균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공가능한 스토퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성제는 길항제 또는 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은, 조성물이 길항제 또는 항체의 투여량 및 간격에 관한 특정 지침 및 제공되는 임의의 다른 의약으로 치료에 적격인 환자와 같은 포유동물, 예를 들어 본원에 열거된 것과 같은 골 질환을 갖거나 걸리기 쉬운 것의 치료에 사용됨을 지시한다. 제조품은 주사용 정균수 (BWF), 인산염-완충 염수, 렇기 용액 및/또는 엑스트로스 용액과 같은 제약상 허용되는 희석 완충제를 포함하는 추가의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 비롯한, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

<330> 본 발명의 추가의 상세사항은 하기 비-제한적 실시예에 의해 설명된다. 본 명세서의 모든 인용문헌의 개시사항은 명백히 본원에 참고로 도입된다.

실 시 예

<331> 실시예 1

<332> 혈청 생화학적 마커는 리툭시마브를 사용한 류마티스성 관절염의 치료에 대한 반응과 관련된다

<333> 배경:

<334> 리툭시마브 (RTX; 리툭산(등록상표)/마브테라(등록상표))로 B 세포를 표적화하는 것은 류마티스성 관절염 (RA)의 치료에 대한 새로운 접근법을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 메토트렉세이트에도 불구하고 활성 류마티스성 관절염을 갖는 환자에서의 무작위화된 대조 시험은 단독으로 또는 시클로포스파미드 또는 연속된 메토트렉세이트와 조합된 2회의 리툭시마브 주입의 단일 과정이, 24주에 (문헌 [Edwards et al., N. Engl. J. Med. (2004)], 상기 문헌; Pavelka et al., 상기 문헌) 및 48주에 (문헌 [Edwards et al., N. Engl. J. Med. (2004)], 상기 문헌) 질환 활성의 유의한 개선을 제공하였음을 나타내었으며, 이는 일부 환자에서 2년 동안 지속되었다 (Emery et al., (2004), 상기 문헌). 그러나, RA를 치료하는 그의 작용 메카니즘 또는 RA 환자에서 다양한 생물학적 마커에 대한 그의 효과는 거의 공지되어 있지 않다. 특히, 리툭시마브와 같은 B 세포-고갈 요법이 파골세포의 활성에 영향을 갖는지 여부는 공지되어 있지 않다.

<335> 목적:

<336> 리툭시마브의 혈청 바이오마커에 대한 효과 및 이러한 효과가 임상적 발견과 일치하는지 여부를 추가로 이해하기 위해, 염증 및 골 전복의 혈청학적 마커의 수를 조사하였다.

<337> 방법:

<338> 혈청 샘플을 메토트렉세이트 (MTX) 단독으로, 또는 어딘가에 보고된 RA에서의 리툭시마브의 IIa상 연구의 일부로서 리툭시마브의 단일 과정과 조합된 MTX를 투여받은 RA+ 환자로부터 분석하였다. 하기 마커를 기준선 및 제 24주에 측정하였다: 항-CCP, CRP, S100, SAA, P1NP 및 오스테오칼신 (OC).

<339> 결과:

<340> 제24주에 ACR50 반응의 일차 종말점은 리툭시마브의 2회 주입 후 2주 떨어져서 계속되는 MTX를 투여받은 환자가 MTX 단독을 투여받은 환자보다 유의하게 높은 임상적 반응을 달성하였음을 입증하였다. 바이오마커 데이터를 비-파라미터 접근법을 이용하여 MTX 군에서 기준선으로부터의 제24주의 변화율을 RTX + MTX 군과 비교함으로써 분석하였다. 기준선으로부터의 변화율 중위값을 하기 공식을 이용하여 플로팅하였다.

<341> $Pcfb1(\text{마커}) = ((\text{기울기}_{lr} * \text{마지막 비지트에서의 연구 시간}) / \text{절편}_{lr}) * 100$

<342> 상기 식에서,

<343> $\text{기울기}_{lr} = \text{각각의 환자에 대한 선형 회귀의 기울기}$

<344> 절편_1r = 각각의 환자에 대한 선형 회귀의 절편.

<345> 제24주에 RTX + MTX 군에서 관찰된 임상적 반응은 또한 분석된 마커의 혈청 수준에서 유의한 변화를 수반하였다. 결과는 하기 표 2에 나타나 있다.

표 2

24주에서 기준선으로부터의 변화율(%) 중위값

	MTX (n=40)	리툭시마브+MTX (n=40)	P-값*
항-CCP ¹	-21.03	-45.78	0.0012
CRP ²	-22.21	-59.07	0.0087
S100 ³	-14.31	-52.73	0.0004
SAA ⁴	-10.55	-77.02	<0.0001
P-INP ⁵	-11.78	13.64	0.0119
OC ⁶	1.94	28.76	0.0143

<346>

* 2-측 윌콕슨 순위합 검정(Wilcoxon Rank Sum Test)으로부터의 P-값

<348> ¹ 항-CCP는 항-시트룰린화된 웨티드 항체이다.

<349> ² CRP는 C-반응성 단백질이다.

<350> ³ S100은 포식세포에서 Ca++ 결합 칼그라울린 단백질인 S100 A8/9이다.

<351> ⁴ SAA는 혈청 아밀로이드 A이다.

<352> ⁵ P-INP는 프로콜라겐 제1형 N-말단 프로펩티드이다.

<353> ⁶ OC는 오스테오칼신이다.

<354> 결론:

<355> 분석된 모든 마커는 MTX 단독에 비해 RTX + MTX 군에서 제24주에 유의한 변화를 나타내었다. 특히, 항-CCP, CRP, S100 및 SAA 혈청 수준의 변화는 리툭시마브를 사용한 단일의 짧은 과정이 염증 및 자가항체의 마커에 대한 현저한 효과를 가지며, 이는 관찰된 정후 및 증상에 대한 실질적인 개선과 일치함을 암시한다. 총 이뮤노글로불린 수준은 리툭시마브를 사용한 치료에 의해 유의하게 영향받지 않았다. 또한, OC 및 P1NP 혈청 수준은 MTX 군에 비해 RTX + MTX 군에서 유의하게 증가되었으며, 이는 골 밀도 및/또는 구조적 손상에 대한 리툭시마브의 효과를 암시하는 RA의 정후 및 증상에 대한 리툭시마브의 효과가 골 전복의 바이오마커에 대한 긍정적인 효과에 의해 상쇄됨을 암시한다.

<356> 실시예 2

<357> 동물에서의 골 개형

<358> 리툭시마브의 활성은 골 개형의 동물 모델에서 입증될 수 있다. 즉, 스프라그-돌리 래트를 체중-조화시키고, 7개의 군으로 나누었다 (각각의 군에 7마리의 동물). 연구의 시작에서 희생된 래트의 기준선 대조군, 비히를만이 투여된 대조군, PBS-처치된 대조군, 및 골 성장을 촉진하는 것으로 공지된 화합물이 투여된 양성 대조군이 포함된다. 리툭시마브의 3가지 투여량 수준은 남아 있는 3개의 군에 투여된다.

<359> 리툭시마브, 양성 대조군 화합물, PBS, 또는 비히를 단독을 35일 동안 1일당 1회 피하 투여하였다. 모든 동물에게 희생 9일전 및 2일 전에 칼세인을 주사하였다 (각각의 지정된 날에 투여된 칼세인의 2회 주입). 매주 체중을 측정하였다. 35-일 사이클의 마지막에, 동물을 청량하고, 궤도 또는 심장 평크에 의해 채혈하였다. 혈청 칼슘, 포스페이트, 오스테오칼신 및 CBC를 측정하였다. 다리뼈 (대퇴부 및 경골부) 및 요추골 둘다를 제거하고, 부착성 연성 조직을 청소하고, 평가를 위해 70% 에탄올에 저장하였다. 리툭시마브의 골 개형에 대한 효과를 말단부 정량적 전산화 단층촬영술 (pQCT; 문헌 [Ferretti, Bone 17:353S-364S (1995)]), 이중 에너지 X-선 흡수계측법 (DEXA; 문헌 [Laval-Jeantet et al., Calcif Tissue Int 1. 56:14-18 (1995)]; [Casez et al., Bone and Mineral 26:61-68 (1994)]) 및/또는 조직형태계측법에 의해 수행하였다.

- <360> 생체내에서의 리툭시마브의 투여는 파골세포형성 및 관련된 골 흡수를 억제하고, 인간에서 골감소성 장애를 모방하는 동물 모델에서 보여지는 활성의 병리학적 증가를 차단할 것으로 예상된다. 따라서, 리툭시마브 또는 인간화 2H7은 상기 모델에서 대조군에 비해 골 개형을 증진시키는데 있어서 유효할 것으로 예상된다.
- <361> 실시예 3
- <362> 골다공증에서의 리툭시마브의 임상적 연구
- <363> 골다공증으로 진단된 환자는 리툭시마브로 치료될 수 있다. 치료되는 환자는 B-세포 악성종양을 갖지 않도록 선택될 것이다.
- <364> 리툭시마브를 임의의 하기 투여량 스케줄에 따라 환자에게 정맥내 (IV) 투여하였다.
- <365> (A) 50 mg/m², IV, 제1일
- <366> 150 mg/m², IV, 제8일, 제15일 및 제22일
- <367> (B) 150 mg/m², IV, 제1일
- <368> 375 mg/m², IV, 제8일, 제15일 및 제22일
- <369> (C) 375 mg/m², IV, 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일
- <370> (D) 1 g, IV, 제1일 및 제15일
- <371> 추가의 부가 요법 (예를 들어, 상기 설명된 바와 같은 파골세포-관련된 장애 치료제)은 리툭시마브 요법과 조합될 수 있지만, 바람직하게는 환자는 요법의 과정 전반에 걸쳐 단일-작용제로서의 리툭시마브로 치료된다. 대조군은 위약 (리툭시마브가 없는 리툭시마브의 제제의 용액)을 이용하여 환자의 별개의 군에 투여된다.
- <372> 전체 반응 속도를 표준 화학 파라미터에 의해 측정된 바와 같은 골 골모세포에서의 개선을 기준으로 측정하였다. 또한, 골 밀도측정법 및 골절 속도의 평가를 실시예 1에 설명된 바와 같은 바이오마커 이외의 종말점으로서 사용하였다. 리툭시마브 또는 인간화 2H7의 투여는 바이오마커에 의해 측정된 바와 같은 골 골모세포를 개선시키고, 골 밀도측정을 개선시키고, 상기 기재된 바와 같이 치료된 환자 대 위약 대조군에서 골절 속도를 감소시킬 것이다.
- <373> 실시예 4
- <374> 시험관내에서 형성된 파골세포의 확인
- <375> TRAP는 파골세포-유사 세포를 확인하는 타르트레이트-내성 산 포스파타제를 지칭한다. 리툭시마브는 TRAP 분석에서 양성 대조군으로서 사용될 수 있다.
- <376> TRAP의 세포화학적 염색은 생체내 및 시험관내에서 파골세포를 확인하는데 광범위하게 사용된다. 상기 시험에서, 나프톨 AS-MX 포스페이트 5 mg (미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마(Sigma))을 N,N-디메틸포름아미드 (와코(Wako)) 0.5 mL에 용해시켰다. 패스트 레드 바이올렛 LB 염 (시그마) 30 mg 및 50 mM 타르트산나트륨을 함유하는 0.1 M 아세트산나트륨 완충액 (pH 5.0)을 혼합물 (TRAP-염색 용액)에 첨가하였다. 세포를 Ca²⁺- 및 Mg²⁺-무함유 포스페이트-완충 염수 중 3.7% (v/v) 포름알데히드로 10분 동안 고정하고, 에탄올-아세톤 (50:50, v:v)로 1분 동안 다시 고정하고, TRAP-염색 용액과 함께 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. TRAP-양성 파골세포는 적색 세포처럼 보인다. 파골세포 이외의 세포는 시간에 따라 매주 양성이 되기 때문에, 인큐베이션 시간은 10분을 초과하지 않아야 한다. 염색 후, 세포를 중류수로 세척하고, 3개 이상의 핵을 갖는 TRAP-양성 다핵화된 세포를 현미경하에서 파골세포로서 계수하였다 (문헌 [Nicholson et al., J. Clin. Invest. 78:355 (1986)]). 리툭시마브 또는 인간화 2H7은 상기 TRAP 분석에서 양성 대조군으로서 유효할 것이다.
- <377> 실시예 5
- <378> 치주 질환을 위한 CD20 항체
- <379> 리툭시마브를 사용하여 치주 질환에 대한 골 및 인대 소실을 재생하였다. 상기 모델에서, 턱 골 주의의 20% 내지 80% 감소를 나타내는 치아를 스케일링한 후, 완전-두께 잇몸판을 턱 골 및 치근을 노출시키는 절개술에 의해 만들었다. 치근을 평면화시켜 박테리아 플라크 및 결석을 제거하였다. 리툭시마브를 치주낭에 2.5%

HPMC 젤에서 치아당 100 g의 투여량으로 적용하거나, 대안적으로, 100 mM 아세트사나트륨 완충액 중 리툭시마브의 용액 (pH 6.0)을 분말화된 골에 첨가하여 치아당 100 g 리툭시마브의 투여량을 제공하였다. 물질을 철저히 혼합하고, 노출된 치주낭에 적용하였다. 둘다의 경우에, 그 후, 잇몸판을 닫고, 봉합에 의해 고정하였다. 주위의 턱 골은 리툭시마브 대신 위약을 사용한 대조군에 비해, 리툭시마브 또는 인간화 2H7을 이용한 상기 치주염 모델에서 적어도 부분적으로 재생될 것으로 예상된다.

<380> 실시예 6

<381> 치아 임플란트

리툭시마브의 활성은 상기 치아 임플란트 모델에서 입증될 수 있다. 폴리락트산-폴리글리콜산 필름 (50:50)을 실온에서 10 mL 클로로포름 중 중합체 과립 (펜실베니아주 워링톤에 소재하는 폴리사이언시즈(Polysciences)) 약 340 mg에 용해시킴으로써 용매 주형하고, 용매를 저속 공기 유동 후드에서 실온에서 완전히 증발시켰다. 필름은 10 μm 두께였다. 각각을 80 mm x 40 mm 쉬트로 절단하여, 남아 있는 중합체 질량이 약 270 내지 290 mg이 되게 하였다. 리툭시마브 또는 인간화 2H7 및 토끼 혈청 알부민의 용액을 필름 상에 분산시키고, 액체를 증발시켰다. 그 후, 필름을 0.9-mm 직경 키르쉬너(Kirschner) 와이어 주위로 권취하여 1.5- 또는 3.0-mm 직경의 임플란트를 제공하고, 냉각된 에틸렌 옥시드 기체를 이용하여 멸균시켰다. 상기 임플란트를 CD20 항체 대신 위약을 갖는 임플란트와 함께 래트에 정착하였다. 골 소실은 대조군에 비해 리툭시마브 또는 인간화 2H7를 이용한 상기 임플란트 모델에서 예방될 것이다.

<383> 실시예 7

<384> OVX 동물에서의 골 소실의 예방

리툭시마브의 활성은 에스트로겐-처치된 군이 대조군인 생체내 투여량 분석을 이용하여 급성 난소절제된 동물에서 입증될 수 있다. 상기 예방 모델에서, 스프라그-돌리 래트를 체중-조화시키고, 8개의 군으로 나누었다. 이는 연구의 시작에 희생된 래트의 기준선 대조군; 3개의 대조군 (위장 난소절제된 (위장 OVX) + 비히클만; 난소 절제된 (OVX) + 비히클만; PBS-처치된 OVX); 및 에스트로겐이 투여된 대조군 OVX 군을 포함한다. 3가지 투여량 수준의 리툭시마브를 OVX 동물의 남아 있는 3개의 군에 투여하였다. 난소절제 (OVX)가 과식증을 유도하기 때문에, 모든 OVX 동물에게 35-일 연구 전반에 걸쳐 위장 OVX 동물로 짹-공급하였다.

<386> 리툭시마브, 양성 대조군 화합물, PBS, 또는 비히클 단독을 35일 동안 1일 1회 피하 투여하였다. 대안적으로, 리툭시마브를 35일 동안 임플란트된 임플란트 가능한 펠릿으로 제제화하였다. 위장 OVX/비히클 및 OVX/비히클 군을 포함하는 모든 동물에게 칼세인을 희생 9일 전 및 2일 전에 정맥내 주사하였다 (각각의 지정된 날에 투여된 칼세인의 2회 주사로 새롭게 형성된 골의 완전한 표지화를 보장함). 매주 체중을 측정하였다. 35-일 사이클의 마지막에, 동물의 혈액 및 조직을 상기 기재된 바와 같이 가공하였다. 리툭시마브 또는 인간화 2H7은 대조군에 비해 상기 모델에서 골 소실을 예방하는데 있어서 유효할 것으로 예상된다.

<387> 실시예 8

<388> 만성 OVX 동물에서의 골 효과

리툭시마브의 활성은 만성 OVX 동물에서 입증될 수 있다. 상기 모델에서, 몇몇 스프라그-돌리 래트에게 위장 수술 (위장 OVX) 또는 난소절제술 (OVX)를 래트가 희생되기 0시 및 10시에 적용하여 기준선 대조군으로 사용하였다. 체중을 매주 기록하였다. 골 고갈 6주 후, 10 마리의 위장 OVX 및 10 마리의 OVX 래트를 결핍 기간 대조군으로서 희생을 위해 무작위로 선택하였다. 남아 있는 동물 중, 10 마리의 위장 OVX 및 10 마리의 OVX 래트를 위약-처치된 대조군으로서 사용하였다. 남아 있는 OVX 동물을 5주의 기간 동안 리툭시마브의 3 내지 5회 투여량으로 처치하였다. 양성 대조군으로서, OVX 래트의 군을 상기 모델에서 공지된 동화제인 PTH와 같은 작용제로 처치하였다 (문헌 [Kimmel et al. Endocrinology 132:1577-1584 (1993)]). 대퇴부, 경골부 및 요추골 1 내지 4개를 제거하고, 수집하여 골 형성에 대한 효과를 측정하였다. 인접한 좌측 및 우측 경골부를 pQCT 측정, 암성 골 미네랄 밀도 (BMD) (중량분석 측정), 및 조직학에 이용한 반면, 각각의 경골부의 중간축을 피질 BMD 또는 조직학에 적용하였다. 대퇴부를 생화학적 시험 전에 중간축의 pQCT 스캐닝을 위해 준비하였다. 요추골 (LV)에 대해, LV2를 BMD에 대해 가공하고; LV3를 석회질제거되지 않은 골 조직학을 위해 준비하고; LV4를 기계적 시험을 위해 준비하였다. 리툭시마브 또는 인간화 2H7로 처치된 OVX 동물은 위약-처치된 대조군에 비해 골 형성을 증진시키는데 있어서 대퇴부, 경골부 및 요추골 1 내지 4개의 상기 시험 중 하나 이상에서 개선을 나타낼 것이다.

- <390> 실시예 9
- <391> 세포-전달된 CD20 항체에 의한 치조골 소실의 억제
- <392> 파골세포는 진행성 치주염 동안 과량의 골 흡수의 매개를 담당한다. 리툭시마브는 파골세포 분화 및 기능을 억제할 것으로 예상된다. 상기 동물 모델에서, 자가 세포를 리툭시마브를 발현하도록 유전자조작하고, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 염증 부위, 예를 들어 하악골, 침범된 치아에 인접한 연성 조직, 또는 치주 인대에 영구 임플란트하였다.
- <393> 치주 질환의 당업계에 인지된 모델인 임상적으로 관련된 미생물 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)로부터 유래된 LPS의 반복된 주사에 의해, 치주 질환을 C3H에서 유도하였다. 치주 질환을 갖는 마우스를 유전학적으로 조작된 C₃H₁₀T1/2 뮤린 섬유모세포주를 이용하여 치료하여 조절가능한 방식으로 리툭시마브를 생성하였다. 리툭시마브의 생성은 항생제를 예를 들어 음료수에서 경구 제공함으로써 조절된다. 세포를 골 흡수 부위에 국소 임플란트함으로써, 생활성 분자의 전신 투여 또는 반복적 국소 주사에 대한 필요를 회피하였다.
- <394> 임의로, 치주 질환에 대한 세포의 임플란트 후 항생제를 치주낭에 넣었다. 리툭시마브의 국소 전달을 위한 상기 세포-기반 접근법은 치조열의 흡수를 억제하는 조직 유전자조작을 이용한다.
- <395> 본원에서 사용된 뮤린 몰로니 레트로바이러스 벡터는 잘 특성화되며, 인간 또는 마우스에서 비-면역원성이이다.
- <396> 표준 동일계내 혼성화 (ISH)를 이용하여 리툭시마브 생성을 검출하고, 세포 임플란트 수여자의 하악골 또는 다른 골 조직에 거주하는 세포에서 파골세포 표현형을 특성화하였다.
- <397> 상기로부터, 본 발명의 특정 실시양태가 예시의 목적으로 본원에서 기재되었지만, 다양한 변형이 본 발명의 개념 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 의해서와 같은 것을 제외하고는 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

- <48> 도 1A는 각각의 뮤린 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_L의 CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 4), CDR2 (서열 5) 및 CDR3 (서열 6).
- <49> 도 1B는 각각의 뮤린 2H7 (서열 7), 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 8), 및 인간 카파 경쇄 아군 I (서열 9)의 중쇄 가변 도메인 (V_H)의 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7.v16의 V_H의 CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 10), CDR2 (서열 11) 및 CDR3 (서열 12).
- <50> 도 1A 및 도 1B에서, 각각의 쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 박스처리되어 있고, 지시된 바와 같이 프레임워크 영역 FR1 내지 FR4에 플랭킹된다. 2H7은 뮤린 2H7 항체를 지칭한다. 서열의 2개의 열 사이의 별표는 2개의 서열 사이의 차이를 나타내는 위치를 지시한다. 잔기 넘버링은 문헌 [Kabat et al. Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 따르며, a, b, c, d 및 e로 나타내어진 삽입구를 갖는다.
- <51> 도 2는 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 2) 및 인간화 2H7.v138 변이체 (서열 28)의 경쇄 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다.
- <52> 도 3은 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 8) 및 인간화 2H7.v138 변이체 (서열 29)의 중쇄 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다.

도면

도면1A

가변 경쇄 도메인의 서열 정렬

	FR1	CDR1		
	10 20	30	40	
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC * * * * * * *	RASSSVS-YMH	WYQQKP	
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASSSVS-YMH	WYQQKP	* * * *
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISNYLA	WYQQKP	

	FR2	CDR2			FR3	
	50	60	70	80		
2H7	GSSPKPWIY	APSNLAS	GVPARFSGSGSGTYSYSLTISRVEA			
	* * *	*	*	***	****	
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	APSNLAS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP			
	*	* * *				
hum KI	GKAPKLLIY	AASSLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP			

	CDR3	FR4		
	90	100		
2H7	EDAATYYC	QQWSFNPPT	FGAGTKLELKR	
	*		* * *	
HU2H7.V16	EDPATYYC	QQWSFNPPT	FGQGTKVEIKR	*****
HUM KI	EDFATYYC	QQYNNSLPWT	FGQGTKVEIKR	

도면1B

가변 중쇄 도메인의 서열 정렬

	FR1				CDR1				
	10	20	30	40					
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVIMSCAS		GYTFTSYNMH		WVKQT				
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS		GYTFTSYNMH		WVRQA				
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS		GPTFSSYAMS		WVRQA				

	FR2				CDR2				FR3
	50	a	60		70		80		
2H7	PRQGLEWIG		AIYPGNGDTSYNQKFKG		KATLTIVDKSSSTAYM				
hu2H7.v16	PGKGLEWVG		AIYPGNGDTSYNQKFKG		RFTISVDKSKNLTYL				
hum III	PGKGLEWVA		VISGDGGSTYYADSVKG		RFTISRDNSKNLTYL				

	CDR3				FR4				
	abc	90	100	abcde	110				
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR		VVYYNSNSYWYFDV		WGTGTTVTVSS				
hu2H7.V16	QMNSLRAEDTAVYYCAR		VVYYNSNSYWYFDV		WGQGTLVTVSS				
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR		GRVGYSLY---DY		WGQGTLVTVSS				

도면2

hu2H7.v16 및 hu2H7.v138 경쇄의 정렬

hu2H7.v16	10	20	30	40	50
	DIQMTQSPSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
hu2H7.v138	DIQMTQSPSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
hu2H7.v16	60	70	80	90	100
	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG				
hu2H7.v138	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG				
hu2H7.v16	110	120	130	140	150
	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD				
hu2H7.v138	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD				
hu2H7.v16	160	170	180	190	200
	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL				
hu2H7.v138	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL				
hu2H7.v16	210				
	SSPVTKSPNRGEC				
hu2H7.v138	SSPVTKSFNRGEC				

도면3

hu2H7.v16 및 hu2H7.v138 중쇄의 정렬

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				
hu2H7.v138	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16	IYPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV				
hu2H7.v138	IYPGNGATSYNQKFGRFTISVDKSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV				
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16	YYSNSXWYFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL				
hu2H7.v138	YYSASYWYFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL				
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16	VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPPLAQSSGLYSLSVVTPSSSLGT				
hu2H7.v138	VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPPLAQSSGLYSLSVVTPSSSLGT				
	210	220	230	240	250
hu2H7.v16	QTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPP				
hu2H7.v138	QTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPP				
	260	270	280	290	300
hu2H7.v16	KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				
hu2H7.v138	KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				
	310	320	330	340	350
hu2H7.v16	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE				
hu2H7.v138	YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPRE				
	360	370	380	390	400
hu2H7.v16	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP				
hu2H7.v138	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP				
	410	420	430	440	450
hu2H7.v16	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
hu2H7.v138	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.
SEWELL, K. Lea
QUAN, Joanne

<120> Treatment of Bone Disorders

<130> 39766-0199.PC

<140> PCT/US2006/006998

<141> 2006-02-28

<150> US 11/363,091

<151> 2006-02-28

<150> US 60/656,943

<151> 2005-02-28

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<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	Gly
1				5				10				15			

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

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

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

Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu
					65			70		75		80			

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

Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg
					100			105		

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> humanized 2H7 light chain variable domain

<400> 2

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
									20					30	

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

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

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

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

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg					
									100				105		

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 2H7 CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 2H7 CDR2

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 2H7 CDR3

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1 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 Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> humanized 2H7 heavy chain variable domain

<400> 8

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> human consensus sequence of subgroup III

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR1

<400> 10

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His
1									
					5				
									10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR2

<400> 11

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

Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR3

<400> 12

Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10			

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> humanized 2H7 light chain sequence

<400> 13

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
				20			25					30			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> humanized 2H7 heavy chain sequence

<400> 14

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

85

90

95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 15

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized 2H7 heavy chain sequence

<400> 15

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

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

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

35

40

45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275

280

285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 16

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240

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

245

250

255

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

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

<210> 17

<211> 309

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro
 20 25 30

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu
 35 40 45

Leu Ala Ala Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala
 50 55 60

Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu
 65 70 75 80

Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 85 90 95

Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala
 100 105 110

Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe
 115 120 125

Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro
 130 135 140

Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly
145 150 155 160

Met Asn Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp
165 170 175

Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp
180 185 190

Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys
195 200 205

Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu
210 215 220

Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys
225 230 235 240

Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys
245 250 255

Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala
260 265 270

Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro
275 280 285

Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly
290 295 300

Ala Leu Lys Leu Leu
305

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> BAFF antagonist

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(12)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(15)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X can be either L, F, I or V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X can be any amino acid except cystein

<400> 18

Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 19

Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ala	Trp	Val	Pro	Cys	Ser	Val	Leu
1				5				10						15	

Lys

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 20

Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Trp	Val	Pro	Cys	Gly	Leu	Leu
1				5				10						15	

Arg

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 21

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 22

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
1 5 10 15

Arg

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 23

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
1 5 10 15

Arg

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Formula 1 sequence

<400> 24

Gln Cys Phe Asp Arg Leu Asn Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu Lys
1 5 10 15

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> BAFF antagonist Formula II

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(9)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(15)

<223> X can be any amino acid except cystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> X can be any amino acid except cystein

<400> 25

Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Val Xaa Xaa Trp Val Pro Cys Xaa Xaa Leu
1 5 10 15

Xaa

<210> 26

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Pro	Ala	Pro
1				5			10					15			

Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Cys
			20				25					30			

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

Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln	Glu	Ser	Val	Gly
				50			55			60					

Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Phe	Gly
65				70			75			80					

Ala	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Val
				85			90			95					

Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Leu	Arg	Gly	Ala	Ser
				100				105			110				

Ser	Ala	Glu	Ala	Pro	Asp	Gly	Asp	Lys	Asp	Ala	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp
				115			120			125					

Lys	Val	Ile	Ile	Leu	Ser	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala
				130			135			140					

Trp	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Pro	Gly	His	Ser
145				150			155			160				

Val	Pro	Val	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Thr	Thr
				165			170			175					

Lys	Thr	Ala	Gly	Pro	Glu	Gln	Gln								
				180											

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mini-BR3

<400> 27

Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Cys
1															

5

10

15

Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg

20

25

<210> 28

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hu2H7.v138 light chain region

<400> 28

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1															

5

10

15

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu

20

25

30

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

35

40

45

Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser

50

55

60

Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu

65

70

75

80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hu2H7.v138 heavy chain region

<400> 29

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275

280

285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized 2H7 antibody light-chain variable region

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 31

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 2H7.v511 light chain region

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 32

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 2H7.v511 heavy chain region

<400> 32

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
245															255

Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
260															270

His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
275															285

Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr
290															300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser	Pro	Gly	Lys
450			