(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월22일
(11) 등록번호 10-1468523
(24) 등록일자 2014년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7010615
(22) 출원일자(국제) 2006년10월31일
심사청구일자 2011년10월28일
(85) 번역문제출일자 2008년04월30일
(65) 공개번호 10-2008-0072643
(43) 공개일자 2008년08월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/042564
(87) 국제공개번호 WO 2007/089303
국제공개일자 2007년08월09일
(30) 우선권주장
60/732,444 2005년11월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2004536786 A
WO2004009776 A2*
Arthritis & Rheumatism. October 15, 2004, Vol. 51, No. 5, pp 691-699*
Arthritis & Rheumatism. March 2005, Vol. 52, No. 3, pp 885-891*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
애브비 바이오테크놀로지 리미티드
버뮤다 해밀턴 에이취엠 11 처어치 스트리트 2 클라렌던 하우스
(72) 발명자
맥시모위치 월터 피
캐나다 티6지 252 앨버타주 에드먼튼 헤리티지 메디컬 리서치센터 562 유니버시티 오브 앨버타 디파트먼트 오브 메디신 앤드레이디올로지
웡 로버트 엘
미국 뉴저지주 07920 배스킹 리지 릭스 코트 12
(74) 대리인
장훈

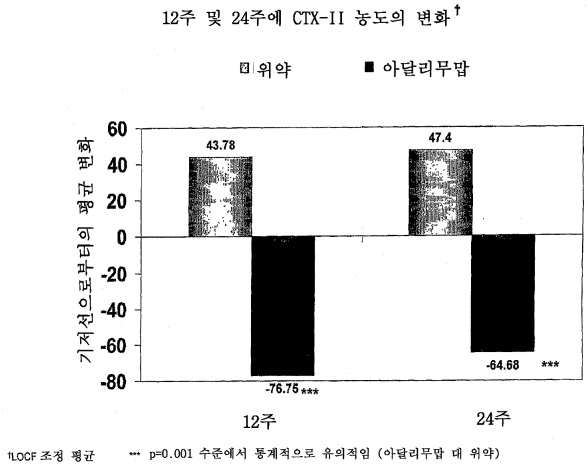
전체 청구항 수 : 총 31 항 심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **바이오마커를 사용하여 강직성 척추염을 진단하기 위한방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커를 사용하여, 강직성 척추염(AS) 치료에 대한 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 부분과 같은 TNF α 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공한다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 후 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 후 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

강직성 척추염(AS)과 관련된 CTX-II의 공지된 표준량에 비해 상기 샘플 내의 CTX-II의 낮은 양 및 강직성 척추염(AS)과 관련된 MMP3의 공지된 표준량에 비해 상기 샘플 내의 MMP3의 낮은 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드가 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테아제 3가 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3인 방법.

청구항 6

제1항, 제3항 및 제5항 중의 어느 한 항에 있어서,

피험자로부터 수득한 샘플에서 C-반응성 단백질(CRP)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 추가로 포함하고,

C-반응성 단백질(CRP)의 공지된 표준량에 비해 낮은 C-반응성 단백질(CRP)의 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항, 제3항 및 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하

는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항, 제3항 및 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 아달리무맙(adalimumab)인 방법.

청구항 12

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 전 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 전 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 전 양 및 MMP3의 치료 전 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 낮은 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 전 양에 비해 낮은 MMP3의 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제12항에 있어서, 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드가 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드인 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제12항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테아제 3가 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3인 방법.

청구항 17

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 후 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골(cartilage) 분해, 골(bone) 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 후 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

강직성 척추염(AS)과 관련된 CTX-II의 공지된 표준량에 비해 CTX-II의 낮은 치료 후 양 및 강직성 척추염(AS)과 관련된 MMP3의 공지된 표준량에 비해 MMP3의 낮은 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

제17항에 있어서, 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드가 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드인 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

제17항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테아제 3가 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3인 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

제12항, 제14항, 제16항, 제17항, 제19항 및 제21항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제12항, 제14항, 제16항, 제17항, 제19항 및 제21항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 아달리무맙인 방법.

청구항 27

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 후 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 후 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 낮은 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 전 양에 비해 낮은 MMP3의 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 전 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 전 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 전 양 및 MMP3의 치료 전 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 낮은 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 전 양에 비해 낮은 MMP3의 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양 및 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 후 양을 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 인간 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

상기 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 후 양이 ELISA 검정을 사용하여 측정되고,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 낮은 CTX-II의 치료 후 양 및 MMP3의 치료 전 양에 비해 낮은 MMP3의 치료 후 양이, 인간 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

삭제

청구항 31

제29항에 있어서, 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드가 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드인 방법.

청구항 32

삭제

청구항 33

제29항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테아제 3가 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3인 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

제27항 내지 제29항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제27항 내지 제29항 중의 어느 한 항에 있어서, 인간 항-TNFα 항체가 아달리무맙인 방법.

청구항 39

삭제

청구항 40

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

강직성 척추염(AS)과 관련된 CTX-II의 공지된 표준량에 비해 상기 샘플 내의 CTX-II의 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

강직성 척추염(AS)과 관련된 CTX-II의 공지된 표준량에 비해 상기 샘플 내의 CTX-II의 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 전 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 CTX-II의 치료 후 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자 치료에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 CTX-II의 치료 후 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 전 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 CTX-II의 치료 후 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 포함하는,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는 것에 대한, 항-TNFα 항체의 효능을 측정하는 방법으로서,

CTX-II의 치료 전 양에 비해 CTX-II의 치료 후 양이 9% 이상 감소된 것이, 항-TNFα 항체가 피험자에서 AS와 관련된 연골 분해, 골 분해, 연골 재흡수, 골 재흡수 및 활막염의 진행을 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제40항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드가 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드인 방법.

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

제40항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 항-TNFα 항체가 아달리무맙인 방법.

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

제40항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 항-TNFα 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제40항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서,

강직성 척추염(AS)을 갖는 피험자로부터 수득한 샘플에서 매트릭스 메탈로프로테아제 3(MMP3)의 치료 후 양을 ELISA 검정을 사용하여 측정하는 단계를 추가로 포함하고,

강직성 척추염(AS)과 관련된 MMP3의 공지된 표준량에 비해 낮은 MMP3의 치료 후 양이, 항-TNFα 항체가 피험자의 강직성 척추염(AS) 치료에 효능이 있다는 것을 나타내고,

상기 항-TNFα 항체는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

명 세 서

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 내용이 본원에 참조로서 인용된 미국 가출원 제60/732,444호 (2005년 11월 1일자)에 대하여 우선권을 주장한다.

[0003] 본 출원은 각각 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 제6,090,382호, 제6,258,562호 및 제6,509,015호와 관련된다. 본 출원은 또한 미국 특허원 제09/801,185호 (2001년 3월 7일자); 미국 특허원 제10/302,356호 (2002년 11월 22일자); 미국 특허원 제10/163657호 (2002년 6월 5일자); 미국 특허원 제10/133715호 (2002년 4월 26일자); 미국 특허원 제10/222140호 (2002년 8월 16일자); 미국 특허원 제10/693233호 (2003년 10월 24일자); 미국 특허원 제10/622932호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/623039호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/623076호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/623065호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/622928호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/623075호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/623035

호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/622683호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/622205호 (2003년 7월 18일자); 미국 특허원 제10/622210호 (2003년 7월 18일자); 및 미국 특허원 제10/623318호 (2003년 7월 18일자)와 관련된다. 본 출원은 또한 미국 특허원11/104117호와 관련된다. 각각의 상기 특허 및 특허원의 전체 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

배 경 기 술

[0004] 상승된 TNF 수준은 병리학적 염증에서 중요한 역할을 한다. TNFα라고도 하는 TNF는 패혈증, 감염, 자가면역 질환, 이식 거부반응 및 이식편대숙주병 (graft-versus-host disease)을 포함하는 다양한 인간 질환 및 장애의 병리생리학에 관련되어 있다[참조: Moeller *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162; Moeller *et al.* 미국특허 제5,231,024호; Moeller, A. *et al.* 유럽특허 공보 제260 610 B1호; Vasilli (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411; Tracey and Cerami (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491].

[0005] 강직성 척추염(AS; Ankylosing Spondylitis)은 상승된 TNF 수준과 관련되어 있으며[참조: Lange *et al.* (2000) *Eur J Med Res.* 5(12):507], 진행성 척추 강직 및 운동성 제한을 일으키는 일반적인 염증성 류마티스 질환이다. AS는 척추 및 천장관절 (sacroiliac joint)의 만성 염증의 형태로서, 척추 내부와 주변에서 통증 및 강직을 일으킬 수 있다. 시간에 지남에 따라, 만성 척추 염증(척추염)은 척추의 완전한 시멘팅(cementing)(융합) (강직이라고 하는 과정)을 유도할 수 있고, 이는 척추의 운동성 상실로 이어질 수 있다.

[0006] AS는 주로 증상 검사, 신체 검사 및 x-레이 분석을 포함하는 방법의 조합을 사용하여 진단한다. AS 환자의 증상에는 다른 관절, 힘줄 및 기관의 염증을 동반하거나 동반하지 않는 척추 및 천골 영역의 통증 및 아침 강직(morning stiffness)이 포함될 수 있다. 하지만, AS의 초기 증상은 매우 기만적일 수 있는데, 허리의 강직 및 통증은 많은 다른 상태에서도 일어날 수 있기 때문이며, 그 결과, AS의 진단이 고려되기도 전에 시간이 지나갈 수 있다. 또한, 환자의 신체 검사에서 염증의 징후 및 감소된 관절 운동 범위가 나타날 수 있으며, 이는 종종 척추에서 특히 분명하다. 허리 및/또는 목의 유연성이 감소될 수 있다. 진단에 이르는 추가적인 증거는 척추의 x-레이 이상 또는 혈액 검사 유전자 마커인 HLA-B27 유전자의 존재에 의해 암시될 수 있다.

[0007] 구조적 손상이 AS와 관련되어 있고, 이는 관절의 연골 및 골의 분해 및 재흡수로부터 발생하여, 관절 파괴를 일으킨다. 치료학적으로, AS 환자의 증상 뿐만 아니라, 상기 질환과 관련된 관절 파괴에 의해 발생하는 구조적 손상도 해결하는 것이 중요하다.

[0008] AS의 통상적인 치료에는 비-스테로이드계 항염증 약물(NSAID)을 환자에게 투여하여 척추 및 다른 관절의 통증 및 강직을 감소시키는 것이 포함되었다. 통상적으로 사용되는 NSAID에는 인도메타신(인도신(Indocin)), 톨메틴(톨렉틴(Tolectin)), 설린닥(클리노릴(Clinoril)), 나프록센(나프로신(Naprosyn)) 및 디클로페낙(볼타렌(Voltaren))이 포함된다. 보다 최근에는, 항-TNF 생물학적 제제, 예를 들면 에타네르셉트(etanercept), 인플릭시맙(infliximab) 및 아달리무맙(adalimumab)이 AS와 관련된 증상을 감소시키는데 효과적이라는 것이 밝혀졌다.

[0009] **발명의 요약**

[0010] 항-TNF 생물학적 제제를 사용한 AS의 치료의 개선에도 불구하고, 의사가 환자의 증상을 진단하고 적당한 치료 방법을 권하는데 도움이 되는 진단 및 예후 검사가 필요하다. 또한, 환자의 질환 상태의 개선을 더 잘 평가하는 진단 및 예후 검사가 필요하며, 이는 환자에 대한 보다 우수한 진료를 제공할 뿐만 아니라, 치료 비용을 감소시킬 수 있다.

[0011] 본 발명은 특히 AS와 관련된 구조적 손상과 관련하여, 환자에서 전반적인 AS 질환 상태의 개선을 측정하는데 사용될 수 있는 바이오마커를 제공한다. 본 발명은 AS와 관련된 연골 분해 및/또는 활막염(synovitis)을 감소시키는 TNF 억제제의 효능을 측정하는 방법을 기술한다. 본 발명은 또한 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준에 따라, TNF 억제제(예: 아달리무맙)를 사용한 치료에 대한 후보인 AS 환자를 확인하는 방법을 포함한다.

[0012] 본 발명은 강직성 척추염(AS) 치료에 대한 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 측정하는 방법을 기술하며, 상기 방법은 인간 TNFα 항체를 사용한 치료 후 AS 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 사전측정된 수준을 질환 상태와 관련된 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교하고; 환자의 치료후 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이

콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, 인간 TNFα 항체를 사용하여 치료한 후 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 AS 치료에 대한 인간 TNFα 항체의 효능을 나타낸다.

[0013] 본 발명은 또한 환자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 구조적 손상의 진행을 감소시키는 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 모니터링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 측정하고, 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 AS와 관련된 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교함을 포함하며, 이때, 상기 바이오마커의 수준의 감소는 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 환자에서 AS와 관련된 구조적 손상의 진행 속도를 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타낸다.

[0014] 본 발명은 환자에서 AS 치료에 대한 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 예측하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 사용한 치료 후 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 사전측정된 수준을 AS와 관련된 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교하고; 환자의 치료후 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 환자에서 AS의 치료에 효과적일 것으로 예측된다는 것을 나타낸다.

[0015] 본 발명은 또한 강직성 척추염(AS)에 대한 인간 TNF α 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 측정하는 방법을 기술하며, 상기 방법은 AS 환자로부터 얻은 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 사전측정된 수준을 상기 환자로부터 얻은 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 치료후 수준과 비교함을 포함하며, 이때, 치료후 바이오마커 수준이 낮다는 것은 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 효능이 있다는 것을 나타낸다.

[0016] 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)이다. 다른 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)이다.

[0017] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)이다. 다른 양태에서, 활막염 바이오마커는 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)이다.

[0018] 한가지 양태에서, AS와 관련된 구조적 손상을 개선시키는 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 측정한다

[0019] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법은 환자의 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 질환 상태와 관련된 공지된 표준 CRP 수준과 비교하고;

[0020] 환자의 CRP 수준이 공지된 표준 CRP 수준보다 높은지를 평가함을 추가로 포함하며, 이때, C-반응성 단백질 수준이 공지된 표준과 비교하여 낮은 것은 치료의 효능을 나타낸다.

[0021] 한가지 양태에서, 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)에 의한 측정시, 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-8} M 이하의 K_d 및 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고 , 표준 시험관내 L929 검정에서 인간 TNFα 세포독성을 1 x 10^{-7} M 이하의 IC_{50}으로 중화시킨다.

[0022] 한가지 양태에서, 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 다음의 특징을 갖는다:

[0023] a) 표면 플라즈몬 공명에 의한 측정시, 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고;

[0024] b) 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로부터 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 1, 3, 4, 6, 7, 8 및/또는 9번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 도메인을 갖고;

[0025] c) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 서열번호 4로부터 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 및/또는 12번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 도메인을 갖는다.

[0026] 다른 양태에서, 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은, 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로부터 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하고; 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 서열번호 4로부터 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.

[0027] 본 발명의 또다른 양태에서, 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.

[0028] 또다른 양태에서, 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 아달리무맙이다.

[0029] 본 발명의 또다른 양태에서, 바이오마커의 수준은 ELISA를 사용하여 측정한다.

[0030] 본 발명은 또한 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커를 특이적으로 인식하는 검출가능한 제제; 사용 지침서; 및 임의로, 환자로부터 샘플을 분리하기 위한 시약을 포함하는, 임의의 앞서 언급된 방법의 수행을 위한 키트를 포함한다.

[0031] 한가지 양태에서, 검출가능한 제제는 뇨 CTX-II 또는 혈청 MMP3을 인식한다.

[0032] 본 발명은 또한 환자에서 AS 치료에 대한 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 TNFα 억제제를 사용한 치료 후 환자로부터의 CTX-II의 사전측정된 수준을 질환 상태와 관련된 CTX-II의 공지된 표준 수준과 비교하고; 환자의 치료후 CTX-II 수준이 CTX-II의 공지된 표준 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, 환자로부터의 CTX-II 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS의 치료에 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0033] 본 발명은 환자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 구조적 손상을 감소시키는 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 TNFα 억제제를 사용한 치료 후 AS 환자로부터의 CTX-II의 사전측정된 수준을 질환 상태와 관련된 CTX-II의 공지된 표준 수준과 비교하고; 환자의 치료후 CTX-II 수준이 CTX-II의 공지된 표준 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, TNFα 억제제를 사용한 치료 후 환자로부터의 CTX-II 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS와 관련된 구조적 손상을 감소시키는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0034] 본 발명은 또한 환자에서 AS 치료에 대한 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자로부터 얻은 CTX-II의 사전측정된 치료후 수준을 환자로부터 얻은 CTX-II의 사전측정된 치료전 수준과 비교하고; 치료후 CTX-II 수준이 치료전 CTX-II 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, 환자로부터의 치료후 CTX-II 수준이 치료전 CTX-II 수준과 비교하여 낮다는 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS의 치료에 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0035] 한가지 양태에서, 치료후 CTX-II 수준은 치료전 CTX-II 수준과 비교하여 약 5 내지 10% 이상 감소된다. 다른 양태에서, 치료후 CTX-II 수준은 치료전 CTX-II 수준과 비교하여 약 9% 이상 감소된다. 다른 양태에서, 치료후 CTX-II 수준은 기저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 적어도 약 5 내지 100%, 약 5 내지 80%, 약 5 내지 60%, 약 5 내지 45%, 약 5 내지 40%, 약 5 내지 35%, 약 5 내지 30%, 약 5 내지 25%, 약 5 내지 20%, 약 5 내지 15%, 약 5 내지 10%, 약 6 내지 9%, 약 7 내지 8% 또는 약 9% 이다.

[0036] 한가지 양태에서, 치료후 MMP-3 수준은 AS 피험자에 대한 기저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 적어도 약 5 내지 50%, 약 5 내지 45%, 약 5 내지 40%, 약 5 내지 35%, 약 5 내지 30%, 약 5 내지 25%, 약 5 내지 20%, 약 5 내지 15%, 약 5 내지 13%, 약 6 내지 12%, 약 7 내지 11% 또는 약 8% 이다. 추가적인 양태에서, TNF 억제제의 효능은, MMP-3 수준이 AS 피험자에 대한 기저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 약 12% 이상 감소하는 경우 보여진다.

[0037] 한가지 양태에서, CTX-II는 뇨 CTX-II이다. 한가지 양태에서, MMP-3은 혈청 MMP-3이다.

[0038] 한가지 양태에서, CTX-II 수준 또는 MMP-3 수준을 ELISA를 사용하여 측정한다.

[0039] 본 발명은 또한 AS 환자가 아달리무맙을 사용하는 치료에 대한 후보인지 결정하는 방법을 기술하며, 상기 방법은 상기 환자의 콜라겐 분해 바이오마커 수준을 영향을 받지 않은 피험자로부터의 공지된 표준 콜라겐 분해 바이오마커 수준과 비교하고; 환자의 콜라겐 분해 바이오마커 수준이 공지된 표준 콜라겐 분해 바이오마커 수준보다 높은지를 평가함을 포함하며, 이때, 바이오마커 수준이 높다는 것은 상기 환자가 아달리무맙을 사용하는 치

료에 대한 후보라는 것을 나타낸다.

[0040] 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드이다. 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커의 수준은 환자의 뇨액 중의 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드의 농도를 측정하여 결정한다.

[0041] 한가지 양태에서, 본 발명은 상기 환자의 활막염 바이오마커 수준을 영향을 받지 않은 피험자로부터의 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준과 비교하고; 환자의 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준과 비교하여 높은지를 평가함을 추가로 포함하며, 이때, 환자의 활막염 바이오마커 수준이 높다는 것은 환자가 아달리무맙을 사용하는 치료에 대한 후보라는 것을 나타낸다.

[0042] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)이다.

[0043] 본 발명은 AS 환자가 아달리무맙을 사용하는 치료에 대한 후보인지 결정하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 상기 환자의 활막염 바이오마커 수준을 영향을 받지 않은 피험자로부터의 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준과 비교하고; 환자의 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준과 비교하여 높은지를 평가함을 포함하며, 이때, 활막염 바이오마커 수준이 높다는 것은 상기 환자가 아달리무맙을 사용하는 치료에 대한 후보라는 것을 나타낸다.

[0044] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)이다.

[0045] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커의 수준은 환자의 MMP3의 혈청 농도를 측정하여 결정한다.

[0046] 한가지 양태에서, 본 발명은 상기 환자의 콜라겐 분해 바이오마커 수준을 영향을 받지 않은 피험자로부터의 공지된 표준 콜라겐 분해 바이오마커 수준과 비교하고; 환자의 콜라겐 분해 바이오마커 수준이 공지된 표준 콜라겐 분해 바이오마커 수준과 비교하여 높은지를 평가함을 추가로 포함하며, 이때, 환자의 콜라겐 분해 바이오마커 수준이 높다는 것은 환자가 아달리무맙을 사용하는 치료에 대한 후보라는 것을 나타낸다.

[0047] 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드이다.

[0048] 본 발명은 강직성 척추염(AS)에 대한 치료의 효능을 모니터링하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 피험자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 측정함을 포함하고, 이때, 바이오마커의 수준의 감소 또는 변화는 AS에서 구조적 손상의 진행 속도의 감소 또는 변화를 나타낸다.

[0049] 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드이다.

[0050] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)이다.

[0051] 한가지 양태에서, 치료는 아달리무맙의 투여이다.

[0052] 본 발명은 또한 AS 환자에서 구조적 손상을 측정하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 환자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 기저선 수준을 측정하여 상기 환자의 기저선 바이오마커 수준을 얻고; 일정 시간 후 상기 환자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 측정하여 상기 환자의 기저선후 바이오마커 수준을 얻고; 상기 환자의 기저선 바이오마커 수준을 기저선후 바이오마커 수준과 비교하고; 환자의 기저선후 바이오마커 수준이 환자의 기저선 바이오마커 수준보다 낮은지를 평가함을 포함하며, 이때, 기저선후 바이오마커 수준이 낮은 것은 구조적 손상의 감소를 나타낸다.

[0053] 본 발명은 AS 환자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커를 조절하는 방법을 추가로 포함하며, 상기 방법은 아달리무맙을 상기 환자에게 투여함을 포함한다.

[0054] 한가지 양태에서, TNFα 억제제는 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분, TNF 융합 단백질 또는 재조합 TNF 결합 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0055] 한가지 양태에서, TNF 융합 단백질은 에타네르셉트이다.

[0056] 한가지 양태에서, TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 키메릭(chimeric) 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 및 다가 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0057] 한가지 양태에서, 항-TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인플릭시맙, 골리무맙 및 아달리무맙으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0058] 한가지 양태에서, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분은, 표면 플라즈몬 공명에 의한 측정시, 인간 TNFα로부

터 1 x 10^{-8} M 이하의 K_d 및 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고, 표준 시험관내 L929 검정에서 인간 TNFα 세포독성을 1 x 10^{-7} M 이하의 IC_{50}으로 중화시킨다.

[0059] 한가지 양태에서, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 다음의 특징을 갖는다:

[0060] a) 표면 플라즈몬 공명에 의한 측정시, 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고;

[0061] b) 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로부터 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 1, 3, 4, 6, 7, 8 및/또는 9번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 도메인을 갖고;

[0062] c) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 서열번호 4로부터 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 및/또는 12번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 도메인을 갖는다.

[0063] 한가지 양태에서, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.

[0064] 한가지 양태에서, 본 발명은 환자로부터 얻은 활막염 바이오마커의 사전측정된 치료후 수준을 AS와 관련된 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교하고; 치료후 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준보다 낮은지를 평가함을 추가로 포함하며, 이때, 치료후 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 활막염 바이오마커 수준과 비교하여 낮다는 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS의 치료에 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0065] 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 MMP-3이다.

[0066] 본 발명은 또한 CTX-II를 특이적으로 인식하는 검출가능한 제제; 사용 지침서; 및 임의로, 환자로부터 샘플을 분리하기 위한 시약을 포함하는, 상기한 방법의 수행을 위한 키트를 기술한다. 한가지 양태에서, 키트는 MMP-3을 특이적으로 인식하는 검출가능한 제제를 추가로 포함한다.

발명의 상세한 설명

[0071] **I. 정의**

[0072] 본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다.

[0073] 본원에서 사용되는 "바이오마커"라는 용어는 일반적으로 분자, 즉 유전자 (또는 상기 유전자를 암호화하는 핵산), 단백질, 탄수화물 구조물 또는 당지질로서, 포유동물 조직 또는 세포로부터 유래된 샘플에서의 또는 샘플상에서의 이의 발현을 당업계의 표준 방법 (뿐만 아니라 본원에서 공개된 방법)으로 검출하여, 샘플을 채취한 피험자의 상태를 예측하거나 보여줄 수 있는 것이다. 바이오마커가 단백질인 경우, 발현의 조절 또는 변화에는 상이한 해독후 변형을 통한 조절이 포함된다. 바이오마커를 사용하여, 바이오마커의 수준에 따라 상태의 개선 및 상태의 악화를 포함하는 질환 활성을 구별할 수 있다. 따라서, 한가지 양태에서, 본 발명에서 유용한 바이오마커는, 질환 상태, 예를 들면 척추관절병증(spondyloarthropathy)이 있는 환자에서 정상 대조군, 즉 영향을 받지 않은 피험자와 비교하여, 발현이 조절(상향조절 또는 하향조절)되는 임의의 분자이다. 한가지 양태에서, 본 발명의 1, 2, 3개 이상의 바이오마커의 선택된 집합은, 항-TNF 치료에 대한 환자의 반응을 측정하는 종점으로서 사용되어 신속한 진단 또는 예후진단을 할 수 있다.

[0074] "콜라겐 분해 바이오마커"라는 용어는 콜라겐의 파괴와 관련되어 있는, 분자, 즉 유전자 (또는 상기 유전자를 암호화하는 핵산), 단백질, 탄수화물 구조물 또는 당지질을 말한다. 콜라겐 분해 바이오마커를 사용하여, 샘플 또는 조직을 채취한 피험자에서 질환 활성, 즉 콜라겐 파괴를 구별한다. 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 콜라겐의 단편, 예를 들면 제2형 콜라겐의 단편이다. 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)이다.

[0075] "활막염 바이오마커"라는 용어는 활막염 또는 활막의 염증과 관련되어 있는, 분자, 즉 유전자 (또는 상기 유전자를 암호화하는 핵산), 단백질, 탄수화물 구조물 또는 당지질을 말한다. 활막염 바이오마커를 사용하여, 환자의 활액 또는 활액 콜라겐의 전환(turn-over), 증식, 분해, 염증, 파괴, 붕괴, 병리학적 리모델링 또는 분해의

증가를 보일 수 있다. 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 세포외기질(ECM) 분해와 관련된 엔도펩티다제, 예를 들면 매트릭스 메탈로프로테이나제이다. 한가지 양태에서, 본 발명에서 사용되는 활막염 바이오마커는 MMP-3이다.

[0076] "공지된 표준 수준" 또는 "대조군 수준"이라는 용어는 환자의 샘플로부터 유래된 바이오마커 수준을 비교하는데 사용되는 인정되거나 사전측정된 바이오마커의 수준을 말한다. 한가지 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준은, 피험자 또는 AS 피험자를 기준으로 하고, 따라서, 질환 상태를 나타낸다. 다른 양태에서, 바이오마커의 공지된 표준 수준은 AS가 없는 피험자의 영향을 받지 않은, 즉 무질환 상태를 보여준다.

[0077] 특정 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교하는 경우, 공지된 표준 수준으로부터의 편차는 일반적으로 질환 상태의 개선 또는 악화를 보여준다. 또한, 특정 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교하는 경우, 공지된 표준 수준과 동등함은 일반적으로 질환 활성의 확인, 무질환 상태의 확인을 보여주거나, 환자의 바이오마커 수준이 질환에 대한 치료 후 얻어진 경우, 환자의 질환 상태를 개선하기 위한 치료의 실패를 보여준다.

[0078] 본원에서 사용되는 "발현"이라는 용어는, 본 발명의 바이오마커의 발현을 검출하는 것과 관련하여 사용되는 경우, 큰 단백질의 대사작용 (예: 제2형 콜라겐이 분해되어 CTX-II 단편이 생성됨)으로부터 생성된 바이오마커 단백질을 암호화하는 유전자의 전사를 검출하는 것, 바이오마커 단백질의 해독을 검출하는 것 및/또는 바이오마커 단백질을 검출하는 것을 말할 수 있다. 바이오마커의 발현을 검출하는 것은, 바이오마커가 발현되는지 능동적으로 측정하는 행위를 말한다. 발현을 정량하는 것은 주어진 바이오마커의 수준 (예: ng/ml)을 측정하는 행위를 말한다. 발현의 검출 및/또는 정량에는, 바이오마커 발현이 공지된 표준 수준과 비교하여 상향조절되는지, 공지된 표준 수준과 비교하여 하향조절되는지, 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 실질적으로 변화되지 않는지 측정하는 것이 포함될 수 있다. 그러므로, 발현을 정량하고/하거나 검출하는 단계는, 바이오마커의 발현이 실제로 상향조절되거나 하향조절되는 것이 필요하지 않으며, 오히려 바이오마커의 발현이 검출되지 않는 것, 또는 바이오마커의 발현이 변하지 않았거나 상이하지 않다는 것 (즉, 대조군과 비교하여 바이오마커의 유의적인 발현 또는 바이오마커의 발현의 유의적인 변화가 검출되지 않는 것)이 포함될 수도 있다.

[0079] 본원에서 사용되는 "수준" 또는 "양"이라는 용어는 바이오마커의 측정가능한 양을 말한다. 양은 (a) 단위 용적 또는 세포 당 분자, 몰 또는 중량으로 측정되는 절대량 또는 (b) 예를 들면, 농도측정 분석으로 측정되는, 상대량일 수 있다. 바람직한 양태에서, 바이오마커의 RNA 및/또는 단백질의 수준을 측정한다.

[0080] 본원에서 사용되는 "피험자" 또는 "환자"라는 용어는 인간 또는 비-인간 동물을 말한다.

[0081] 본원에서 사용되는 "샘플"이라는 용어는 피험자로부터 채취한 유사한 세포 또는 조직의 집합을 말한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 생, 냉동 및/또는 보존된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 성분; 또는 체액, 예를 들면 혈액, 혈청, 혈장, 뇨, 타액, 땀 또는 활액일 수 있다. 한가지 양태에서, 활막염 바이오마커는 혈청 샘플로부터 얻는다. 한가지 양태에서, 연골 분해 바이오마커는 뇨 샘플로부터 얻는다.

[0082] 본원에서 사용되는 "인간 TNFα"(본원에서 hTNFα, 또는 간단하게 hTNF라고 약칭함)라는 용어는, 17kD의 분비되는 형태 및 26kD의 막-결합된 형태로 존재하면서, 이의 생물학적 활성 형태는 비공유적으로 결합된 17kD의 분자의 3량체로 구성되는 인간 사이토카인을 말한다. hTNFα의 구조는, 예를 들면, 문헌[참조: Pennica, D., *et al.* (1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J.M., *et al.* (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326; 및 Jones, E.Y., *et al.* (1989) *Nature* 338:225-228]에 추가로 기술되어 있다. 인간 TNFα라는 용어는 재조합 인간 TNFα (rhTNFα)를 포함하는 의미이며, 이는 표준 재조합 발현 방법으로 제조하거나 상업적으로 구입할 수 있다 (R & D Systems, 카탈로그 번호 210-TA, Minneapolis, MN). TNFα는 TNF라고도 한다.

[0083] "TNFα 억제제"라는 용어는 TNFα 활성을 방해하는 제제를 포함한다. 상기 용어는 또한 본원에서 기술된 각각의 항-TNFα 인간 항체 및 항체 부분 뿐만 아니라, 미국특허 제6,090,382호; 제6,258,562호; 제6,509,015호 및 미국 특허원 제09/801185호 및 제10/302356호에 기술된 것도 포함한다. 한가지 양태에서, 본 발명에서 사용되는 TNFα 억제제는 항-TNFα 항체 또는 이의 단편, 예를 들면 인플릭시맙 (레미케이드(Remicade)®, 판매원: Johnson and Johnson; 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제5,656,272호에 기술되어 있음), CDP571 (인간화된 모노클로날 항-TNF-알파 IgG4 항체), CDP 870 (인간화된 모노클로날 항-TNF-알파 항체 단편), 항-TNF dAb [판매원: Peptech], CNTO 148 (골리무맙; 판매원: Medarex and Centocor, 국제공개공보 제WO 02/12502호 참조), 및 아달리무맙 (휴미라(Humira)®, 판매원: Abbott Laboratories, 인간 항-TNF mAb, 미국특허 제6,090,382호에

D2E7로 기술되어 있음)이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 추가적인 TNF 항체는 각각 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제6,593,458호; 제6,498,237호; 제6,451,983호 및 제6,448,380호에 기술되어 있다. 다른 양태에서, TNFα 억제제는 TNF 융합 단백질, 예를 들면, 에타네르셉트 (엔브렐(Enbrel)®, 판매원: Amgen; 본원에 참조로서 인용된 국제공개공보 제WO 91/03553호 및 제WO 09/406476호에 기술되어 있음)이다. 다른 양태에서, TNFα 억제제는 재조합 TNF 결합 단백질 (r-TBP-I) [판매원: Serono]이다.

[0084] 본원에서 사용되는 "항체"라는 용어는 이황화결합에 의해 서로 연결된 4개의 폴리펩티드 쇄 (2개의 중쇄 (H 쇄) 및 2개의 경쇄 (L 쇄))를 포함하는 면역글로불린 분자를 말한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(CL)을 포함한다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR; Complementarity Determining Region)이라고 하는 과변이(hypervariability) 영역으로 추가로 세분될 수 있으며, 이들 영역 사이에 골격 영역 (FR; Framework Region)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재한다. 각각의 VH 및 VL은 다음의 순서대로 아미노 말단에서 카복시 말단까지 배열되어 있는 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명의 항체는 각각 전문이 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제6,090,382호; 제6,258,562호 및 제6,509,015호에 추가로 상세히 기술되어 있다.

[0085] 본원에서 사용되는 항체의 "항원 결합 부분" (또는 간단하게 "항체 부분")이라는 용어는 항원(예: hTNFα)에 특이적으로 결합하는 활성을 유지하는 하나 이상의 항체의 단편을 말한다. 항체의 항원 결합 기능이 전체 길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지(hinge) 영역에서 이황화결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 [참조: Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인 (VL 및 VH)은 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 이들을 재조합 방법을 사용하여 합성 링커(linker)로 연결하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일 쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성하는 단일 단백질 쇄를 만들 수 있다[참조: Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]. 이러한 단일 쇄 항체도 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어에 포함되도록 의도된다. 디아바디(diabody)와 같은 다른 형태의 단일 쇄 항체도 포함된다. 디아바디는 2가, 이중특이적(bispecific) 항체로서, VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄 상에 발현되지만, 링커가 짧아 동일한 쇄 상의 2개의 도메인이 쌍을 형성할 수 없어, 도메인이 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원 결합 부위가 생성되는 항체이다[참조: Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123]. 본 발명의 항체 부분은 각각 전문이 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제6,090,382호, 제6,258,562호, 제6,509,015호에 추가로 상세히 기술되어 있다.

[0086] 결합 단편은 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성된다. 결합 단편에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv, 단일 쇄 및 단일쇄 항체가 포함된다. "이중특이적" 또는 "2기능성(bifunctional)" 면역글로불린 또는 항체 외에도, 면역글로불린 또는 항체는 동일한 각각의 결합 부위를 갖는 것으로 이해된다. "이중특이적" 또는 "2기능성 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체는 하이브리도마(hybridoma)의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다[참조: Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)].

[0087] 본원에서 사용되는 "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환하는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 염기성 측쇄 (예: 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예: 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않은 극성 측쇄 (예: 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄 (예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여 당업계에서 정의되었다.

[0088] "키메릭 항체"는 중쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 하나의 부분이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 계열에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 상동이면서, 쇄의 나머지 단편은 다른 종으로부터의 상응하는 서열과 상동인 항체를 말한다. 한가지 양태에서, 본 발명은 경쇄 및 중쇄의 가변 영역이 하나의 포유동물 종으로부터 유

래된 항체의 가변 영역을 모방하면서, 불변 영역은 다른 종으로부터 유래된 항체 내의 서열과 상동인, 키메릭 항체 또는 항원 결합 단편을 특징으로 한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 키메릭 항체는 마우스 항체로부터의 CDR을 인간 항체의 골격 영역에 이식하여 제조된다.

[0089] "인간화된 항체"는 실질적으로 인간 항체 쇄 (수용체 면역글로불린 또는 항체라고 함)로부터의 가변 영역 골격 잔기를 포함하는 하나 이상의 쇄 및 실질적으로 비-인간 (예: 마우스) 항체로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체를 말한다. CDR의 이식 외에도, 인간화된 항체는 통상적으로 추가로 변형시켜 친화도 및/또는 면역원성을 향상시킨다.

[0090] "다가 항체"라는 용어는 하나 이상의 항원 인식 부위를 포함하는 항체를 말한다. 예를 들면, "2가" 항체는 2개의 항원 인식 부위를 갖고, "4가" 항체는 4개의 항원 인식 부위를 갖는다. "단일특이적", "이중특이적", "삼중특이적", "사중특이적" 등의 용어는 다가 항체에 존재하는 상이한 항원 인식 부위 특이성의 수를 말한다 (항원 인식 부위의 수와 대조됨). 예를 들면, "단일특이적" 항체의 항원 인식 부위는 모두 동일한 에피토프(epitope)에 결합한다. "이중특이적" 또는 "2 특이적" 항체는 제1 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항원 인식 부위 및 제1 에피토프와 상이한 제2 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항원 인식 부위를 갖는다. "다가 단일특이적" 항체는 모두 동일한 에피토프에 결합하는 다수의 항원 인식 부위를 갖는다. "다가 이중특이적" 항체는 몇몇은 제1 에피토프에 결합하고 몇몇은 제1 에피토프와 상이한 제2 에피토프에 결합하는 다수의 항원 인식 부위를 갖는다.

[0091] 본원에서 사용되는 "인간 항체"라는 용어는 인간 생식계열(germline) 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 의미이다. 본 발명의 인간 항체는, 예를 들면 CDR에, 특히 CDR3에, 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기 (예: 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 도입되거나 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 하지만, 본원에서 사용되는 "인간 항체"라는 용어는 다른 포유동물 종 (예: 마우스)의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 골격 서열에 이식된 항체를 포함하는 의미는 아니다.

[0092] 본원에서 사용되는 "재조합 인간 항체"라는 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 모든 인간 항체, 예를 들면, 숙주 세포 속으로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체 (아래에서 추가로 기술됨), 재조합, 조합(combinatorial) 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체 (아래에서 추가로 기술됨), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자전이된(transgenic) 동물(예: 마우스)로부터 분리된 항체 [참조: Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287], 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱(splicing)을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 항체를 포함하는 의미이다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 하지만, 특정 양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발되어 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 유전자전이된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발되어), 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열이, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되어 있지만, 인간 항체 생식계열 레퍼토리(repertoire) 내에 생체내에서 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이 된다.

[0093] 이러한 키메릭, 인간화된, 인간 및 이중 특이적 항체는 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해, 예를 들면, 문헌[참조: PCT 국제 출원 제PCT/US86/02269호; 유럽 특허원 제184,187호; 유럽 특허원 제171,496호; 유럽 특허원 제173,494호; PCT 국제공개공보 제WO 86/01533호; 미국특허 제4,816,567호; 유럽 특허원 제125,023호; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559); Morrison (1985) *Science* 229:1202- 1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; 미국특허 제5,225,539호; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 및 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989), 미국특허 제5,530,101호, 미국특허 제5,585,089호, 미국특허 제5,693,761호, 미국특허 제5,693,762호, Selick *et al.*, WO 90/07861, 및 Winter, 미국특허 제5,225,539호]에 기술된 방법을 사용하여 생산할 수 있다.

[0094] 본원에서 사용되는 "분리된 항체"라는 용어는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 말한다 (예: hTNFα에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 hTNFα 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 하지만, hTNFα에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 TNFα 분자와 같

은 다른 항원에 대한 교차반응성을 가질 수 있다 (아래에서 보다 상세히 논의됨). 또한, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0095] 본원에서 사용되는 "중화 항체" (또는 "hTNFα 활성을 중화시키는 항체)는 hTNFα에 결합하면 hTNFα의 생물학적 활성이 억제되는 항체를 말한다. 이러한 hTNFα의 생물학적 활성의 억제는 hTNFα-유도된 (시험관내 또는 생체내) 세포독성, hTNFα-유도된 세포 활성화 및 hTNFα 수용체에 대한 hTNFα 결합과 같은 hTNFα 생물학적 활성의 하나 이상의 지표를 측정하여 평가할 수 있다. 이러한 hTNFα 생물학적 활성의 지표는 당업계에 공지된 하나 이상의 다수의 표준 시험관내 또는 생체내 검정으로 평가할 수 있다 [참조: 미국특허 제6,090,382호]. 바람직하게는, hTNFα 활성을 중화시키는 항체의 능력은 L929 세포의 hTNFα-유도된 세포독성의 억제에 의해 평가한다. hTNFα 활성의 추가적인 또는 대안적 변수로서, HUVEC에서 ELAM-1의 hTNFα-유도된 발현을 억제하는 항체의 능력을 hTNFα-유도된 세포 활성화의 측정으로서 평가할 수 있다.

[0096] 본원에서 사용되는 "표면 플라즈몬 공명"이라는 용어는, 예를 들면 BIAcore 시스템[판매원: Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ]을 사용하여, 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도 변화의 검출에 의해 실시간 생특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학적 현상을 말한다. 추가적인 기술의 경우, 미국특허 제6,258,562호의 실시예 1 및 문헌[참고: Jonsson *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19; Jonsson *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125; 및 Johnnson *et al.* (1991) *Anal.Biochem.*198:268]을 참조한다.

[0097] 본원에서 사용되는 "K_{off}"라는 용어는 항체/항원 복합체로부터의 항체의 해리에 대한 오프 속도(off rate) 상수를 말한다.

[0098] 본원에서 사용되는 "K_d"라는 용어는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 말한다.

[0099] 본원에서 사용되는 "IC_{50}"이라는 용어는 관심대상의 생물학적 종점을 억제하는데 필요한, 예를 들면 세포독성 활성을 중화시키는데 필요한 억제제의 농도를 말한다.

[0100] 본원에서 사용되는 "핵산 분자"라는 용어는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 의미이다. 핵산 분자는 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있지만, 바람직하게는 이본쇄 DNA이다.

[0101] hTNFα에 결합하는 항체 또는 항체 부분 (예: VH, VL, CDR3)을 암호화하는 핵산과 관련하여 본원에서 사용되는 "분리된 핵산 분자"라는 용어는, 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 hTNFα 이외의 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 다른 뉴클레오티드 서열이 없는 핵산 분자를 말하고, 이때 다른 서열은 인간 게놈 DNA의 핵산과 본래 플랭킹(flanking)할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 항-hTNFα 항체의 VH 영역을 암호화하는 본 발명의 분리된 핵산은 hTNFα 이외의 항원에 결합하는 다른 VH 영역을 암호화하는 다른 서열을 함유하지 않는다.

[0102] 본원에서 사용되는 "벡터"라는 용어는 이와 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터의 한가지 종류로는 "플라스미드"가 있고, 이는 이 속에 추가적인 DNA 단편이 연결될 수 있는 원형의 이본쇄 DNA 루프(loop)를 말한다. 다른 종류의 벡터로는 바이러스 벡터가 있고, 이때 추가적인 DNA 단편이 바이러스 게놈 속으로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 벡터가 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다 (예: 세균의 복제 오리진을 갖는 세균 벡터 및 에피좀 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예: 비-에피좀 포유동물 벡터)는 숙주 세포 속으로 도입시 숙주 세포의 게놈 속으로 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터는 이와 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단하게, "발현 벡터")라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터의 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 하지만, 본 발명은 동등한 기능을 하는 바이러스 벡터 (예: 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 이러한 다른 형태의 발현 벡터를 포함한다.

[0103] 본원에서 사용되는 "재조합 숙주 세포" (또는 간단하게 "숙주 세포")라는 용어는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 말한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포 뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손도 말한다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정한 변형이 일어날 수 있으므로, 이러한 자손은, 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 "숙주 세포"라는 용어의 범위 내에 포함된다.

[0104] 본원에서 사용되는 "용량"이라는 용어는 피험자에게 투여되는 TNFα 억제제의 양을 말한다.

[0105] "다중-가변 용량"이라는 용어는 치료를 위하여 피험자에게 투여되는 TNFα 억제제의 상이한 용량을 포함한다. "다중-가변 용량 방법" 또는 "다중-가변 용량 치료법"은 상이한 양의 TNFα 억제제를 치료 과정 전체에 걸쳐 다양한 시점에 투여하는 것을 기본으로 하는 치료 스케줄을 기술한다. 다중-가변 용량 방법은 PCT 출원 제 PCT/US05/12007호에 기술되어 있다.

[0106] 본원에서 사용되는 "투여"라는 용어는 치료 목적 (예: 류마티스 관절염의 치료)을 달성하기 위한 물질 (예: 항-TNFα 항체)의 투여를 말한다.

[0107] 본원에서 사용되는 "격주 투여 방법", "격주 투여" 및 "격주 투약"이라는 용어는 치료 목적을 달성하기 위하여 피험자에게 물질 (예: 항-TNFα 항체)을 투여하는 시간 경과를 말한다. 격주 투여 방법에는 매주 투여 방법이 포함되지 않는다. 바람직하게는, 물질을 9 내지 19일 마다, 보다 바람직하게는, 11 내지 17일 마다, 보다 바람직하게는, 13 내지 15일 마다, 그리고 보다 바람직하게는, 14일 마다 투여한다.

[0108] "제1 제제와 제2 제제의 병용"이라는 어구에서와 같은 "병용"이라는 용어는 제1 제제 및 제2 제제의 공동투여를 포함하고, 이는 예를 들면, 동일한 약제학적으로 허용되는 담체 중에 용해 또는 혼합하거나, 제1 제제를 투여하고 나서 제2 제제를 투여하거나, 제2 제제를 투여하고 나서 제1 제제를 투여하는 것일 수 있다. 그러므로, 본 발명은 병용 치료 방법 및 병용 치료학적 조성물을 포함한다.

[0109] "동시 치료"라는 어구에서와 같은 "동시"라는 용어는 제2 제제의 존재 하에서 제제를 투여하는 것을 포함한다. 동시 치료 방법에는 제1, 제2, 제3 또는 추가적인 제제를 공동투여하는 방법이 포함된다. 동시 치료 방법에는 또한 제1 또는 추가적인 제제를 제2 또는 추가적인 제제의 존재 하에서 투여하는 방법이 포함되고, 이때 제2 또는 추가적인 제제는, 예를 들면, 이전에 투여되었을 수 있다. 동시 치료 방법은 상이한 행위자에 의해 순차적으로 수행될 수 있다. 예를 들면, 한 행위자는 피험자에게 제1 제제를 투여할 수 있고, 제2 행위자는 피험자에게 제2 제제를 투여할 수 있으며, 제1 제제 (및 추가적인 제제)가 제2 제제 (및 추가적인 제제)의 존재 하에서 후 투여인 한, 투여 단계는 동시에, 또는 거의 동시에, 또는 상이한 시간에 수행될 수 있다. 행위자 및 피험자는 동일한 실체(예: 인간)일 수 있다.

[0110] 본원에서 사용되는 "병용 치료법"이라는 용어는 2개 이상의 치료학적 물질, 예를 들면, 항-TNFα 항체 및 다른 약물의 투여를 말한다. 다른 약물(들)은 항-TNFα 항체의 투여와 동시에, 투여 전, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0111] 본원에서 사용되는 "키트"라는 용어는 TNFα-관련 장애의 치료를 위한 본 발명의 TNFα 항체를 투여하는데 사용되는 구성요소를 포함하는 포장된 제품을 말한다. 키트는 바람직하게는 키트의 구성요소를 담는 박스 또는 용기를 포함한다. 박스 또는 용기에는 라벨 또는 FDA(Food and Drug Administration) 승인 프로토콜이 첨부되어 있다. 박스 또는 용기에는 바람직하게는 플라스틱, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 에틸렌 또는 프로필렌 용기에 함유된 본 발명의 구성요소가 들어있다. 용기는 뚜껑이 있는 관 또는 병일 수 있다. 키트는 또한 본 발명의 TNFα 항체의 투여 지침서를 포함할 수 있다. 한가지 양태에서, 본 발명의 키트는 PCT/IB03/04505 및 미국 특허원 제10/222,140호에 기술된 인간 항체 D2E7을 포함하는 제형을 포함한다.

[0112] 본 발명의 다양한 양상이 본원에서 보다 상세히 기술된다.

[0113] **II. 연골 분해 및 척추염 바이오마커**

[0114] TNF 억제제 치료법을 받고 있는 AS 환자에서, 개선, 특히 초기 구조적 개선을 측정할 수 있는 강직성 척추염(AS)에 대한 의미있는 평가 도구를 확립해야 할 필요성이 존재한다. 현재는, 적혈구 침강 속도(ESR) 및 C-반응성 단백질(CRP)의 수준이 AS 활성을 평가하기 위하여 가장 광범위하게 사용되는 방법이지만, 이러한 마커만으로는 AS 질환 활성을 평가하는데 불충분하다[참조: Ruof and Stucki (1999) *J Rheumatol* 26:966]. 본 발명은 환자에서 AS와 관련된 구조적 손상을 예방하는 항-TNF 치료법의 능력을 평가하는데 유용한 것으로 확인된 바이오마커를 제공한다. 또한, 본 발명은 AS와 관련된 관절의 구조적 파괴의 개선에 대한 환자의 반응을 측정하는 방법을 제공한다. 본원에서 기술된 방법은, 방사선촬영과 같은 보다 통상적인 수단을 사용하여 쉽게 식별되지 않을 수 있는 환자에서의 구조적 손상의 진행의 변화를 확인한다. 본 발명의 방법은, 장시간이 걸릴 수 있는 임상적 결과를 기다릴 필요없이 환자에서 항-TNF 치료의 효능을 측정하는 수단을 의사에게 제공하므로 유리하다.

[0115] 일반적으로, 본 발명은 AS 환자 또는 AS가 있는 것으로 의심되는 환자로부터의 바이오마커 수준을 질환 활성과 관련된 공지된 표준 수준과 비교하여, 환자의 바이오마커 수준이 대조군과 비교하여 증가하거나, 감소하거나,

동일한지 측정함을 포함한다. 환자에서 AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정함에 있어서, 특히 구조적 손상을 개선하는 것과 관련하여, 바이오마커 수준은 사전측정될 수 있고, 또는 대안으로, 환자로부터 샘플을 채취하고 나서 본 발명의 비교 평가에서 샘플로부터 측정된 바이오마커 수준을 사용함을 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명은 연골 분해 및 활막염을 포함하는 구조적 파괴와 관련된 특정 바이오마커를 확인하며, 이를 사용하여, 선택된 항-TNF 치료법이 치료에 적당한지 또는 상이한 항-TNF 치료법을 포함하는 상이한 치료법을 고려해야 하는지 결정할 수 있다. 이러한 예측 수단은, 신속한 반응이 일어나서 적당한 치료법을 결정할 수 있으므로, 피험자의 전반적인 건강상태에 이롭다. 본원에서 기술된 방법은 또한 효과가 없는 치료법을 보다 빠르게 제거시켜 치료 과정의 전체 비용을 감소시킨다.

[0117] 본 발명은 연골 파괴 및 활막염에 대한 바이오마커를 측정함을 포함하여, 척추관절병증 (예: 강직성 척추염) 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공한다. 효능은, 피험자에서 연골 분해 및/또는 활막염과 관련된 질환 활성을 반영하는 것으로 공지된 바이오마커를 감소시키는 TNF 억제제의 능력에 따라 측정된다.

[0118] 한가지 양태에서, 본 발명은 강직성 척추염(AS) 치료에 대한 TNFα 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 측정하는 방법을 포함하며, 이때 TNFα 억제제를 사용한 치료 후 AS 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 사전측정된 수준 (치료후 바이오마커 수준)을 질환 상태와 관련된 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교한다. 일단 두 수준을 비교하면, 환자의 치료후 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 수준보다 낮은지 측정되고, 이때 TNFα 억제제를 사용한 치료 후 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 AS 치료에 대해 TNFα 억제제가 효능이 있다는 것을 나타낸다.

[0119] 다른 양태에서, 본 발명은 강직성 척추염(AS)에 대한 TNF 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 AS 환자로부터 얻은 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 치료전 수준을 상기 환자로부터 얻은 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 치료후 수준과 비교함을 포함하고, 이때, 치료후 바이오마커 수준이 낮다는 것은 환자에서 AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 나타낸다.

[0120] 연골 분해 및/또는 활막염과 관련된 바이오마커의 수준을 감소시킴으로써, TNF 억제제를 사용하여 AS와 관련된 구조적 손상을 감소시키거나 예방할 수 있다. 한가지 양상에서, 본 발명은 환자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 구조적 손상의 진행을 감소시키는 TNF 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 모니터링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 환자에서 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 측정하고 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 AS와 관련된 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교함을 포함한다. 이러한 예에서, 공지된 표준 수준과 비교하여 환자로부터의 바이오마커의 수준의 감소는 TNF 억제제가 환자에서 AS와 관련된 구조적 손상의 진행 속도를 감소시키는데 효능이 있다는 것을 나타낸다.

[0121] 다른 양상에서, 본 발명은 환자에서 AS 치료에 대한 TNF 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 예측하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 사용한 치료 후 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 사전측정된 수준을 AS 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준과 비교함을 포함한다. 2개의 바이오마커 수준에 따라, 환자의 치료후 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커의 공지된 표준 수준보다 낮은지에 관하여 평가한다. 이러한 예에서, 환자로부터의 콜라겐 분해 바이오마커 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮다는 것은 인간 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 환자에서 AS의 치료에 효과적일 것으로 예측된다는 것을 나타낸다.

[0122] TNF 억제제가 구조적 파괴, 즉 관절 파괴의 감소를 반영하는 연골 파괴 및/또는 활막염과 관련된 바이오마커를 감소시키는데 효과적인 것으로 결정되는 상기 경우에서, TNF 억제제 치료의 지속이 고려될 수 있다. 한가지 양태에서, 동일한 투여 방법을 환자에게 투여하는 것을 고려할 수 있다. 대안으로, 환자에서 AS를 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀진 TNF 억제제의 용량을 감소시키는 것을 고려할 수 있다.

[0123] 본 발명은 AS에 대한 TNF 억제제 치료의 효능을 측정하기 위하여, 연골 분해 바이오마커를 단독으로 또는 활막염 바이오마커와 함께 사용하는 방법 뿐만 아니라, 활막염 바이오마커를 단독으로 또는 연골 분해 바이오마커와 함께 사용하는 방법도 제공한다.

[0124] 또한, 콜라겐 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 분석을 아직 TNF 억제제를 사용한 치료를 받지 않은 환자로부터의 샘플에서 수행할 수 있다. 콜라겐 분해 및 활막염 바이오마커의 분석을 수행하여, 환자가 항-TNFα 항체(예: 아달리무맙)를 사용한 치료에 대해 반응할 것 같은지 결정할 수 있다. 환자의 샘플로부터의 콜라겐 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준이 AS를 나타내는 수준으로서 간주되는 공지된 표준 수준과 비교하여 유사한 것은, 환자가 AS가 있고, 그러므로, TNF 억제제를 사용한 치료에 대한 후보일 것이라는 것을 보여줄 수 있다. 따라서, 이러한 환자는 항-TNFα 항체 (예: 아달리무맙)를 사용한 치료에 대해 선택되어, 질환의 진행과 함께 일어날 수 있는 구조적 손상을 예방할 수 있다.

[0125] 한가지 양태에서, 대조군 수준은 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 환자 자신의 기저선 수준을 기준으로 하고, 이때 기저선 수준은 TNF 억제제를 사용한 치료 전에 측정된다. 이러한 예에서, 치료 후에 측정되는 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준을 환자의 기저선 수준과 비교한다. 이후에, 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준이 치료 후 환자에서 감소되는지에 따라, TNF 억제제가 효능이 있는지 결정된다. 다른 양태에서, 대조군으로서 사용되는 기저선 수준은 TNF 억제제를 사용한 치료 동안 주어진 시점에서의 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 환자 자신의 수준을 기준으로 하고, 이때 환자는 치료를 계속 받으면서, 치료 동안 주어진 시점에서의 기저선 수준을 이후의 주어진 시점에서의 바이오마커 수준과 비교한다.

[0126] 한가지 양태에서, 공지된 표준 수준은 질환 상태와 관련된, 즉 AS 환자(들)와 관련된 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 인정된 수준을 기준으로 한다. 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준의 공지된 표준 수준은 AS 환자 1명을 기준으로 하거나, 대안으로, AS 환자의 그룹으로부터 얻은 평균을 기준으로 할 수 있다. 예를 들면, 한가지 양태에서, AS 환자에 대한 혈청 MMP-3의 공지된 표준 수준은 약 10 내지 200, 약 15 내지 180, 약 20 내지 140, 약 30 내지 120, 약 40 내지 100, 약 50 내지 80, 약 25 내지 57, 또는 약 60 내지 70 ng/ml이다. 다른 양태에서, AS 환자에 대한 뇨 CTX-II의 공지된 표준 수준은 약 300 내지 1000, 약 300 내지 800, 약 300 내지 600, 약 315 내지 395, 약 320 내지 390, 약 325 내지 385, 약 330 내지 380, 약 325 내지 385, 약 324 내지 388, 약 335 내지 375, 약 340 내지 370, 약 345 내지 365 또는 약 350 내지 360 ng/ml이다.

[0127] 대안으로, 다른 양태에서, 공지된 표준 수준은 건강한, 영향을 받지 않은 피험자(들)로부터의 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준을 기준으로 할 수 있다. 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준의 공지된 표준 수준은 영향을 받지 않은 건강한 단일 피험자를 기준으로 하거나, 대안으로, 영향을 받지 않은 건강한 피험자의 그룹으로부터의 평균을 기준으로 할 수 있다. 뇨 CTX-II의 정상 수치, 즉 건강한, 비-AS 피험자로부터의 수치의 예는 문헌[참조: Haima (2005) *Osteo Medical Group Clinical and Technical Monograph* and Mouritzen *et al.* (2003) *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:332]에 기술되어 있다. 예를 들면, 한가지 양태에서, 영향을 받지 않은 건강한 피험자에서 혈청 MMP-3의 공지된 표준 수준은 약 13 내지 15 ng/ml이다[참조: Chen *et al.* (2006) *Rheumatology* 45:414].

[0128] 상기한 바이오마커 수준의 중간 범위, 예를 들면, 약 323 내지 약 329 mg/ml의 뇨 CTX-II도 본 발명의 일부분인 것으로 의도된다. 또한, 임의의 상기한 수치의 조합을 상한 및/또는 하한으로서 사용하는 수치의 범위도 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 상기한 상한은 AS 환자에서 MMP-3 및 CTX-II의 증가된 수준과 관련하여 제한하는 것이 아니다.

[0129] 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준은, 대조군과 비교하여 높거나/증가되었거나 낮은/감소된 경우, 대조군, 즉 환자 자신의 치료전 수준 또는 공지된 표준 수준으로부터 변화된 것으로 고려된다. 한가지 양태에서, AS환자로부터 유래된 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준은, 수준을 평가하는데 사용된 검정의 표준 오차를 초과하는 양만큼 대조군 수준보다 높은/증가된 경우, 대조군 수준과 비교하여 높은/증가된 것으로 고려된다. 한가지 양태에서, AS 환자로부터 유래된 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준은, 수준을 평가하는데 사용된 검정의 표준 오차를 초과하는 양만큼 대조군 수준보다 낮은/감소된 경우, 대조군 수준과 비교하여 낮은/감소된 것으로 고려된다. 다른 양태에서, 병에 걸린 환자로부터 유래된 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준은, 대조군 수준과 환자 샘플로부터 유래된 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커 수준의 차이가 대조군 및 샘플 측정치의 표준 오차보다 약 2, 3, 4 또는 5배 이상 높거나 낮은 경우, 대조군 수준보다 높거나/증가되었거나 낮은/감소된 것으로 고려될 수 있다.

[0130] 한가지 양태에서, TNF 억제제의 효능은, AS 피험자에 대한 CTX-II 수준이 기저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 약 5 내지 100%, 약 5 내지 80%, 약 5 내지 60%, 약 5 내지 45%, 약 5 내지 40%, 약 5 내지 35%, 약 5 내지 30%, 약 5 내지 25%, 약 5 내지 20%, 약 5 내지 15%, 약 5 내지 10%, 약 6 내지 9%, 약 7 내지 8%, 또는 약 9% 이상 감소되는 경우 보여진다. 한가지 양태에서, TNF 억제제의 효능은, MMP-3 수준이 AS 피험자에 대한 기

저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 약 5 내지 50%, 약 5 내지 45%, 약 5 내지 40%, 약 5 내지 35%, 약 5 내지 30%, 약 5 내지 25%, 약 5 내지 20%, 약 5 내지 15%, 약 5 내지 13%, 약 6 내지 12%, 약 7 내지 11%, 또는 약 8% 이상 감소되는 경우 보여진다. 추가적인 양태에서, TNF 억제제의 효능은, MMP-3 수준이 AS 피험자에 대한 기저선 또는 공지된 표준 수준과 비교하여 약 12% 이상 감소되는 경우 보여진다.

[0131] 상기한 바이오마커 수준의 중간 범위 (예: 약 8 내지 약 10%)도 본 발명의 일부분인 것으로 의도된다. 또한, 임의의 상기한 수치의 조합을 상한 및/또는 하한으로서 사용하는 수치의 범위도 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 상기한 % 상한은 AS 환자에서 MMP-3 및 CTX-II의 감소된 % 수준과 관련하여 제한하는 것이 아니다, 즉 더 높은 % 감소도 본 발명에 의해 고려된다.

[0132] 연골 분해 바이오마커

[0133] 관절 연골은 프로테오글리칸(proteoglycan) 아그레칸(aggrecan)과 복합체를 형성한 제2형 콜라겐-기본 섬유성 망상구조로 주로 구성된다[참조: Poole AR, 2003. *Rheum Dis Clin North Am* 29:803-818 and Eyre (1991) *Semin Arthritis Rheum.* 21(3 Suppl 2):2-11]. 관절 질환에서, 제2형 콜라겐은 콜라게나제에 의해 점차적으로 절단된다. 제2형 콜라겐은 분해되어, 분해 과정의 산물은 콜라겐 분자 내에서 특정 에피토프의 위치에 따라 3개의 그룹으로 분류된다[참조: 본원에 참조로서 인용된 Birmingham *et al.* (2006) *Biomarker Insights* 2:61]. 네오에피토프(neoepitope) 및 텔로펩티드 에피토프를 포함하는 상이한 종류의 에피토프는 콜라겐과 관련된 분해 사건의 지표로서 사용될 수 있다.

[0134] 성숙한 제2형 콜라겐은 양쪽 끝에 짧은 텔로펩티드가 있는 3중 나선 구조로 이루어진다. 텔로펩티드는 다른 콜라겐 쇄에 공유 가교결합되어 개개의 콜라겐 분자를 견고한 섬유성 망상구조로 연결시키는 역할을 한다. 성숙한 콜라겐의 단편은 연골 세포외기질이 분해되는 경우에 생성된다. 이러한 단편은 혈청 및 뇨액 중에서 발견되며 연골 대사에 대한 마커로서 측정될 수 있다. 텔로펩티드에는 col2CTx 및 CTX-II가 포함된다[참조: 각각 본원에 참조로서 인용된 국제공개공보 제WO 91/08478호; Christgau *et al.* (2001) *Bone* 29:209; Matyas *et al.* (2004) *Arthritis Rheum* 50:543; 및 Eyre (1989) "Peptide fragments containing HP and LP cross-links, 미국특허 제5,702,909호].

[0135] 단백질분해는 제2형 콜라겐 에피토프를 체액으로 손실시키므로, 체액 중의 제2형 콜라겐 에피토프를 검사하여 콜라겐 분해의 양을 측정할 수 있다[참조: 각각 본원에 인용된 Birmingham *et al.* (2006) *Biomarker Insights* 2:61 및 Christgau *et al.* (2001) *Bone* 29:209]. 콜라겐 분해 과정을 모니터링하고 이를 늦추거나 역전시킬 수 있는 능력은 임상적 관점에서 중요한데, 성숙한 가교결합된 제2형 콜라겐 섬유의 광범위한 분해는 관절 파괴에서 결정적인, 아마도 비가역적인 단계인 것으로 고려되기 때문이다[참조: Billinghurst *et al.* (1997)].

[0136] 본원에서 기술된 본 발명은 연골 분해 바이오마커를 사용하여, 구조적 손상, 즉 관절 손상을 포함하는 질환 요소를 갖는 AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정한다. 한가지 양태에서, 거의 예외없이 연골에 위치하는 CTX-II를 본 발명의 방법 및 조성물에서 연골 파괴의 바이오마커로서 사용한다.

[0137] *CTX-II*

[0138] 바람직한 양태에서, 콜라겐 분해 바이오마커는 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드(CTX-II)이다. CTX-II는 C-말단 제2형 콜라겐으로부터 유래된 콜라겐의 단편이다. CTX-II는 절단된 제2형 콜라겐의 1/4 길이 단편의 C-말단에서 발견되는 네오에피토프 Col2CTx와 동일하다[참조: 본원에 참조로서 인용된 Birmingham *et al.* (2006)].

[0139] CTX-II는 연골 분해에 대한 바이오마커로서 공지되어 있다. CTX-II는 무릎 골관절염 환자에서 처음으로 연골 분해와 관련되었고[참조: Garnero *et al.* (2001) *Annals Rheum Dis* 60:619], 이때 중증 골관절염 환자의 뇨액 중의 후속적인 CTX-II의 상승이 측정되었다[참조: Jung *et al.* (2004) *Pathobiol* 71:70]. CTX-II는 또한 관절 파괴의 정도와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다[참조: Christgau *et al.* (2001) *Bone* 29:209; Garnero and Delmas (2003) *Curr Op Rheumat* 25:641].

[0140] 한가지 양상에서, 본 발명은 환자에서 AS 치료에 대한 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 TNFα 억제제를 사용한 치료 후 환자로부터의 CTX-II의 사전측정된 수준을 AS와 관련된 CTX-II의 공지된 표준 수준과 비교함을 포함한다. 이어서, 두 CTX-II 수준 간의 관련성에 관하여 평가하여, 환자의 치료후 CTX-II 수준이 CTX-II의 공지된 표준 수준보다 낮은지 측정한다. CTX-II의 수준이 AS 질환 상태를 나타내는 공지된

표준과 비교하여 감소된다는 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS의 치료에 효과적이라는 것을 나타낸다. 이러한 예에서, 공지된 표준 수준은 AS 질환 활성을 갖는 피험자로부터의, 즉 영향을 받은 비-치료된 환자의 CTX-II 수준을 나타낼 것이다.

[0141] 다른 양상에서, 본 발명은 환자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 구조적 손상을 감소시키는 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 TNFα 억제제를 사용한 치료후 AS 환자로부터의 CTX-II의 사전측정된 수준을 AS와 관련된 CTX-II의 공지된 표준 수준과 비교함을 포함한다. 이어서, 두 CTX-II 수준에 관하여 평가하여, 환자의 치료후 CTX-II 수준이 CTX-II의 공지된 표준 수준보다 낮은지 측정한다. 환자의 CTX-II 수준이 공지된 표준 수준과 비교하여 낮으면, 이러한 결과는 TNFα 억제제가 환자에서 AS와 관련된 구조적 손상을 감소시키는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0142] 한가지 양태에서, 본 발명은 환자에서 AS의 치료를 위한 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 방법을 기술하며, 상기 방법은 환자로부터 얻은 CTX-II의 사전측정된 치료후 수준을 환자로부터 얻은 CTX-II의 사전측정된 치료전 수준과 비교함을 포함한다. 이어서, 두 CTX-II 수준에 관하여 평가하여, 치료후 CTX-II 수준이 치료전 CTX-II 수준보다 낮은지 측정하고, 이때 환자로부터의 치료후 CTX-II 수준이 치료전 CTX-II 수준과 비교하여 낮은 것은 TNFα 억제제가 환자에서 AS의 치료에 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0143] 활막염 바이오마커

[0144] 활막염(염증)은 현재 골관절염과 같은 염증 질환에서 초기에 발생하는 것으로 공지되어 있고, 질환의 방사선학적 진행과 관련되어 있다. 무증상(subclinical) 염증을 포함하는 염증이 관절 손상을 악화시킬 수 있는 과정은 연골세포 기능의 변화, 향상된 혈관신생(angiogenesis) 및/또는 가속화된 골 전환(turnover)을 포함하는 것 같다[참조: Bonnet and Walsh DA. (2005) *Rheumatology* 44:7-16]. 본원에서 기술된 본 발명은 활막염 바이오마커를 사용하여 AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정한다. 한가지 양태에서, 염증이 발생한 관절에서 유래되는 것 같은 혈청 MMP-3[참조: Kruithof *et al.* (2005) *Arthritis Rheum* 52:3898]을 활막염 바이오마커로서 사용하여, AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정한다.

[0145] *MMP-3*

[0146] 연골 기질 분자의 분해는 아연-의존적 엔도펩티다제, 즉 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 수반한다. Zn^{2+}-의존적 엔도펩티다제의 계열인 MMP는 콜라겐 및 프로테오글리칸과 같은 세포외기질(ECM) 성분을 절단한다. MMP는 세포외기질의 성분을 분해함으로써 상이한 생리학적 과정을 매개한다.

[0147] MMP3은 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐 III, IV, IX 및 X, 및 연골 프로테오글리칸을 분해하는 효소이다. 현재는 20 종류 이상의 인간 MMP가 있으며, 구조 및 특정 기질에 따라 콜라게나제 (MMP-1, -8, -13), 스트로멜리신, 겔라티나제 (MMP-2, -9) 및 원형질막-결합 메탈로프로테이나제로 분류된다[참조: Nabeshima K *et al.* 2002 *Pathol Int* 52: 255-64].

[0148] 바람직한 양태에서, 본 발명에서 사용되는 활막염 바이오마커는 MMP-3이다. MMP-3 혈청 수준은 RA, 류마티스성 다발근육통, 건선 관절염 및 급성 결정성 관절염과 같은 관절 활막염을 특징으로 하는 염증성 류마티스 질환에서 증가되는 것으로 밝혀졌다. MMP-3 혈청 수준은 활막 염증을 반영하는 것으로 인정된다[참조: Ribbens *et al.* (2002) *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:161]. 또한, 이전의 연구는 AS 환자에서 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP), 구체적으로는 MMP-3 (스트로멜리신 1)을 Bath 강직성 척추염 질환 활성 지수 (BASDAI; Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) 수치와 서로 관련시켰다[참조: Yang, C. *et al.* (2004) *Arthritis Rheum* 51:691-9].

[0149] MMP-3의 아미노산 서열은 공지되어 있고, 예를 들면, GenBank 번호 AAI07491에서 찾을 수 있다. MMP-3의 뉴클레오티드 서열도 공지되어 있고, 예를 들면, GenBank 번호 NM002422에서 찾을 수 있다.

[0150] 본 발명은 본 발명의 방법을 달성하기 위하여, 연골 분해 바이오마커 (예: CTX-II) 및 활막염 바이오마커 (예: MMP-3)를 단독으로 또는 서로 함께 사용하는 것을 추가로 포함한다. 또한, 둘 중 어느 한 바이오마커를 C-반응성 단백질과 함께 사용하여, AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 추가로 측정할 수 있다.

[0151] C-반응성 단백질(CRP) 수준은 연골 분해 바이오마커 (예: CTX-II) 및 활막염 바이오마커 (예: MMP-3)와 함께 AS

질환 상태 및 주어진 항-TNF 치료법의 효능의 지표로서 사용될 수 있다. CRP는 소위 펜트락신 계열의 단백질에 속하는데, 1번 염색체 상의 단일 유전자에 의해 암호화된 5개의 동일한 서브유닛을 갖고 있고 이들이 결합하여 안정한 디스크-유사 5량체 구조를 형성하기 때문이다. CRP는 거의 간에서 생성되어, 급성 염증성 자극의 6시간 이내에 증가된 양으로 분비된다. CRP의 상승된 수준은 진행중인 염증의 민감한 지표를 제공하고, 그러므로, 신중한 임상 평가에 유용한 부가물을 제공한다.

[0152] 바이오마커의 수준을 측정하는 검정

[0153] 샘플 중의 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준은 당업계에 공지된 많은 방법론에 의해 분석할 수 있다. 일단 샘플을 환자로부터 채취하면, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 연골 분해 또는 활막염 바이오마커를 검출하고 정량하는데 적당한 당업계에 공지된 임의의 방법을 (핵산 또는, 바람직하게는, 단백질 수준에서) 사용할 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 여기에는 웨스턴 블롯, 노던 블롯, 서던 블롯, 면역조직화학, ELISA (예: 증폭된 ELISA), 정량적 혈액 기반 검정 (예: 혈청 ELISA), 정량적 뇨 기반 검정 (예: CTX-II의 경우에 단백질 발현 또는 분해 수준을 검사하기 위한 검정), 면역침전, 면역형광, 유동 세포측정(flow cytometry), 면역세포화학, 질량 분광분석 (예: MALDI-TOF 및 SELDI-TOF), 핵산 하이브리드화 기술, 핵산 역전사 방법 및 핵산 증폭 방법이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 검정의 예는 아래에 보다 상세히 기술되어 있다:

[0154] *단백질 기반 검정*

[0155] 본 발명의 방법은 주어진 바이오마커의 수준을 측정하는 단백질 기반 검정을 사용하여 수행할 수 있다. 단백질 기반 검정의 예에는 면역조직화학 및/또는 웨스턴 분석, 정량적 혈액 기반 검정 (예: 혈청 ELISA) 및 정량적 뇨액 기반 검정 (예: 뇨액 ELISA)이 포함된다. 한가지 양태에서, 면역검정을 수행하여 주어진 바이오마커의 정량적 평가를 제공한다.

[0156] 환자 샘플로부터의 단백질을 당업자에게 익히 공지된 기술을 사용하여 분리할 수 있다. 사용되는 단백질 분리 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]에 기술된 것과 같은 것일 수 있다.

[0157] 연골 분해 또는 활막염 바이오마커의 양은 상응하는 발현된 폴리펩티드를 검출하거나 정량하여 측정할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 당업자에게 익히 공지된 임의의 많은 수단에 의해 검출하고 정량할 수 있다. 여기에는 분석 생화학 방법, 예를 들면 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과확산 크로마토그래피 등, 또는 다양한 면역학적 방법, 예를 들면 유체 또는 겔 침전 반응, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 방사면역검정(RIA), 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정 및 웨스턴 블롯팅이 포함될 수 있다.

[0158] 한가지 양태에서, 연골 분해 또는 활막염 바이오마커의 수준은 면역검정을 사용하여 측정할 수 있다. 본원에서 기술된 바이오마커에 대해 지시된 항체를 사용하여, 인간의 생물학적 샘플 (예: 유체)를 특정 바이오마커 항원, 즉 콜라겐 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준에 대해 스크리닝할 수 있다. 예로서, 인간의 유체 (예: 혈청 또는 뇨액)를 환자로부터 채취하여, 예를 들면, 당업계에 공지된 표준 RIA 또는 ELISA에서 항-바이오마커 항체를 사용하여, 샘플 유체 중의 특정 에피토프 (방출된 항원 또는 세포막에 결합된 항원)에 대하여 검정할 수 있다. 이러한 방법에서 사용되는 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 한가지 양태에서, 환자로부터 채취한 혈청의 시험관내 면역혈청학적 평가는 따라서, 상응하는 바이오마커의 혈청 수준에 따라, 연골 퇴행의 진행 또는 감소 뿐만 아니라, 활막염의 증가 또는 감소의 비-침습적 측정을 가능하게 한다. 한가지 양태에서, 인간 뇨액 중의 CTX-II 수준을 측정하는 연골 분해의 정량적 평가를 위한 면역검정을 수행한다. 한가지 양태에서, 인간 혈청 중의 MMP-3 수준을 측정하는 활막염의 정량적 평가를 위한 면역검정을 수행한다.

[0159] 면역검정에서, 연골 분해 또는 활막염 바이오마커 폴리펩티드 검출용 시약은 연골 분해 또는 활막염 바이오마커의 단백질에 결합할 수 있는 항체일 수 있다. 항체는 폴리클로날이거나, 보다 바람직하게는, 모노클로날일 수 있다. 온전한 항체 또는 이의 단편 (예: Fab 또는 $F(ab')_2$)을 사용할 수 있다.

[0160] 한가지 양태에서, CTX-II (예: 뇨 CTX-II)에 대해 지시된 항체를 면역검정 (예: ELISA)에서 사용하여, AS 환자로부터의 샘플 중의 CTX-II의 수준을 측정한다. 한가지 양태에서, CTX-II 수준은 환자로부터의 뇨액 또는 혈청

샘플 중에서 측정할 수 있다. 한가지 양태에서, 인간 뇨 CTX-II를 검출하고 정량하기 위하여 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 항체는 모노클로날 항체 mAbF46 [참조: Christgau *et al.* (2001) *Bone* 29:209] 및 F4601 [참조: Oestergaard *et al.* (2006) *Osteoarthritis Cartilage.* 14(7):670]이다.

[0161] 한가지 양태에서, MMP-3 (예: 혈청 MMP-3)에 대해 지시된 항체를 면역검정 (예: ELISA)에서 사용하여, AS 환자로부터의 샘플 중의 MMP-3의 수준을 측정한다. 한가지 양태에서, MMP-3은 환자로부터의 혈청 샘플 중에서 측정할 수 있다. 한가지 양태에서, 인간 혈청 MMP-3을 검출하고 정량하기 위한 항체는 모노클로날 항체 mAb1B4 [참조: Murray GI *et al. Gut* 43:791-7 (1998)]이다.

[0162] 경쟁적 결합 검정을 사용하여, 콜라겐 분해 및/또는 활막염 바이오마커에 상응하는 단백질의 수준을 측정할 수 있다. 경쟁적 결합 검정의 한가지 예로는 효소-연결된 면역흡착 샌드위치 검정(ELISA)이 있다. ELISA를 사용하여 샘플 중의 콜라겐 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 존재를 검출할 수 있다. ELISA는 특정 단백질, 특히 항원 또는 항체의 검출을 위한 마커로서의 항체 또는 항원에 연결된 효소를 사용하는 민감한 면역검정이다. ELISA는, 결합된 항원 또는 항체를 일반적으로 무색 기질을 유색 산물 또는 검출될 수 있는 산물로 전환시키는 연결된 효소에 의해 검출하는 검정이다. 가장 일반적인 종류의 ELISA 중 하나는 "샌드위치 ELISA"이다. 한가지 양태에서, 연골 분해 및/또는 활막염 바이오마커의 수준을 ELISA 검정을 사용하여 측정한다.

[0163] 또한, 당업자는 공지된 단백질/항체 검출 방법을 쉽게 변형시켜 본 발명의 마커 (즉, CTX-II 및/또는 MMP-3)의 양을 측정하는데 사용할 수 있다.

[0164] 관절 파괴에 대한 바이오마커로서의 CTX-II를 검정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, 본원에 참조로서 인용된 문헌[참조: Oestergaard *et al.* (2006) *Osteoarthritis Cartilage.* 14(7):670 및 Mouritzen *et al.* (2003) *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:332]에 기술되어 있다. CTX-II의 수준을 측정하기 위한 검정은 시판되며, 예를 들면, Urine Cartilaps® 및 Serum Cartilaps®[판매원: Nordic Bioscience Diagnostics]가 포함된다. Urine Cartilaps® 검정은 류마티스 관절염 및 골관절염에서 연골 분해의 정량적 평가를 위한 임상 연구에서 사용되었다. 예를 들면, Urine CartiLaps® ELISA는 제2형 콜라겐의 뇨 단편 (즉, CTX-II)으로의 또는 스트렙타비딘으로 코팅된 미세역가 플레이트의 표면에 결합된 비오티닐화된 합성 펩티드로의 모노클로날 항체의 경쟁적 결합을 토대로 한다. 먼저, 비오티닐화된 합성 펩티드를 미세역가 플레이트의 스트렙타비딘-코팅된 웰의 표면에 결합시킨다. 세척한 후, 표준 대조군 및 뇨액 샘플을 웰 속으로 피펫팅하고 나서, 모노클로날 항체의 용액을 첨가한다. 웰을 세척하고, 퍼옥시다제-접합된 항-마우스 면역글로불린(래빗)의 용액을 웰에 첨가한다. 제2 세척 단계 후, 발색 기질을 모든 웰에 첨가하고, 색 반응을 황산으로 중지시키고 흡광도를 측정한다. ELISA를 사용하여 CTX-II를 검정하는 방법에 관한 추가적인 예는 본원에 참조로서 인용된 문헌[참조: 2001 *Bone* 29:209]에 기술되어 있다.

[0165] 한가지 양태에서, 인간 혈청 중의 활막염 바이오마커 MMP-3의 수준을 측정하기 위한 면역검정을 수행한다. 활막염 바이오마커로서의 MMP-3을 검정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Tamarat *et al.* (2003) *PNAS* 100: 8555]에 기술되어 있다. 또한, MMP-3 단백질 수준을 검사할 수 있는 시판되는 키트에는 Human Matrix Metalloproteinase-3 Biotrak ELISA 시스템 [판매원: Amersham]이 포함된다[참조: Yang *et al.* (2004) *Arthritis and Rheumatism* 51:691]. MMP-3 단백질을 검정하는 방법을 기술하는 추가적인 예는 문헌[참조: Chen *et al.* (2006) *Rheumatology* 45:414]에 기술되어 있다.

[0166] 한가지 양태에서, 항체 또는 항체 단편을 웨스턴 블롯 또는 면역형광 기술과 같은 방법에서 사용하여 발현된 단백질을 검출한다. 이러한 용도에서, 항체 또는 단백질을 고체 지지체 상에 고정시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 적당한 고체상 지지체 또는 운반체에는 항원 또는 항체에 결합할 수 있는 임의의 지지체가 포함된다. 익히 공지된 지지체 또는 운반체에는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철광이 포함된다.

[0167] 당업자는 많은 다른 적당한 항체 또는 항원 결합용 운반체를 알 것이고, 이러한 지지체를 변형시켜 본 발명과 함께 사용할 수 있을 것이다. 예를 들면, 세포로부터 분리된 단백질을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 상에서 전개시켜, 니트로셀룰로스와 같은 고체상 지지체 상에 고정시킬 수 있다. 이어서, 지지체를 적당한 완충액으로 세척하고 나서, 검출가능하게 표지된 항체로 처리한다. 이어서, 고체상 지지체를 완충액으로 다시 세척하여 비-결합된 항체를 제거할 수 있다. 이어서, 고체 지지체 상에 결합된 표지의 양을 통상적인 수단으로 검출할 수 있다. 전기영동 기술을 사용하여 단백질을 검출하는 수단은 당업자에게 익히 공지되어 있다[참조: R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology* Vol. 182:

Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y.].

[0168] 항체를 사용하여 콜라겐 분해 및/또는 활막염 마커를 검출하고 정량하는 다른 표준 방법에는, 방사면역검정("RIA"), 수용체 검정, 효소 면역검정("EIA"), 세포화학적 생물검정, 리간드 검정, 면역방사측정 검정, 형광면역검정 및 효소-연결된 면역흡착 검정("ELISA")이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 검출의 용이함 및 정량적 성질을 위한 추가적인 방법에는 샌드위치 또는 이중 항체 검정이 포함되고, 여기에는 많은 변형이 존재하며, 이들은 모두 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 이러한 방법은 익히 공지되어 있고, 당업자는 항체와 항원 간의 상호작용 및 항체에 의한 항원의 검출을 최적화하는데 적당한 양의 실험이 필요하다는 것을 이해할 것이다. 상기 및 기타 면역검정 기술은 각각 전문이 본원에 참조로서 인용된 문헌[참조: Principles And Practice Of Immunoassay, 2nd Edition, Price and Newman, eds., MacMillan (1997) 및 Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Ch. 9 (1988)]에서 찾을 수 있다.

[0169] 당업계에 공지되어 있고 바이오마커의 수준을 측정하는데 본원에서 기술된 면역검정에서 사용되는 항체를, 검출가능한 표지로 표지할 수 있다. 프로브 또는 항체와 관련하여 "표지된"이라는 용어는, 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 연결시켜 (즉, 물리적으로 연결시켜) 프로브 또는 항체를 직접적으로 표지하는 것 뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적 표지도 포함하는 의미이다. 간접적 표지의 예에는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출, 및 비오틴으로 DNA 프로브를 말단 표지하여 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있게 하는 것이 포함된다.

[0170] 한가지 양태에서, 항체는 표지된, 예를 들면, 방사선-표지된, 발색단(chromophore)-표지된, 형광단(fluorophore)-표지된 또는 효소-표지된 항체이다. 다른 양태에서, 항체는 연골 분해 또는 활막염 바이오마커 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 유도체 (예: 기질과 접합되거나 단백질 또는 단백질-리간드 쌍 {예: 비오틴-스트렙타비딘}의 리간드와 접합된 항체) 또는 항체 단편 (예: 단일쇄 항체, 분리된 항체 과가변(hypervariable) 도메인 등)이다.

[0171] 본 발명의 한가지 양태에서, 프로테오믹(proteomic) 방법 (예: 질량 분광분석법)을 사용하여 연골 분해 또는 활막염 바이오마커를 검출하고 정량한다. 예를 들면, 혈청과 같은 생물학적 샘플을 단백질-결합 칩에 적용함을 포함하는 기질-결합된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분광분석법(MALDI-TOF MS) 또는 표면-향상된 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량 분광분석법(SELDI-TOF MS)[참조: Wright, G.L., Jr., *et al.* (2002) *Expert Rev Mol Diagn* 2:549; Li, J., *et al.* (2002) *Clin Chem* 48:1296; Laronga, C., *et al.* (2003) *Dis Markers* 19:229; Petricoin, E.F., *et al.* (2002) 359:572; Adam, B.L., *et al.* (2002) *Cancer Res* 62:3609; Tolson, J., *et al.* (2004) *Lab Invest* 84:845; Xiao, Z., *et al.* (2001) *Cancer Res* 61:6029]을 사용하여, 연골 분해 또는 활막염 바이오마커를 검출하고 정량할 수 있다. 질량 분광분석 방법은, 예를 들면, 각각 전문이 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제5,622,824호, 제5,605,798호 및 제5,547,835호에 기술되어 있다.

[0172] *RNA*

[0173] 한가지 양태에서, 상기 바이오마커를 암호화하는 mRNA의 수준은 당업자에게 공지된 방법 (예: 노던 분석)을 사용하여 측정할 수 있다. 바이오마커의 유전자 발현을 RNA 수준에서 검출할 수 있다. RNA는 RNA 추출 기술을 사용하여, 예를 들면, 산 페놀/구아니딘 이소티오시아네이트 추출 (RNAzol B)[판매원: Biogenesis], RNeasy RNA 제조 키트[판매원: Qiagen] 또는 PAXgene[판매원: PreAnalytix, Switzerland]을 사용하여 세포로부터 추출할 수 있다. 리보핵산 하이브리드화를 사용하는 통상적인 검정 형식에는 핵 런-온 검정(nuclear run-on assay), RT-PCR, RNase 보호 검정[참조: Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035], 노던 블롯팅 및 원위치 하이브리드화(in situ hybridization)가 포함된다. 유전자 발현은 또한 아래에 기술되는 마이크로어레이 분석으로 검출할 수 있다.

[0174] 노던 블롯팅의 경우, RNA 샘플을 우선 아가로스 겔에서 변성 조건 하에서 전기영동을 통해 크기에 따라 분리한다. 이어서, RNA를 막으로 이동시켜, 가교결합시키고, 표지된 프로브와 하이브리드화시킨다. 비-동위원소 또는 고 비활성(specific activity) 방사선표지된 프로브, 예를 들면, 무작위-프라이밍된(random-primed), 닉-해독된 (nick-translated) 또는 PCR-생성된 DNA 프로브, 시험관내 전사된 RNA 프로브 및 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 또한, 부분적 상동성만을 갖는 서열 (예: 상이한 종으로부터의 cDNA 또는 엑손을 함유할 수 있는 게놈 DNA 단편)을 프로브로서 사용할 수 있다.

[0175] 뉴클레아제 보호 검정(NPA; Nuclease Protection Assay) (예: 리보뉴클레아제 보호 검정 및 S1 뉴클레아제 검정)은 특정 mRNA의 검출 및 정량을 위한 매우 민감한 방법을 제공한다. NPA의 기초는 안티센스(antisense) 프로브 (방사선표지된 또는 비-동위원소)를 RNA 샘플에 용액 하이브리드화시키는 것이다. 하이브리드화 후, 일본쇄 비-하이브리드화된 프로브 및 RNA를 뉴클레아제로 분해시킨다. 나머지 보호된 단편을 아크릴아미드 겔 상에서 분리한다. NPA는 다수의 RNA 종의 동시 검출을 가능하게 한다.

[0176] 원위치 하이브리드화(ISH)는 세포 또는 조직에서 특정 mRNA의 위치결정을 위한 강력한 다목적 도구이다. 프로브의 하이브리드화가 세포 또는 조직 내에서 일어난다. 진행되는 동안 세포 구조가 유지되므로, ISH는 조직 샘플 내에서 mRNA의 위치에 관한 정보를 제공한다.

[0177] 상기 방법은 샘플을 중성-완충된 포르말린 중에 고정시키고, 조직을 파라핀 중에 포매(embedding)시켜 시작된다. 이어서, 샘플을 얇은 절편으로 썰어 현미경 슬라이드 상에 고정시킨다 (대안으로, 조직을 냉동시켜 절편을 만든 후, 파라포름알데히드 중에 고정시킬 수 있다). 일련의 세척으로 절편을 탈왁스시키고 재수화시킨 후, 프로테이나제 K 분해를 수행하여 프로브 접근성을 증가시키고 나서, 표지된 프로브를 샘플 절편에 하이브리드화시킨다. 방사선표지된 프로브를 슬라이드 상에 건조된 액체 필름으로 시각화시키고, 비-동위원소 표지된 프로브를 비색 또는 형광 시약으로 편리하게 검출한다. 상기 후자 검출 방법은 형광 원위치 하이브리드화(FISH)의 기초가 된다.

[0178] 사용될 수 있는 검출 방법에는 방사능 표지, 효소 표지, 화학발광 표지, 형광 표지 및 다른 적당한 표지가 포함된다.

[0179] 통상적으로, RT-PCR을 사용하여 RNA 표적을 증폭시킨다. 이 과정에서, 리버스 트랜스크립타제 효소를 사용하여 RNA를 상보적인 DNA (cDNA)로 전환시키며, 이어서 cDNA를 증폭시켜 검출을 용이하게 할 수 있다. 상대적 정량적 RT-PCR은 내부 대조군을 관심대상의 유전자와 동시에 증폭시킴을 포함한다. 내부 대조군을 사용하여 샘플을 정규화시킨다. 일단 정규화되면, 특정 mRNA의 상대적인 양을 샘플 간에 직접 비교할 수 있다. 통상적으로 사용되는 내부 대조군에는, 예를 들면, GAPDH, HPRT, 액틴 및 사이클로필린이 포함된다.

[0180] 많은 DNA 증폭 방법이 공지되어 있고, 대부분은 효소적 연쇄 반응 (예: 폴리머라제 연쇄 반응, 리가제 연쇄 반응 또는 자가-지속(self-sustained) 서열 복제)에 의존하거나, 클로닝된 벡터의 전부 또는 일부의 복제로부터 증폭된다.

[0181] 많은 표적 및 시그날 증폭(TAS) 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: Landegren, U. et al., Science 242:229-237 (1988) 및 Lewis, R., Genetic Engineering News 10:1, 54-55 (1990)]에 기술되었다. PCR은 당업계에서 통상적인 핵산 증폭 방법이고, 특히 미국특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호에 기술되어 있다. PCR을 사용하여, 진단과 관련하여 임의의 공지된 핵산을 증폭시킬 수 있다[참조: Mok et al., 1994, Gynaecologic Oncology 52:247-252]. 자가-지속 서열 복제(3SR)는 TAS의 변형으로서, 효소 칵테일에 의해 매개되는 리버스 트랜스크립타제(RT), 폴리머라제 및 뉴클레아제 활성의 순차적 순환 및 적당한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 통한 핵산 주형의 등온 증폭을 포함한다[참조: Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874]. 연결 증폭 반응 또는 연결 증폭 시스템은 DNA 리가제 및 4개의 올리고뉴클레오티드 (표적 쇄 당 2개)를 사용한다. 이 기술은 문헌[참조: Wu, D. Y. and Wallace, R. B., 1989, Genomics 4:560]에 기술되어 있다. Q.beta 레플리카제 기술에서는, 일본쇄 RNA을 복제시키는 박테리오파지 Q.beta에 대한 RNA 레플리카제를 사용하여, 문헌[참조: Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197]에 기술된 바와 같이 표적 DNA를 증폭시킨다. 정량적 PCR (Q-PCR)은 샘플 내의 전사체의 상대적인 양을 측정할 수 있게 하는 기술이다.

[0182] **III. TNF 억제제**

[0183] 본 발명은 강직성 척추염(AS) 치료에 대한 TNFα 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 측정하는 방법을 기술한다. 본 발명은 또한 환자에서 강직성 척추염(AS)과 관련된 구조적 손상의 진행을 감소시키는 TNFα 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 모니터링하는 방법을 제공한다. 본 발명은 환자에서 AS 치료에 대한 TNFα 억제제 (예: 인간 TNFα 항체, 또는 이의 항원 결합 부분)의 효능을 예측하는 방법을 추가로 포함한다. 청구된 방법과 관련된 조성물 및 키트도 본 발명의 일부분으로서 고려된다.

[0184] 한가지 양태에서, 이러한 방법은 높은 친화도 및 낮은 오프 속도로 인간 TNFα에 결합하고 높은 중화 능력을 갖

는 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 효능을 측정함을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 인간 항체는 재조합 중화 인간 항-hTNFα 항체이다. 본 발명의 가장 바람직한 재조합 중화 항체를 본원에서 D2E7이라고 하고, 또한 휴미라(HUMIRA)® 및 아달리무맙이라고도 한다 (D2E7 VL 영역의 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시되어 있다; D2E7 VH 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2에 제시되어 있다). D2E7 (아달리무맙/HUMIRA®)의 특성은 각각 본원에 참조로서 인용된 문헌[참조: Salfeld *et al.*, 미국특허 제6,090,382호, 제6,258,562호 및 제6,509,015호]에 기술되었다. 본 발명의 방법은 류마티스 관절염의 치료에 대해 임상 검사를 시행한 키메릭 및 인간화된 쥐 항-hTNFα 항체를 사용하여 수행할 수도 있다[참조: Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E.C., *et al.* (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342].

[0185] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법은 AS 치료에 대한 D2E7 항체 및 항체 부분, D2E7-관련 항체 및 항체 부분, 및 D2E7과 동등한 특성 (예: hTNFα에 대한 고 친화도 결합 및 낮은 해리 반응속도론 및 높은 중화 능력)을 갖는 다른 인간 항체 및 항체 부분의 효능을 측정함을 포함한다. 한가지 양태에서, 본 발명은, 표면 플라즈몬 공명에 의한 측정시, 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-8} M 이하의 K_d 및 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고, 표준 시험관내 L929 검정에서 인간 TNFα 세포독성을 1 x 10^{-7} M 이하의 IC_{50}으로 중화시키는, 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 사용한 치료법을 제공한다. 보다 바람직하게는, 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 TNFα로부터 5 x 10^{-4} s^{-1} 이하의 K_{off}로, 또는 보다 바람직하게는, 1 x 10^{-4} s^{-1} 이하의 K_{off}로 해리된다. 보다 바람직하게는, 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 표준 시험관내 L929 검정에서 인간 TNFα 세포독성을 1 x 10^{-8} M 이하의 IC_{50}으로, 보다 바람직하게는 1 x 10^{-9} M 이하의 IC_{50}으로, 그리고 보다 바람직하게는 1 x 10^{-10} M 이하의 IC_{50}으로 중화시킨다. 바람직한 양태에서, 항체는 분리된 인간 재조합 항체 또는 이의 항원 결합 부분이다.

[0186] 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에서 중요한 역할을 한다는 것은 당업계에 익히 공지되어 있다. 따라서, 다른 양상에서, 본 발명은 AS에 대한 치료에 대한 환자의 반응을 예측하는 방법에 관한 것이고, 이때 상기 치료는 hTNFα와의 결합에 대하여 느린 해리 반응속도론을 갖고 D2E7과 구조적으로 동일하거나 관련된 경쇄 및 중쇄 CDR3 도메인을 갖는 인간 항체를 투여함을 포함한다. D2E7 VL CDR3의 9번 위치에는, K_{off}에 실질적으로 영향을 주지 않으면서 Ala 또는 Thr이 위치할 수 있다. 따라서, D2E7 VL CDR3에 대한 컨센서스 모티프(consensus motif)는 아미노산 서열 Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (서열번호 3)을 포함한다. 또한, D2E7 VH CDR3의 12번 위치에는, K_{off}에 실질적으로 영향을 주지 않으면서 Tyr 또는 Asn이 위치할 수 있다. 따라서, D2E7 VH CDR3에 대한 컨센서스 모티프는 아미노산 서열 V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (서열번호 4)를 포함한다. 또한, 미국특허 제6,090,382호의 실시예 2에 증명된 바와 같이, D2E7 중쇄 및 경쇄의 CDR3 도메인은, K_{off}에 실질적으로 영향을 주지 않으면서 단일 알라닌 잔기로 치환될 수 있다 (VL CDR3 내의 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서, 또는 VH CDR3 내의 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서). 또한, 당업자는 D2E7 VL 및 VH CDR3 도메인이 알라닌으로 치환될 수 있는 가능성이 주어지면, 항체의 낮은 오프 속도 상수를 유지하면서 CDR3 도메인 내의 다른 아미노산의 치환, 특히 보존적 아미노산으로의 치환이 가능할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 바람직하게는, D2E7 VL 및/또는 VH CDR3 도메인 내에서 1 내지 5개 이하의 아미노산을 보존적으로 치환한다. 보다 바람직하게는, D2E7 VL 및/또는 VH CDR3 도메인 내에서 1 내지 3개 이하의 아미노산을 보존적으로 치환한다. 또한, hTNFα에 결합하는데 결정적인 아미노산 위치에서는 보존적 아미노산 치환을 해서는 안 된다. D2E7 VL CDR3의 2번 및 5번 위치, 및 D2E7 VH CDR3의 1번 및 7번 위치는 hTNFα와의 상호작용에 결정적인 것 같고, 따라서, 바람직하게는 이러한 위치에서는 보존적 아미노산 치환을 하지 않는다 (하지만, 상기한 바와 같이, D2E7 VL CDR3의 5번 위치에서의 알라닌 치환은 허용된다)[참조: 미국특허 제6,090,382호].

[0187] 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 투여를 포함하여, AS에 대한 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 바람직하게는 다음의 특징을 함유한다:

[0188] a) 표면 플라즈몬 공명에 의한 측정시, 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-3} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되고;

[0189] b) 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로부터 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 1, 3, 4, 6, 7, 8 및/또는 9번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 도메인을 갖고;

[0190] c) 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 서열번호 4로부터 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 또는 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 및/또는 12번 위치에서의 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 도메인을 갖는다.

[0191] 보다 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 TNFα로부터 5 x 10^{-4} s^{-1} 이하의 K_{off}로 해리된다.

보다 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 TNFα로부터 1 x 10^{-4} s^{-1} 이하의 K_{off}로 해리된다.

[0192] 또다른 양태에서, 본 발명은 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 투여를 포함하여, AS에 대한 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3으로부터 1, 4, 5, 7 또는 8번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR), 및 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 서열번호 4로부터 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 또는 11번 위치에서의 단일 알라닌 치환에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 함유한다. 바람직하게는, LCVR은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 (즉, D2E7 VL CDR2)을 추가로 갖고, HCVR은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 도메인 (즉, D2E7 VH CDR2)을 추가로 갖는다. 보다 바람직하게는, LCVR은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인 (즉, D2E7 VL CDR1)을 추가로 갖고, HCVR은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 도메인 (즉, D2E7 VH CDR1)을 갖는다. VL에 대한 골격 영역은 바람직하게는 V_kI 인간 생식계열로부터의 것이고, 보다 바람직하게는 A20 인간 생식계열 Vk 유전자로부터의 것이고, 가장 바람직하게는 미국특허 제6,090,382호의 도 1A 및 1B에 제시된 D2E7 VL 골격 서열로부터의 것이다. VH에 대한 골격 영역은 바람직하게는 V_H3 인간 생식계열로부터의 것이고, 보다 바람직하게는 DP-31 인간 생식계열 VH 유전자로부터의 것이고, 가장 바람직하게는 미국특허 제6,090,382호의 도 2A 및 2B에 제시된 D2E7 VH 골격 서열로부터의 것이다.

[0193] 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 AS 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공하고, 이때 상기 치료는 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 투여를 포함한다. 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) (즉, D2E7 VL) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) (즉, D2E7 VH)을 함유한다. 특정 양태에서, 항체는 중쇄 불변 영역, 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이다. 또한, 항체는 경쇄 불변 영역 (카파 경쇄 불변 영역 또는 람다 경쇄 불변 영역)을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 카파 경쇄 불변 영역을 포함한다. 대안으로, 항체 부분은, 예를 들면, Fab 단편 또는 단일 쇄 Fv 단편일 수 있다.

[0194] 또다른 양태에서, 본 발명은 AS에 대한 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공하고, 이때 상기 치료는 D2E7-관련 VL 및 VH CD3 도메인을 함유하는 분리된 인간 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 투여를 포함한다. 예를 들면, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 서열번호 3, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR), 또는 서열번호 4, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 도메인을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.

[0195] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 AS에 대한 치료의 효능을 측정함을 포함하고, 이때 상기 치료는 인플릭시맙 (레미케이드(Remicade)®, 판매원: Johnson and Johnson; 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제5,656,272호에 기술되어 있음), CDP571 (인간화된 모노클로날 항-TNF-알파 IgG4 항체), CDP 870 (인간화된 모노클로날 항-TNF-알파 항체 단편), 항-TNF dAb [판매원: Peptech], CNTO 148 (골리무맙; 판매원: Medarex and Centocor, 국제공개공보 제WO 02/12502호 참조), 및 아달리무맙 (휴미라(Humira)®, 판매원: Abbott Laboratories, 인간 항-TNF mAb, 미국특허 제6,090,382호에 D2E7로 기술되어 있음)을 포함하는, 항-TNFα 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 비제한적인 TNFα 억제제를 투여함을 포함한다. 다른 예에는 에타네르셉트 (국제공개공보 제WO 91/03553호 및 제WO 09/406476호에 기술되어 있음), 가용성 TNF 수용체 1형, 페길화된 가용성 TNF 수용체 1형 (PEG TNF-R1)

또는 p55TNFR1gG (레네르셉트(Lenercept))가 포함된다. 다른 양태에서, TNFα 억제제는 재조합 TNF 결합 단백질 (r-TBP-I) [판매원: Serono]이다.

[0196] 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용되는 TNFα 항체는 AS의 향상된 치료를 위하여 변형될 수 있다. 일부 양태에서, TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 화학적으로 변형되어 목적하는 효과를 제공한다. 예를 들면, 본 발명의 항체 및 항체 단편의 페길화는, 예를 들면, 문헌[참조: *Focus on Growth Factors* 3:4-10 (1992); EP 0 154 316; 및 EP 0 401 384 (각각 전문이 본원에 참조로서 인용됨)]에 기술된 바와 같이, 당업계에 공지된 임의의 페길화 반응에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 페길화는 반응성 폴리에틸렌 글리콜 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)를 사용한 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행한다. 본 발명의 항체 및 항체 단편의 페길화에 바람직한 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 본원에서 사용되는 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화는데 사용된 임의의 형태의 PEG, 예를 들면 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 의미이다.

[0197] 본 발명의 페길화된 항체 및 항체 단편을 제조하는 방법은 일반적으로 (a) 항체 또는 항체 단편이 하나 이상의 PEG 그룹에 부착되는 조건 하에서, 항체 또는 항체 단편을 폴리에틸렌 글리콜 (예: PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체)과 반응시키는 단계; 및 (b) 반응 산물을 수득하는 단계를 포함할 것이다. 공지된 변수 및 목적하는 결과에 따라 최적 반응 조건 또는 아실화 반응을 선택하는 것은 당업자에게 명백할 것이다.

[0198] 페길화 항체 및 항체 단편을 일반적으로 사용하여, 본원에서 기술된 TNFα 항체 및 항체 단편의 투여에 의해 AS를 치료할 수 있다. 일반적으로, 페길화된 항체 및 항체 단편은 비-페길화된 항체 및 항체 단편과 비교하여 증가된 반감기를 갖는다. 페길화된 항체 및 항체 단편은 단독으로, 함께, 또는 다른 약제학적 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0199] 본 발명의 또다른 양태에서, TNFα 항체 또는 이의 단편은 변형될 수 있고, 이때 항체의 불변 영역이 변형되어 비-변형된 항체와 비교하여 하나 이상의 불변 영역-매개된 생물학적 효과인자 기능이 감소된다. 본 발명의 항체를 변형시켜 Fc 수용체에 대한 감소된 결합을 나타내게 하기 위하여, 항체의 면역글로불린 불변 영역 단편을 Fc 수용체(FcR) 상호작용에 필요한 특정 영역에서 돌연변이시킬 수 있다[참조: Canfield, S.M. and S.L. Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483-1491; 및 Lund, J. *et al.* (1991) *J. of Immunol.* 147:2657-2662]. 항체의 FcR 결합 능력의 감소는 FcR 상호작용에 의존하는 다른 효과인자 기능 (예: 옵소닌화(opsonization) 및 식세포작용(phagocytosis) 및 항원-의존적 세포독성)을 감소시킬 수 있다.

[0200] 본 발명의 방법에서 사용되는 항체 또는 항체 부분은 유도체화되거나 다른 기능성 분자 (예: 다른 펩티드 또는 단백질)에 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 부분은, 면역부착 분자를 포함하여, 본원에서 기술된 인간 항-hTNFα 항체의 유도체화된 형태 및 달리 변형된 형태를 포함하는 의미이다. 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 항체 또는 항체 부분과 다른 분자 (예: 스트렙타비딘 코어(core) 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 결합을 매개할 수 있는 다른 항체 (예: 이중특이적 항체 또는 디아바디(diabody)), 검출가능한 제제, 세포독성제, 약제 및/또는 단백질 또는 펩티드와 같은 하나 이상의 다른 분자 구조체에 (화학적 연결, 유전자 융합, 비공유 결합 등에 의해) 기능적으로 연결될 수 있다.

[0201] 유도체화된 항체의 한가지 종류는 (예를 들면, 이중특이적 항체를 생성시키기 위하여, 동일한 종류 또는 상이한 종류의) 2개 이상의 항체를 가교결합시켜 제조한다. 적당한 가교결합에는 적당한 스페이서(spacer)에 의해 분리된 2개의 상이한 반응성 그룹을 갖는 이형 2기능성(heterobifunctional)인 것 (예: m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르) 또는 동형 2기능성(homobifunctional)인 것 (예: 디석신이미딜 수버레이트)이 포함된다. 이러한 링커는 판매원[Pierce Chemical Company, Rockford, IL]으로부터 입수가능하다.

[0202] 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 유도체화시킬 수 있는 유용한 검출가능한 제제에는 형광 화합물이 포함된다. 대표적인 검출가능한 형광 제제에는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린 등이 포함된다. 항체는 알칼리성 포스파타제, 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 글루코스 옥시다제 등과 같은 검출가능한 효소를 사용하여 유도체화시킬 수도 있다. 항체를 검출가능한 효소를 사용하여 유도체화시키는 경우, 효소가 검출가능한 반응 산물을 생성하는데 사용하는 추가적인 시약을 첨가하여 검출한다. 예를 들면, 검출가능한 제제 양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘을 첨가하면 유색 반응 산물이 생성되고, 이를 검출할 수 있다. 항체를 비오틴을 사용하여 유도체화시켜, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적 측정을 통해 검출할 수도 있다.

[0203] 본 발명의 방법 또는 조성물에서 사용되는 항체 또는 항체 부분은 숙주 세포에서 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유

전자의 재조합 발현으로 제조할 수 있다. 항체를 재조합적으로 발현시키기 위하여, 숙주 세포를 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 단편을 보유하는 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 형질감염시켜, 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되게 하고, 바람직하게는, 숙주 세포를 배양하는 배지 속으로 분비되게 하여, 배지로부터 항체를 회수할 수 있게 한다. 표준 재조합 DNA 방법론을 사용하여 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 수득하고, 이러한 유전자를 재조합 발현 벡터 속으로 혼입시켜, 벡터를 숙주 세포 속으로 도입시킨다[참조: Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, *Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989); Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989); 및 Boss *et al.* 미국특허 제4,816,397호].

[0204] D2E7 또는 D2E7-관련 항체를 발현시키기 위하여, 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편을 먼저 수득한다. 이러한 DNA는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 생식계열 경쇄 및 중쇄 가변 서열의 증폭 및 변형으로 수득할 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열은 당업계에 공지되어 있다[참조: "Vbase" - 인간 생식계열 서열 데이터베이스; Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 및 Cox, J.P.L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_{78} Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836 (각각 내용이 명백히 본원에 참조로서 인용됨)]. D2E7 또는 D2E7-관련 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편을 수득하기 위하여, 인간 생식계열 VH 유전자의 V_H3 계열의 일원을 표준 PCR로 증폭시킨다. 가장 바람직하게는, DP-31 VH 생식계열 서열을 증폭시킨다. D2E7 또는 D2E7-관련 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편을 수득하기 위하여, 인간 생식계열 VL 유전자의 V_kI 계열의 일원을 표준 PCR로 증폭시킨다. 가장 바람직하게는, A20 VL 생식계열 서열을 증폭시킨다. DP-31 생식계열 VH 및 A20 생식계열 VL 서열을 증폭시키는데 사용하기에 적당한 PCR 프라이머는 앞서 인용된 참고문헌에 공개된 뉴클레오티드 서열에 따라 표준 방법을 사용하여 설계할 수 있다.

[0205] 일단 생식계열 VH 및 VL 단편이 수득되면, 이러한 서열을 돌연변이시켜 본원에서 공개된 D2E7 또는 D2E7-관련 아미노산 서열을 암호화하게 할 수 있다. 생식계열 VH 및 VL DNA 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 먼저 D2E7 또는 D2E7-관련 VH 및 VL 아미노산 서열과 비교하여, 생식계열과 상이한 D2E7 또는 D2E7-관련 서열의 아미노산 잔기를 확인한다. 이어서, 유전자 암호를 사용하여 어떤 뉴클레오티드를 변화시켜야 하는지 결정하여, 생식계열 DNA 서열의 적당한 뉴클레오티드를 돌연변이시켜, 돌연변이된 생식계열 서열이 D2E7 또는 D2E7-관련 아미노산 서열을 암호화하게 한다. 생식계열 서열의 돌연변이유발은 PCR-매개된 돌연변이유발 (돌연변이된 뉴클레오티드를 PCR 프라이머 속으로 혼입시켜 PCR 산물이 돌연변이를 함유하게 함) 또는 부위-지시된 돌연변이유발과 같은 표준 방법으로 수행한다.

[0206] 일단 D2E7 또는 D2E7-관련 VH 및 VL 단편을 암호화하는 DNA 단편이 (상기한 바와 같이 생식계열 VH 및 VL 유전자의 증폭 및 돌연변이유발에 의해) 수득되면, 이러한 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술로 추가로 조작하여, 예를 들면 가변 영역 유전자를 전체 길이 항체 쇄 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이러한 조작에서, VL- 또는 VH-암호화 DNA 단편을, 항체 불변 영역 또는 유연성 링커(flexible linker)와 같은 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편에 작동가능하게 연결시킨다. 이와 관련하여 사용되는 "작동가능하게 연결된"이라는 용어는, 2개의 DNA 단편이 연결되어 2개의 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 프레임내(in-frame)에 있는 것을 의미한다.

[0207] VH-암호화 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시켜, VH 영역을 암호화하는 분리된 DNA를 전체 길이 중쇄 유전자로 전환시킬 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고[참조: Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 수득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, VH-암호화 DNA를 중쇄 CH1 불변 영역만을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킬 수 있다.

[0208] VL-암호화 DNA를 경쇄 불변 영역 CL을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시켜, VL 영역을 암호화하

는 분리된 DNA를 전체 길이 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역의 서열은 당업계에 공지되어 있고[참조: Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 수득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 카파 불변 영역이다.

[0209] scFv 유전자를 생성시키기 위하여, VH- 및 VL-암호화 DNA 단편을 유연성 링커를 암호화하는, 예를 들면 아미노산 서열 $(Gly_4\text{-}Ser)_3$을 암호화하는 다른 단편에 작동가능하게 연결시켜, VH 및 VL 서열이 연속적인 단일 쇄 단백질 (VL 및 VH 영역이 유연성 링커에 의해 연결됨)로서 발현될 수 있게 한다[참조: Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554].

[0210] 본 발명에서 사용되는 항체 또는 항체 부분을 발현시키기 위하여, 상기한 바와 같이 수득한 부분적 또는 전체 길이 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 발현 벡터 속에 삽입시켜, 유전자가 전사 및 해독 조절 서열에 작동가능하게 연결되게 한다. 이와 관련하여, "작동가능하게 연결된"이라는 용어는, 항체 유전자가 벡터 속에 연결되어 벡터 내의 전사 및 해독 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 해독을 조절하는 의도된 기능을 하게 되는 것을 의미한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 사용되는 발현 숙주 세포에 적합하도록 선택한다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자를 별도의 벡터 속으로 삽입시키거나, 보다 통상적으로는, 두 유전자를 동일한 발현 벡터 속으로 삽입시킬 수 있다. 항체 유전자를 표준 방법 (예: 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보적 제한 부위의 연결, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우에는 평활말단(blunt end) 연결)에 의해 발현 벡터 속으로 삽입시킨다. D2E7 또는 D2E7-관련 경쇄 또는 중쇄 서열의 삽입 전, 발현 벡터는 항체 불변 영역 서열을 이미 보유할 수 있다. 예를 들면, D2E7 또는 D2E7-관련 VH 및 VL 서열을 전체 길이 항체 유전자로 전환시키는 한가지 접근법은, 이들을 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 각각 이미 암호화하는 발현 벡터 속으로 삽입시켜, VH 단편이 벡터 내의 CH 단편(들)에 작동가능하게 연결되게 하고 VL 단편이 벡터 내의 CL 단편에 작동가능하게 연결되게 하는 것이다. 추가적으로 또는 대안으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 쇄의 분비를 용이하게 하는 시그날 펩티드를 암호화할 수 있다. 항체 쇄 유전자를 벡터 속으로 클로닝하여, 시그날 펩티드가 항체 쇄 유전자의 아미노 말단에 프레임내 연결되게 할 수 있다. 시그날 펩티드는 면역글로불린 시그날 펩티드 또는 이종 시그날 펩티드 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 시그날 펩티드)일 수 있다.

[0211] 항체 쇄 유전자 외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 쇄 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 보유한다. "조절 서열"이라는 용어는 항체 쇄 유전자의 전사 또는 해독을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소 (예: 폴리아데닐화 시그날)를 포함하는 의미이다. 이러한 조절 서열은, 예를 들면, 문헌[참조: Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기술되어 있다. 당업자는, 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 설계는 형질전환시킬 숙주 세포의 선택, 목적하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 바람직한 조절 서열에는 포유동물 세포에서 고 수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소, 예를 들면, 사이토메갈로바이러스(CMV), 원숭이 바이러스 40 (SV 40), 아데노바이러스 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서 (예: CMV 프로모터/인핸서, SV40 프로모터/인핸서, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(AdMLP))가 포함된다. 바이러스 조절 요소 및 이의 서열의 추가적인 기술에 관해서는, 문헌[참조: Stinski, 미국특허 제5,168,062호, Bell *et al.* 미국특허 제4,510,245호 및 Schaffner *et al.* 미국특허 제4,968,615호]을 참조한다.

[0212] 항체 쇄 유전자 및 조절 서열 외에도, 본 발명에서 사용되는 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예: 복제 오리진)과 같은 추가적인 서열 및 선별가능 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선별가능 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다[참조: Axel *et al.* 미국특허 제4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호]. 예를 들면, 통상적으로 선별가능 마커 유전자는 G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 벡터가 도입된 숙주 세포에 부여한다. 바람직한 선별가능 마커 유전자에는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자 (메토트렉세이트 선별/증폭으로 $dhfr^-$ 숙주 세포에서 사용) 및 *neo* 유전자 (G418 선별)가 포함된다.

[0213] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위하여, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의해 숙주 세포 속으로 형질감염시킨다. "형질감염"이라는 용어의 다양한 형태는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 속으로 외인성 DNA를 도입시키는데 통상적으로 사용되는 광범위한 기술을 포함하는 의미이다 (예: 전기천공(electroporation),

인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등). 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시키는 것은 이론적으로 가능하지만, 진핵생물 세포에서, 그리고 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 것이 가장 바람직한데, 그 이유는 이러한 진핵생물 세포, 특히 포유동물 세포가 원핵생물 세포보다 적당하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 어셈블리하고 분비할 것이기 때문이다. 항체 유전자의 원핵생물 발현은 활성 항체의 고 수율 생산에 비효과적인 것으로 보고되었다[참조: Boss, M.A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13].

[0214] 본 발명의 재조합 항체를 발현시키는데 바람직한 포유동물 숙주 세포에는 중국 햄스터 난소 세포 (CHO 세포) [예: 문헌(참조: R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621)에 기술된 바와 같이 DHFR 선별 가능 마커와 함께 사용되는 문헌(참조: Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220)에 기술된 dhfr- CHO 세포], NS0 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포가 포함된다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포 속으로 도입시키는 경우, 항체는 숙주 세포에서 항체가 발현되는데 충분한 시간 동안 또는, 보다 바람직하게는, 숙주 세포를 성장시키는 배양 배지 속으로 항체가 분비되는데 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양하여 생산된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0215] 숙주 세포를 사용하여 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 온전한 항체의 일부분을 생산할 수도 있다. 상기 방법의 변형은 본 발명의 범위 내에 있다는 것을 이해하여야 한다. 예를 들면, 숙주 세포를 본 발명의 항체의 경쇄 또는 중쇄를 암호화하는(둘 다 암호화하지는 않음) DNA로 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 재조합 DNA 기술을 사용하여, hTNFα에 결합하는데 필요하지 않은 경쇄 및 중쇄 중 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거할 수도 있다. 이러한 절두된(truncated) DNA 분자로부터 발현된 분자도 본 발명의 항체에 포함된다. 또한, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄는 본 발명의 항체이고 다른 중쇄 및 경쇄는 hTNFα 이외의 항원에 대해 특이적인 2기능성 항체는, 본 발명의 항체를 제2 항체에 표준 화학적 가교결합 방법으로 가교결합시켜 제조할 수 있다.

[0216] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 재조합 발현에 바람직한 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄를 모두 암호화하는 재조합 발현 벡터를 인산칼슘-매개된 형질감염으로 dhfr-CHO 세포 속으로 도입시킨다. 재조합 발현 벡터 내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소에 각각 작동가능하게 연결되어 유전자의 고 수준 전사를 진행시킨다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 보유하여, 메토트렉세이트 선별/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선별을 가능하게 한다. 선별된 형질전환 숙주 세포를 배양하여 항체 중쇄 및 경쇄가 발현되게 하고, 온전한 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 표준 분자생물학 기술을 사용하여 재조합 발현 벡터를 제조해서, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질전환체를 선별하여, 숙주 세포를 배양하고 배양 배지로부터 항체를 회수한다.

[0217] 본원에서 공개된 D2E7 또는 이의 항원 결합 부분 또는 D2E7-관련 항체 이외의 본 발명의 재조합 인간 항체는, 재조합 조합 항체 라이브러리를 스크리닝하여, 바람직하게는 인간 림프구로부터 유래된 mRNA로부터 제조된 인간 VL 및 VH cDNA를 사용하여 제조된 scFv 파지 디스플레이(phage display) 라이브러리를 스크리닝하여 분리할 수 있다. 이러한 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 것에 관한 방법론은 당업계에 공지되어 있다. 파지 디스플레이 라이브러리 생성용으로 시판되는 키트 (예: Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, 카탈로그 번호 27-9400-01; 및 Stratagene *SurfZAP*™ 파지 디스플레이 키트, 카탈로그 번호 240612) 외에도, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용하기에 특히 적당한 방법 및 시약의 예는, 예를 들면, 문헌[참조: Ladner *et al.* 미국특허 제5,223,409호; Kang *et al.* PCT 공보 제WO 92/18619호; Dower *et al.* PCT 공보 제WO 91/17271호; Winter *et al.* PCT 공보 제WO 92/20791호; Markland *et al.* PCT 공보 제WO 92/15679호; Breitling *et al.* PCT 공보 제WO 93/01288호; McCafferty *et al.* PCT 공보 제WO 92/01047호; Garrard *et al.* PCT 공보 제WO 92/09690호; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-65; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; 및 Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982]에서 찾을 수 있다.

[0218] 바람직한 양태에서, hTNFα에 대한 높은 친화도 및 낮은 오프 속도 상수를 갖는 인간 항체를 분리하기 위하여, hTNFα에 대한 높은 친화도 및 낮은 오프 속도 상수를 갖는 쥐 항-hTNFα 항체 (예: MAK 195, 이에 대한 하이브리도마의 수탁번호는 ECACC 87 050801이다)를 우선 사용하여, 문헌[참조: Hoogenboom *et al.*, PCT 공보 제WO

93/06213호]에 기술된 에피토프 임프린팅(imprinting) 방법을 사용하여 hTNFα에 대한 유사한 결합 활성을 갖는 인간 중쇄 및 경쇄 서열을 선택한다. 상기 방법에서 사용되는 항체 라이브러리는 바람직하게는 문헌[참조: McCafferty *et al.*, PCT 공보 제WO 92/01047호, McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; 및 Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J* 12:725-734]에 기술된 바와 같이 제조되고 스크리닝되는 scFv 라이브러리이다. scFv 항체 라이브러리는 바람직하게는 재조합 인간 TNFα를 항원으로서 사용하여 스크리닝한다.

[0219] 일단 초기 인간 VL 및 VH 단편이 선택되면, 처음에 선택된 VL 및 VH 단편의 상이한 쌍을 hTNFα 결합에 대해 스크리닝하는 "혼합 및 매칭" 실험을 수행하여, 바람직한 VL/VH 쌍의 조합을 선별한다. 또한, hTNFα에 대한 친화도를 추가로 향상시키고/시키거나 오프 속도 상수를 감소시키기 위하여, 바람직한 VL/VH 쌍(들)의 VL 및 VH 단편을, 자연적인 면역 반응 동안 항체의 친화도 성숙을 담당하는 생체내 체세포 돌연변이 방법과 유사한 방법으로, 바람직하게는 VH 및/또는 VL의 CDR3 영역 내에서 무작위로 돌연변이시킬 수 있다. 이러한 시험관내 친화도 성숙은 VH CDR3 또는 VL CDR3에 각각 상보적인 PCR 프라이머를 사용하여 VH 및 VL 영역을 증폭시켜 달성될 수 있고, 이때 상기 프라이머는 특정 위치에서 4개의 뉴클레오티드 염기의 무작위 혼합물로 "스파이킹되어(spiked)", 생성된 PCR 산물은 무작위 돌연변이가 VH 및/또는 VL CDR3 영역 속으로 도입된 VH 및 VL 단편을 암호화하게 된다. 이러한 무작위로 돌연변이된 VH 및 VL 단편을 hTNFα에 대한 결합에 대해 재스크리닝하여, hTNFα 결합에 대한 높은 친화도 및 낮은 오프 속도를 나타내는 서열을 선별할 수 있다.

[0220] 재조합 면역글로불린 디스플레이 라이브러리로부터 본 발명의 항-hTNFα 항체를 스크리닝하여 분리한 후, 선별된 항체를 암호화하는 핵산을 디스플레이 패키지로부터(예: 파지 게놈으로부터) 회수하여 표준 재조합 DNA 기술로 다른 발현 벡터 속에 서브클로닝할 수 있다. 경우에 따라, 핵산을 추가로 조작하여 (예: 추가적인 불변 영역과 같은 추가적인 면역글로불린 도메인을 암호화하는 핵산에 연결시켜) 본 발명의 다른 항체 형태를 생성시킬 수 있다. 조합 라이브러리를 스크리닝하여 분리된 재조합 인간 항체를 발현시키기 위하여, 앞서 상세히 기술된 바와 같이, 항체를 암호화하는 DNA를 재조합 발현 벡터 속에 클로닝하여 포유동물 숙주 세포 속으로 도입시킨다.

[0221] hTNFα에 대한 높은 친화도 및 낮은 오프 속도 상수를 갖는 인간 항체를 분리하는 방법은 또한 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제6,090,382호, 제6,258,562호 및 제6,509,015호에 기술되어 있다.

[0222] **IV. 척추관절병증(spondyloarthropathy)**

[0223] TNFα는 척추관절병증과 같은 염증 질환을 포함하는 광범위한 장애의 병리생리학에 관련되어 있다[참조: Moeller *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162; 미국특허 제5,231,024호; 유럽 특허 공보 제260 610호].

[0224] 본원에서 사용되는 "척추관절병증"이라는 용어는 척추의 관절에 영향을 주는 중증 질환 중의 어느 하나를 말하며, 이때 이러한 질환은 공통적인 임상적, 방사선학적 및 조직학적 특징을 공유한다. 많은 척추관절병증은 유전적 특징을 공유한다, 즉 HLA-B27 대립유전자(allele)와 관련되어 있다. 한가지 양태에서, 척추관절병증이라는 용어는 강직성 척추염을 제외하고 척추의 관절에 영향을 주는 중증 질환 중의 어느 하나를 말하며, 이때 이러한 질환은 공통적인 임상적, 방사선학적 및 조직학적 특징을 공유한다. 척추관절병증의 예에는 강직성 척추염, 건선 관절염/척추염, 장병성 관절염(enteropathic arthritis), 반응성 관절염 또는 라이터 증후군(Reiter's syndrome) 및 미분화 척추관절병증이 포함된다. 척추관절병증을 연구하는데 사용되는 동물 모델의 예에는 *ank/ank* 유전자전이된 마우스, HLA-B27 유전자전이된 래트가 포함된다[참조: Taurog *et al.* (1998) *The Spondylarthritides*. Oxford:Oxford University Press].

[0225] 본 발명의 방법을 사용하여, 척추관절병증이 있거나 척추관절병증 발병 위험이 있는 피험자에 대해 치료할 수도 있다. 척추관절병증 발병 위험이 있는 피험자의 예에는 관절염을 겪고 있는 인간이 포함된다. 척추관절병증은 류마티스 관절염을 포함하는 다른 형태의 관절염을 동반할 수 있다. 본 발명의 한가지 양태에서, 척추관절병증이 있거나 척추관절병증 발병 위험이 있는 환자의 연골 분해의 바이오마커 수준 및/또는 활막염 바이오마커 수준을 측정하여, 이를 사용해서 환자가 척추관절병증 발병 위험이 있는지 평가한다. TNFα 항체를 사용하여 치료될 수 있고, 따라서, 본원에서 기술된 방법을 사용하여 검사될 수 있는 척추관절병증의 예는 아래에 기술되어 있다:

[0226] 1. *강직성 척추염(AS)*

[0227] 종양 괴사 인자는 강직성 척추염(AS)의 병리생리학에 관련되어 있다[참조: Verjans *et al*. (1991) *Arthritis Rheum*. 34:486; Verjans *et al*. (1994) *Clin Exp Immunol*. 97:45; Kaijtzel *et al*. (1999) *Hum Immunol*. 60:140]. AS는 하나 이상의 척추의 염증을 수반하는 염증 장애이다. AS는 중축 골격(axial skeleton) 및/또는 말초 관절, 예를 들면 척주의 척추와 천장관절(sacroiliac joint) 사이의 관절 및 척추와 골반 사이의 관절에 영향을 주는 만성 염증 질환이다. AS는 결국 AS가 발병한 척추가 함께 융합되거나 성장하게 할 수 있다. AS를 포함하는 척추관절병증은 건선 관절염(PsA) 및/또는 염증성 장질환(IBD), 예를 들면 궤양성 대장염 및 크론병(Crohn's disease)을 동반할 수 있다.

[0228] AS의 초기 징후는 CT 스캔 및 MRI 스캔을 포함하는 방사선촬영 검사로 측정할 수 있다. AS의 초기 징후에는 종종 연골하골(subchrondral bone)의 피질 경계가 흐려지고 나서 미란(erosion) 및 경화에 의해 증명되는 천장관절염(sacroiliitis) 및 천장관절의 변화가 포함된다. 피로도 AS의 일반적인 증상으로서 기록되었다[참조: Duffy *et al*. (2002) *ACR 66th Annual Scientific Meeting* Abstract]. 따라서, 본 발명의 방법을 사용하여, TNF 억제제의 투여를 포함하는 치료의 효능을 측정하는 방법을 제공하여 AS에 대한 개선된 치료를 제공할 수 있다.

[0229] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여, IBD를 동반하는 AS를 포함하는 척추관절병증의 치료를 위한 TNF 억제제 투여의 효능을 측정한다.

[0230] AS는 종종 아스피린 또는 인도메타신과 같은 비-스테로이드계 항염증 약제(NSAID)로 치료한다. 따라서, 본 발명의 방법을 사용하여, 강직성 척추염에 통상적으로 수반되는 염증 및 통증을 감소시키는데 통상적으로 사용되는 제제와 함께 투여되는 TNFα 항체를 포함하는 치료의 효능을 측정할 수 있다.

[0231] 2. *건선 관절염*

[0232] 종양 괴사 인자는 건선 관절염(PsA)의 병리생리학에 관련되어 있다[참조: Partsch *et al*. (1998) *Ann Rheum Dis*. 57:691; Ritchlin *et al*. (1998) *J Rheumatol*. 25:1544]. 본원에서 언급한 바와 같이, 피부와 관련된 건선 관절염 또는 건선은 건선을 동반하는 만성 염증성 관절염을 말하며, 이는 신체에 붉은 반점을 일으키는 일반적인 만성적 피부 상태이다. 건선이 있는 20명의 개체 중 약 1명은 피부 상태와 함께 관절염이 발생할 것이고, 약 75%의 경우에는, 건선이 관절염보다 먼저 발생한다. PsA는 경증부터 중증 관절염 범위의 다양한 방식으로 나타나고, 이때 관절염은 일반적으로 손가락 및 척추에 영향을 준다. 척추에 영향을 주는 경우, 증상은 상기한 강직성 척추염의 증상과 유사하다. 따라서, PsA 치료에 대한 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 효능을 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 측정할 수 있다.

[0233] PsA는 종종 단절성 관절염(arthritis mutilans)을 동반한다. 단절성 관절염은 관절을 절단시키는 전반적 미란성 변형을 일으키는 과도한 골 미란을 특징으로 하는 장애를 말한다. 한가지 양태에서, 단절성 관절염 치료에 대한 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 효능을 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 측정할 수 있다.

[0234] 3. *반응성 관절염 / 라이터 증후군*

[0235] 종양 괴사 인자는 라이터 증후군이라고도 하는 반응성 관절염의 병리생리학에 관련되어 있다[참조: Braun *et al*. (1999) *Arthritis Rheum*. 42(10):2039]. 반응성 관절염(ReA)은 종종 장 또는 비뇨생식기 감염 후, 신체의 다른 부위에서 염증을 악화시키는 관절염을 말한다. ReA는 종종 관절의 염증(관절염), 요도염, 결막염 및 피부와 점막의 병변을 포함하는 특정한 임상적 증상을 특징으로 한다. 또한, ReA는 성 전파성 질환 또는 이질 감염, 예를 들면 클라미디아(*chlamydia*), 캠필로박터(*campylobacter*), 살모넬라(*salmonella*) 또는 예르시니아(*yersinia*)에 감염된 후 발병할 수 있다. 한가지 양태에서, ReA 치료에 대한 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 효능을 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 측정할 수 있다.

[0236] 4. *미분화 척추관절병증*

[0237] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 항체를 사용하여, 미분화 척추관절병증을 겪고 있는 피험자를 치료한다[참조: Zeidler *et al*. (1992) *Rheum Dis Clin North Am*. 18:187]. 미분화 척추관절병증을 기술하는데 사용되는 다른 용어에는 혈청음성 소수관절염(seronegative oligoarthritis) 및 미분화 소수관절염이 포

함된다. 본원에서 사용되는 미분화 척추관절병증은 피험자가 척추관절병증과 관련된 증상 중 일부만을 나타내는 장애를 말한다. 이러한 상태는 IBD, 건선, 또는 AS 또는 라이터 증후군의 통상적인 증상이 없는 젊은 성인에서 일반적으로 관찰된다. 일부 경우에, 미분화 척추관절병증은 AS의 초기 징후일 수 있다. 한가지 양태에서, 미분화 척추관절병증 치료에 대한 TNFα 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 효능을 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 측정할 수 있다.

[0238] **V. 약제학적 조성물 및 약제학적 투여**

[0239] A. *조성물 및 투여*

[0240] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 항체, 항체 부분 및 다른 TNFα 억제제는 피험자에게 투여하는데 적당한 약제학적 조성물 속에 혼입시킬 수 있다. 통상적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"에는 생리학적으로 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항세균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예에는 하나 이상의 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 뿐만 아니라, 이의 배합물이 포함된다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장제, 예를 들면, 당, 폴리알콜 (예: 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨)을 포함시키는 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제의 저장 수명 또는 유효성을 향상시키는 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제와 같은 미량의 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0241] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 여기에는, 예를 들면, 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예를 들면 액체 용액 (예: 주사가능 용액 및 주입가능 용액), 분산액제 또는 현탁액제, 정제, 환제, 산제, 리포좀제 및 좌제가 포함된다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료학적 용도에 따라 달라진다. 통상적인 바람직한 조성물은 다른 항체 또는 다른 TNFα 억제제를 사용한 인간의 수동 면역화에 사용되는 것과 유사한 조성물과 같은 주사가능 또는 주입가능 용액의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구 (예: 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 투여이다. 바람직한 양태에서, 항체 또는 다른 TNFα 억제제를 정맥내 주입 또는 주사로 투여한다. 다른 바람직한 양태에서, 항체 또는 다른 TNFα 억제제를 근육내 또는 피하 주사로 투여한다.

[0242] 치료학적 조성물은 통상적으로 멸균이어야 하고 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적당한 다른 규칙적인 구조물로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능 용액은 필요량의 활성 화합물 (즉, 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제)을 앞서 열거한 하나의 성분 또는 성분의 배합물과 함께 적당한 용매 중에 혼입시키고 나서, 필요에 따라, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 앞서 열거한 것 중 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 속에 혼입시켜 제조한다. 멸균 주사가능 용액 제조용 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 앞서 멸균여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가적인 바람직한 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 냉동 건조이다. 용액의 적당한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅을 사용하여; 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해; 그리고 계면활성제를 사용하여 유지시킬 수 있다. 주사가능 조성물의 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물 중에 포함시켜 지연시킬 수 있다.

[0243] 보충 활성 화합물을 또한 조성물 속에 혼입시킬 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 부분을, AS 억제제 또는 길항제를 포함하는 하나 이상의 추가적인 치료제와 함께 공동제형하고/하거나 공동투여한다. 예를 들면, 본 발명의 항-hTNFα 항체 또는 항체 부분은 TNFα 관련 장애와 관련된 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가적인 항체 (예: 다른 사이토카인에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체), 하나 이상의 사이토카인, 가용성 TNFα 수용체[참조: PCT 공보 제WO 94/06476호] 및/또는 hTNFα 생산 또는 활성을 억제하는 하나 이상의 화학 제제 (예: PCT 공보 제WO 93/19751호에 기술된 사이클로헥산-일이덴 유도체) 또는 이의 임의의 배합물과 함께 공동제형하고/하거나 공동투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체는 2개 이상의 상기 치료제와 함께 사용될 수 있다. 이러한 병용 요법은 유리하게 저용량의 투여형 치료제를 사용함으로써, 다양한 단독요법을 받은 환자의 가능한 부작용, 합병증 또는 낮은 반응 수준을 피할 수 있다.

[0244] 한가지 양태에서, 본 발명은 유효량의 TNFα 억제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하고, 이때 유효량의 TNFα 억제제는 AS를 치료하는데 효과적일 수 있다. 한가지 양태에서, 본 발명

의 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 부분을 본원에 참조로서 인용된 문헌[참조: PCT/IB03/04502 및 미국 특허원 제10/222140호]에 기술된 바와 같이 약제학적 제형 속에 혼입시킨다. 이러한 제형은 항체 D2E7을 50 mg/ml의 농도로 포함하고, 이때 하나의 사전충전된 주사기는 40mg의 피하 주사용 항체를 함유한다. 다른 양태에서, 본 발명의 제형은 D2E7을 포함한다.

[0245] 본 발명의 항체, 항체 부분 및 다른 TNFα 억제제는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있지만, 많은 치료학적 용도의 경우, 바람직한 투여 경로/방식은 피하 주사이다. 다른 양태에서, 정맥내 주사 또는 주입을 통해 투여한다. 당업자가 인식하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 양태에서, 활성 화합물을 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조할 수 있다 (예: 이식(implant), 경피 패치 및 마이크로캡슐 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형). 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성(biocompatible) 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법은 특허를 받았거나 일반적으로 당업계에 공지되어 있다[참조: *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Robinson, ed., Dekker, Inc., New York, 1978].

[0246] 본 발명에서 사용되는 TNFα 항체는 중합체성 담체 내에 캡슐화되어 코팅된 입자를 형성한 단백질 결정의 조합을 포함하는 단백질 결정 제형의 형태로 투여될 수도 있다. 단백질 결정 제형의 코팅된 입자는 구형 형태이고 직경이 최대 500㎛인 미소구체(microsphere)이거나, 일부 다른 형태이고 미립자(microparticulate)일 수 있다. 단백질 결정의 향상된 농도는 본 발명의 항체가 피하로 전달되게 한다. 한가지 양태에서, 본 발명의 TNFα 항체는 단백질 전달 시스템을 통해 전달되고, 이때 하나 이상의 단백질 결정 제형 또는 조성물을 TNFα 관련 장애가 있는 피험자에게 투여한다. 전체 항체 결정 또는 항체 단편 결정의 안정화된 제형을 제조하는 조성물 및 방법은 또한 본원에 참조로서 인용된 국제공개공보 제WO 02/072636호에 기술되어 있다. 한가지 양태에서, 본원에 참조로서 인용된 PCT/IB03/04502 및 미국 특허원 제10/222,140호에 기술된 결정화된 항체 단편을 포함하는 제형을 사용하여, 본 발명의 치료 방법을 사용하여 류마티스 관절염을 치료한다.

[0247] 특정 양태에서, 본 발명의 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제를, 예를 들면, 불활성 희석제 또는 동화가능한 식용 담체와 함께 경구투여할 수 있다. 화합물 (및 바람직한 경우, 다른 성분)을 또한 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐에 넣어, 정제로 압축하거나, 환자의 식이 속에 직접 혼입시킬 수 있다. 경구 치료학적 투여의 경우, 화합물을 부형제와 함께 혼입시켜, 섭취가능한 정제, 구강 정제, 트로키제, 캡슐제, 엘릭서제, 현탁액제, 시럽제, 웨이퍼제 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여 이외의 방법으로 본 발명의 화합물을 투여하기 위하여, 화합물의 불활성화를 막는 물질로 화합물을 코팅하거나 이와 공동투여하는 것이 필요할 수 있다.

[0248] 본 발명의 약제학적 조성물은 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"의 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"은, 필요한 투여량에서 필요한 시간 동안, 목적하는 치료 결과를 달성하는데 효과적인 양을 말한다. 치료학적 유효량의 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제는 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제의 치료학적으로 이로운 효과가 임의의 독성 또는 유해 효과를 능가하는 것이다. "예방학적 유효량"은, 필요한 투여량에서 필요한 시간 동안, 목적하는 예방적 결과를 달성하는데 효과적인 양을 말한다. 통상적으로, 예방학적 용량은 피험자에서 질환 발생 전 또는 질환의 초기 단계에서 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적을 것이다.

[0249] 투여 방법을 조절하여 최적의 목적하는 반응 (예: 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공할 수 있다. 예를 들면, 1회 일시주사를 투여하거나, 여러 분할 용량을 시간에 걸쳐 투여하거나, 급박한 치료 상황이 나타나는 것에 비례하여 용량을 감소시키거나 증가시킬 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이함과 용량의 균일함을 위하여 투여 단위 형태로 제형하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료받을 포유동물 피험자에 대한 단위 투여에 적당한 물리적으로 분리된 단위를 말하고; 각각의 단위는 필요한 약제학적 담체와 함께 목적하는 치료 효과가 나타나도록 계산된 사전측정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 사항은 (a) 활성 화합물의 고유한 특징 및 달성될 특정한 치료 또는 예방 효과, 및 (b) 개체에서 민감성의 치료를 위한 이러한 활성 화합물을 배합하는 당업계에 내재된 한계에 의해 지시되고 이에 직접적으로 의존한다.

[0250] 한가지 양태에서, 본 발명은 인간 항체와 같은 단일 용량의 TNFα 억제제를 이를 필요로 하는 피험자에게 투여함을 포함하여, TNFα 관련 장애를 치료하는 단일 투여 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, TNFα 억제제는 항

-TNFα 항체 D2E7이다. 단일 용량의 TNFα 억제제는 임의의 치료학적 또는 예방학적 유효량일 수 있다. 한가지 양태에서, 피험자에게 20mg, 40mg 또는 80mg 단일 용량의 D2E7을 투여한다. 단일 용량은, 예를 들면, 피하 투여를 포함하는 임의의 경로를 통해 투여할 수 있다. 격주 투여 방법을 사용하여 TNFα 활성이 유해한 장애를 치료할 수 있고, 이는 미국 특허원 제10/163,657호에 추가로 기술되어 있다. 수회 가변 용량을 투여하는 치료 또는 예방 방법을 또한 사용하여 TNFα 활성이 유해한 장애를 치료할 수 있고, 이는 PCT 출원 제PCT/US05/12007호에 추가로 기술되어 있다.

[0251] 투여량 수치는 완화될 상태의 종류 및 중증도에 따라 달라질 수 있다는 것을 유의하여야 한다. 임의의 특정 피험자의 경우, 특정 투여 방법을 개체의 필요 및 조성물을 투여하고 조성물의 투여를 감독하는 인간의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 조절해야 한다는 것과, 본원에서 제시된 용량 범위는 단지 대표적인 것이고 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하는 의도가 아니라는 것을 또한 이해하여야 한다.

[0252] 본 발명은 또한 AS의 치료를 위한 본 발명의 항-TNF 항체를 투여하기 위한 포장된 약제학적 조성물 또는 키트에 관한 것이다. 본 발명의 한가지 양태에서, 키트는 항체와 같은 TNFα 억제제, 추가적인 치료제를 포함하는 제2의 약제학적 조성물, 및 AS의 치료를 위한 투여에 관한 지침서를 포함한다. 지침서는 상이한 용량의 TNFα 억제제 및/또는 추가적인 치료제를 피험자에게 치료를 위하여 투여하는 방법 (예: 피하 투여) 및 시간 (예: 0주 및 2주에)을 기술할 수 있다.

[0253] 본 발명의 다른 양상은 항-TNFα 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물, 및 TNFα 관련 장애를 치료하는데 유용한 약물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 각각 포함하는 하나 이상의 약제학적 조성물을 함유하는 키트에 관한 것이다. 대안으로, 키트는 항-TNFα 항체, TNFα 관련 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 약물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 단일 약제학적 조성물을 포함한다. 키트는 TNFα 관련 장애 치료용 약제학적 조성물의 투여에 관한 지침서를 함유한다. 한가지 양태에서, 키트는 AS 치료에 대한 TNF 억제제의 효능을 측정하는 방법에 관한 지침서를 함유한다. 키트는 본 발명의 방법을 실시하기 위한 다음 중 임의의 것을 포함할 수 있다: CTX-II 및/또는 MMP-3을 특이적으로 인식하는 검출가능한 제제; 사용 지침서; 및 환자로부터 샘플을 분리하기 위한 시약.

[0254] 패키지 또는 키트는 대안으로 TNFα 억제제를 함유할 수 있고, 패키지 내에서 또는 용도 또는 본원에서 기술된 장애의 치료에 관한 정보를 수반하여 사용이 촉진될 수 있다. 포장된 약제 또는 키트는 (본원에서 기술된) 제2의 제제를 (본원에서 기술된) 제1의 제제와 함께 사용하는 것에 관한 지침서와 함께 포장되거나 공동판촉되는 제2의 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0255] B. *추가적인 치료제*

[0256] 본 발명은 단독으로 또는 추가적인 치료제와 함께 AS 치료에 대한 TNFα 억제제의 효능을 측정하는 것에 관한 것이다. 본원에서 기술된 방법 및 약제학적 조성물 내에서 사용되는 제제의 배합물은 치료를 위하여 표적화된 상태(들) 또는 질환(들)에 대해 치료학적 누적적 또는 상승적 효과를 가질 수 있다. 본원에서 기술된 방법 또는 약제학적 조성물 내에서 사용되는 제제의 배합물은 또한 단독으로 또는 특정 약제학적 조성물 중의 다른 제제(들) 없이 투여되는 경우 하나 이상의 제제와 관련된 유해한 효과를 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 한가지 제제의 부작용의 독성이 조성물 중의 다른 제제에 의해 약화되어, 고용량을 가능하게 하고, 환자 순응도를 향상시키며, 치료 결과를 향상시킬 수 있다. 본 조성물의 누적적 또는 상승적 효과, 이익 및 장점은 구조적 또는 기능적 계열의 치료제 또는 개개의 화합물 자체에 적용된다.

[0257] 보충 활성 화합물을 조성물 속에 혼입시킬 수도 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 TNFα 관련 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가적인 치료제와 함께 공동제형하고/하거나 공동투여한다. 예를 들면, 본 발명의 항-hTNFα 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제를, 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가적인 항체 (예: 다른 사이토카인에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체), 하나 이상의 사이토카인, 가용성 TNFα 수용체[참조: PCT 공보 제WO 94/06476] 및/또는 hTNFα 생산 또는 활성을 억제하는 하나 이상의 화학 제제 (예: PCT 공보 제WO 93/19751호에 기술된 사이클로헥산-일이덴 유도체)와 함께 공동제형하고/하거나 공동투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 다른 TNFα 억제제를 2개 이상의 상기 치료제와 함께 사용할 수 있다. 이러한 병용 요법은 유리하게 저용량의 투여형 치료제를 사용함으로써, 다양한 단독요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0258] 항체, 항체 부분 또는 다른 TNFα 억제제와 함께 본 발명의 치료 방법에서 병용될 수 있고 본 발명의 방법에 따

라 평가될 수 있는 치료제의 비제한적 예에는 다음이 포함된다: 비-스테로이드계 항염증 약물(들) (NSAID); 사이토카인 억제성 항염증 약물(들) (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (인간화된 항-TNFα 항체; 판매원: Celltech/Bayer); cA2/인플릭시맙 (키메릭 항-TNFα 항체; 판매원: Centocor); 75 kdTNFR-IgG/에타네르셉트 (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; 판매원: Immunex)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A]; 55 kdTNF-IgG (55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; 판매원: Hoffmann-LaRoche]; IDEC-CE9.1/SB 210396 (비-결실성 영장류화된 항-CD4 항체; 판매원: IDEC/SmithKline)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185]; DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2 (IL-2 융합 단백질; 판매원: Seragen)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223]; Anti-Tac (인간화된 항-IL-2Rα; 판매원: Protein Design Labs/Roche); IL-4 (항염증성 사이토카인; 판매원: DNAX/Schering]; IL-10 (SCH 52000; 재조합 IL-10, 항염증성 사이토카인; 판매원: DNAX/Schering); IL-4; IL-10 및/또는 IL-4 효능제 (예: 효능제 항체); IL-1RA (IL-1 수용체 길항제; 판매원: Synergen/Amgen); 아나킨라(anakinra) (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (가용성 TNF 결합 단백질)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42]; R973401 (포스포디에스테라제 제4형 억제제)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282]; MK-966 (COX-2 억제제)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81]; 일로프로스트(Iloprost) [참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S82]; 메토트렉세이트; 탈리도마이드[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282] 및 탈리도마이드 관련 약물 (예: Celgen); 레플루노미드 (항염증성 및 사이토카인 억제제)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107]; 트라넥삼산 (플라스미노겐 활성화의 억제제)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284]; T-614 (사이토카인 억제제)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282]; 프로스타글란딘 E1[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282]; 테니답(Tenidap) (비-스테로이드계 항염증성 약물)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S280]; 나프록센(Naproxen) (비-스테로이드계 항염증성 약물)[참조: *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213]; 멜록시캄(Meloxicam) (비-스테로이드계 항염증성 약물); 이부프로펜(Ibuprofen) (비-스테로이드계 항염증성 약물); 피록시캄(Piroxicam) (비-스테로이드계 항염증성 약물); 디클로페낙(Diclofenac) (비-스테로이드계 항염증성 약물); 인도메타신(Indomethacin) (비-스테로이드계 항염증성 약물); 설파살라진[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281]; 아자티오프린(Azathioprine)[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281]; ICE 억제제 (효소 인터루킨-1β 전환 효소의 억제제); zap-70 및/또는 lck 억제제 (티로신 키나제 zap-70 또는 lck의 억제제); VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제 (혈관 내피 세포 성장인자 또는 혈관 내피 세포 성장인자 수용체의 억제제; 혈관신생의 억제제); 코르티코스테로이드 항염증성 약물 (예: SB203580); TNF-컨버타제 억제제; 항-IL-12 항체; 항-IL-18 항체; 인터루킨-11[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S296]; 인터루킨-13[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S308]; 인터루킨-17 억제제[참조: *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S120]; 금; 페니실라민; 클로로퀸; 하이드록시클로로퀸; 클로람부실; 사이클로스포린; 사이클로포스파미드; 전체 림프양 조사(total lymphoid irradiation); 항-흉선세포 글로불린; 항-CD4 항체; CD5-독소; 경구투여형 펜티드 및 콜라겐; 로벤자리트 디나트륨(lobenzarit disodium); 사이토카인 조절제 (CRAs) HP228 및 HP466[판매원: Houghten Pharmaceuticals, Inc.]; ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오티드 (ISIS 2302; 판매원: Isis Pharmaceuticals, Inc.); 가용성 보체 수용체 1 (TP10; 판매원: T Cell Sciences, Inc.); 프레드니손; 오르고테인(orgotein); 글리코스아미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체; 해양 및 식물 지질 (어류 및 식물 종자 지방산)[참조: DeLuca *et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777]; 오라노핀(auranofin); 페닐부타존; 메클로페남산; 플루페남산; 정맥내 면역 글로불린; 질루톤(zileuton); 아자리빈; 미코페놀산 (RS-61443); 타크롤리무스 (FK-506); 시롤리무스 (라파마이신); 아미프릴로스 (테라펙틴(therafectin)); 클라드리빈 (2-클로로데옥시아데노신); 메토트렉세이트; 항바이러스제; 및 면역 조절제. 임의의 상기 제제를 본 발명의 TNFα 항체와 함께 투여하여, 본 발명의 수회 가변 용량 또는 단일 용량 치료 방법을 사용하여 TNFα 관련 장애를 치료할 수 있다.

[0259] 한가지 양태에서, 본 발명은 TNFα 활성이 유해한 TNFα 관련 장애의 치료를 위한 다음 제제 중 하나와 함께 TNF 억제제의 효능을 측정하기 위한 제품 또는 치료 방법을 포함한다: 치료 단백질로서 항-IL12 항체 (ABT 874); 항-IL18 항체 (ABT 325); LCK의 저분자 억제제; COT의 저분자 억제제; 항-IL1 항체; MK2의 저분자 억제제; 항-CD19 항체; CXCR3의 저분자 억제제; CCR5의 저분자 억제제; CCR11의 저분자 억제제; 항-E/L 셀렉틴

항체; P2X7의 저분자 억제제; IRAK-4의 저분자 억제제; 글루코코르티코이드 수용체의 저분자 효능제; 항-C5a 수용체 항체; C5a 수용체의 저분자 억제제; 항-CD32 항체; 및 CD32.

[0260] 또다른 양태에서, 본 발명은 항생제 또는 항감염제와 함께 TNF 억제제의 효능을 측정하기 위한 제품 또는 치료 방법을 포함한다. 항감염제에는 바이러스, 진균, 기생충 또는 세균 감염을 치료하는 것으로 당업계에 공지된 제제가 포함된다. 본원에서 사용되는 "항생제"라는 용어는 미생물의 성장을 억제하거나 사멸시키는 화학 물질을 말한다. 이 용어에는 미생물에 의해 생산되는 항생제 뿐만 아니라, 당업계에 공지된 합성 항생제 (예: 유사체)도 포함된다. 항생제에는 클라리트로마이신 (Biaxin®), 시프로플록사신 (Cipro®) 및 메트로니다졸 (Flagyl®)이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0261] 다른 양태에서, 본 발명은 크론병(Crohn's disease) 또는 크론 관련 장애를 치료하는데 사용되는 약물과 함께 TNF 억제제의 효능을 측정하기 위한 제품 또는 치료 방법을 포함한다. 크론병을 치료하는데 사용될 수 있는 치료제의 예에는 메살아민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토퓨린, 인플릭시맙, 부데소니드, 설파살라진, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로핀 설페이트, 로페라미드 하이드로클로라이드, 메토트렉세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/덱스트로스-물, 하이드로코돈 비타르트레이트/아세트아미노펜(apap), 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노니드, 메트로니다졸, 티메로살/붕산, 히오스시아민 설페이트(hyoscyamine sulfate), 콜레스티라민/수크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 설파메톡사졸/트리메토프림, 셀레콕십, 폴리카보필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 종합비타민, 발살라지드 디나트륨, 코데인 포스페이트/아세트아미노펜, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 나탈리주맙, 메틸프레드니솔론, 인터페론-감마 및 사르그라모스팀 (GM-CSF)이 포함된다. 한가지 양태에서, 메토트렉세이트는 크론병의 치료를 위하여 1주일에 2.5mg 내지 30mg의 용량으로 투여된다.

[0262] TNFα 항체는 국소 코르티코스테로이드, 비타민 D 유사체 및 국소 또는 경구 레티노이드 또는 이의 조합물과 함께 건선 치료용으로 투여될 수 있다. 또한, TNFα 항체를 다음의 건선 치료용 제제 중 하나와 함께 투여할 수 있다: KDR의 저분자 억제제 (ABT-123), Tie-2의 저분자 억제제, 칼시포트리엔, 클로베타솔 프로피오네이트, 트리암시놀론 아세토니드, 할로베타솔 프로피오네이트, 타자로텐, 메토트렉세이트, 플루오시노니드, 증가된 베타메타손 디프로프, 플루오시놀론, 아세토니드, 아시트레틴, 타르 샴푸, 베타메타손 발레레이트, 모메타손 푸로에이트, 케토코나졸, 프라목신/플루오시놀론, 하이드로코르티손 발레레이트, 플루란드레놀리드, 우레아, 베타메타손, 클로베타솔 프로피오네이트/연화제, 플루티카손 프로피오네이트, 아지트로마이신, 하이드로코르티손, 보습 포뮬라, 엽산, 데소니드, 콜타르, 디플로라손 디아세테이트, 에타네르셉트, 폴레이트, 락트산, 메톡살렌, hc/비스무트(bismuth) 서브갈/즈녹스/레조(subgal/znox/resor), 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 선스크린, 살리실산, 할시노니드, 안트랄린, 클로코르톨론 피발레이트, 석탄 추출물, 콜타르/살리실산, 콜타르/살리실산/황, 데스옥시메타손, 디아제팜, 연화제, 피메크롤리무스 연화제, 플루오시노니드/연화제, 광유(mineral oil)/피마자유/na lact, 광유/땅콩 기름, 석유/이소프로필 미리스테이트, 소랄렌(psoralen), 살리실산, 비누/트리브롬살란, 티메로살/붕산, 셀레콕십, 인플릭시맙, 알레파셉트, 에팔리주맙, 타크롤리무스, 피메크롤리무스, PUVA, UVB 및 기타 광선요법(phototherapy), 및 설파살라진.

[0263] 한가지 양태에서, 본 발명의 TNFα 항체는 장 장애의 치료를 위한 앞서 언급한 제제 중 하나와 함께 AS의 치료를 위한 수회 가변 용량 투여 방법을 사용하여 투여한다. 다른 양태에서, 앞서 언급한 추가적인 제제를 본 발명의 단일 투여 치료 방법에서 TNFα 항체와 함께 사용한다. 또다른 양태에서, TNFα 항체를 격주 투여 방법으로 투여한다.

[0264] 앞서 언급한 치료제 중 어느 하나를, 단독으로 또는 이와 함께, 수회 가변 용량 치료 방법을 사용하여 TNFα 항체와 함께 TNFα가 유해한 TNFα 관련 장애를 겪고 있는 피험자에게 투여할 수 있다. 한가지 양태에서, 앞서 언급한 치료제 중 어느 하나를, 단독으로 또는 이와 함께, 장 장애를 겪고 있는 피험자에게 TNFα 항체에 더하여 투여하여 류마티스 관절염과 같은 다른 TNFα 관련 장애를 치료할 수 있다. 추가적인 치료제를 상기한 바와 같이 병용 요법에서 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 이로운 효과가 바람직한 본원에서 기술된 다른 징후에서 사용할 수도 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0265] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 실시예는 어떤 방식으로든 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

실 시 예

[0266] ***실시예 1**: 아달리무맙은 활성 강직성 척추염(AS)에서 연골 분해 및 활막염의 바이오마커를 억제시킨다*

[0267] 다음의 연구의 목적은 중등증 내지 중증 AS의 치료에서 아달리무맙의 통제 시험에서 연골 및 골 파괴의 잠재적인 바이오마커 (예: 골 재흡수 마커, 콜라겐 분해 마커 및 활막염 마커)를 분석하는 것이었다. 본 연구에서는 또한 AS 연구 집단에서 TNF 억제제, 즉 아달리무맙이 골 재흡수 마커, 콜라겐 분해 마커 및 활막염 마커 대 CRP (AS에 대한 공지된 마커)의 상관관계에 미치는 효과를 분석하려고 노력하였다.

[0268] *방법*

[0269] 하나 이상의 NSAID 또는 DMARD에 대한 반응이 불충분하였던 활성 AS 환자들은 본 연구에 등록되는데 적합하였다. 연구 설계는 도 1에 제시되어 있다. 환자에게 처음 24주의 이중 맹검(double-blind) 기간 및 이후 80주의 개방 표지(open label) 기간 동안 격주로(eow) 위약 또는 아달리무맙 40mg을 피하로(sc) 무작위로 투여하였다. 3개의 바이오마커를 기저선에서 그리고 아달리무맙 또는 위약을 사용한 치료 후 12 및 24주에 분석하였다. 구체적으로, 골 재흡수 바이오마커인 혈청 제1형 콜라겐 N-텔로펩티드(NTX), 콜라겐 분해 바이오마커인 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드 (뇨 CTX-II) 및 활막염 바이오마커인 혈청 매트릭스 메탈로프로테아제 3 (MMP3)을 분석하였다. 따라서, 1차 효능 변수에는 AS 평가 (ASAS; ASsessment in AS) 작업 그룹 기준, Bath AS 질환 활성 지수 (BASDAI) 및 CRP가 포함되었다. ELISA에 의해, 뇨 제2형 콜라겐 C-텔로펩티드 (뇨 CTX-II), 혈청 제1형 콜라겐 N-텔로펩티드 (NTX) 및 혈청 MMP3의 농도를 각각의 환자에 대해 기저선에서 그리고 12 및 24주에 측정하였다. 각각의 치료 그룹에서 기저선으로부터의 농도 차이 뿐만 아니라, 상기 바이오마커의 변화와 기타 AS 결과 간의 상관관계를 측정하였다.

[0270] 환자 포함 기준에는 다음이 포함되었다: 18세 이상의 환자; 다음의 3개의 기준 중 2개 이상의 충족으로 정의되는 활성 AS: (1) BASDAI 점수 ≥ 4, (2) 전체 요통에 대한 시각 상사 척도 (VAS; Visual Analog Scale) 점수 ≥ 4, 및 (3) 아침 강직(morning stiffness) ≥ 1 시간; 및 하나 이상의 NSAID에 대한 불충분한 반응.

[0271] 환자 제외 기준에는 다음이 포함되었다: 이전에 항-TNF 치료를 받음; 전체 척추 강직 (대나무 척추)의 방사선학적 증거; 기저선의 4주 이내에 이전의 DMARD의 사용 (메토트렉세이트, 설파살라진 또는 하이드록시클로로퀸 제외); 기저선의 4주 이내에 코르티코스테로이드를 사용한 관절내 관절 주사; 및 기저선의 6주 이내에 다른 생물제제 또는 연구적 치료의 사용.

[0272] *결과*

[0273] 총 82명의 환자를 등록시켰다: 44명의 위약 환자 대 38명의 아달리무맙 환자. 총 82명의 환자 중 80명 (98%)의 환자가 24주 기간을 완료하였다. 24주 기간을 완료하지 못한 2명의 환자는 위약 그룹의 환자였다. 기저선 특징은 처리 그룹 간에 유사하였다. 기저선 인구통계를 아래 표 1에 제시한다.

표 1

기저선 인구 통계

	위약 (N=44)	아달리무맙 40 mg 격주 (N=38)
연령 (세)†	40.0	41.9
인종 (% 코카서스계)	42 (95.5)	37 (97.4)
성별 (% 남성)	36 (81.8)	29 (76.3)
체중 (kg) †	78.2	76.1
AS 의 지속기간 (년) †	12.1	14.5
CRP (mg/dL) †	2.3	1.8
NTX (nm/bce) †	9.77	10.5
뇨 CTX-II 농도 (ng/ml)	388.2	324.8
MMP-3 (ng/ml) †	57.1	25.3

[0274]

[0275] 연구에 속한 모든 환자에서, CRP 수준은 기저선에서 뇨 CTX-II, MMP3 및 NTX의 수준과 유의적으로 관련이 있었다. CRP와 뇨 CTX-II 수준 간의 상관관계는 CRP와 MMP3 및 NTX 수준 간의 상관관계보다 높았다. 기저선에서 바이오마커와 CRP의 상관관계를 아래 표 2에서 제시한다.

표 2

기저선에서 바이오마커와 CRP 의 상관관계

기저선에서 모든 환자	r = 상관계수 (N, *p*-값)		
	뇨 CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.71 (80,<0.001)	0.45 (81,<0.001)	0.37 (80, 0.001)
뇨 CTX-II	-	0.27 (79, 0.015)	0.49 (78, <0.001)

r = 상관계수

N = 환자 수

[0276]

[0277] 뇨 CTX-II 및 MMP3 농도의 유의적인 감소 (아래 표 3에 제시됨)가 아달리무맙 대 위약 환자에서 12 및 24주에 나타났지만 ($p<0.001$), NTX의 경우에는 유의적인 차이가 없었다.

표 3

뇨 CTX-II 및 MMP3 의 유의적인 감소

바이오마커	내원	아달리무맙 그룹의 변화 (%)	위약 그룹의 변화 (%)
뇨 CTX-II	12 주	-76.8 (-9.6)	43.8 (22.2)
	24 주	-64.7 (3.2)	47.4 (29.8)
MMP3	12 주	-3.9 (-12.3)	12.4 (18.9)
	24 주	-3.2 (-8.6)	12.5 (20.1)

[0278]

[0279] 도 2에 제시된 바와 같이, 아달리무맙 환자는 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 뇨 CTX-II 수준의 유의적인 감소를 보였다. 아달리무맙 환자는 또한 도 3에 제시된 바와 같이, 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 MMP3 수준의 통계적으로 유의적인 감소를 보였다. CRP 수준은 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 아달리무맙 환자에서 유의적으로 감소하였다 (도 4 참조).

[0280] 기저선에서 12주까지의 CRP, 뇨 CTX-II 및 MMP-3 수준의 변화는 아달리무맙 그룹에서 통계적으로 유의적으로 관련이 있었다. 유의적인 상관관계가 기저선 CRP와 1) 뇨 CTX-II ($r = 0.71$), 2) MMP3 ($r = 0.45$) 및 3) NTX ($r = 0.37$) 간에 ($p \leq 0.001$), 그리고 뇨 CTX-II와 NTX 간에 ($r = 0.49$; $p < 0.0001$) 기록되었다. 뇨 CTX-II 및

MMP3의 12주 변화는 CRP의 변화와 유의적으로 관련이 있었다 (각각 r = 0.40 및 r = 0.43) (p ≤ 0.005). 또한, 뇨 CTX-II의 12주 변화는 MMP3의 변화와 유의적으로 관련이 있었다 (r = 0.41, p<0.0001). 아달리무맙 그룹에서, 상관관계 분석으로 CRP 수준의 향상이 뇨 CTX-II 및 MMP-3 수준의 감소와 관련이 있다는 것이 확인된다. 12주에 기저선으로부터의 CRP 및 바이오마커 변화 간의 상관관계를 아래 표 2에 제시한다.

표 4

12 주에 기저선으로부터 CRP 및 바이오마커 변화 간의 상관관계

위약	R = 상관계수 (N, *p*-값†)		
	뇨 CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.21 (42, 0.172)	0.34 (44, 0.023)	0.08 (43, 0.629)
뇨 CTX-II	--	0.45 (42, 0.003)	0.27 (41, 0.089)
아달리무맙	뇨 CTX-II	MMP3	NTX
CRP	0.41 (38, 0.010)	0.37 (37, 0.024)	0.08 (37, 0.620)
뇨 CTX-II	--	0.15 (37, 0.375)	0.10 (37, 0.540)

[0281]

[0282] 결론적으로, 중등증 내지 중증 AS 환자에서, 아달리무맙은 활막염 및 연골 기질 분해를 반영하는 바이오마커를 유의적으로 억제시켰다. 아달리무맙은 활막염 및 연골 기질 분해를 반영하는 바이오마커 (MMP3 및 뇨 CTX-II)의 억제를 유도하여, 아달리무맙이 AS와 관련된 구조적 손상을 늦춘다는 것을 시사하였다. 또한, 뇨 CTX-II 및 MMP3의 변화는 CRP의 변화와 유의적으로 상관관계가 있었다.

[0283] **균등물**

[0284] 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여, 본원에서 기술된 본 발명의 특정 양태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 다음의 청구항에 포함된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 실시예 1에 기술된 연구의 설계를 보여준다.

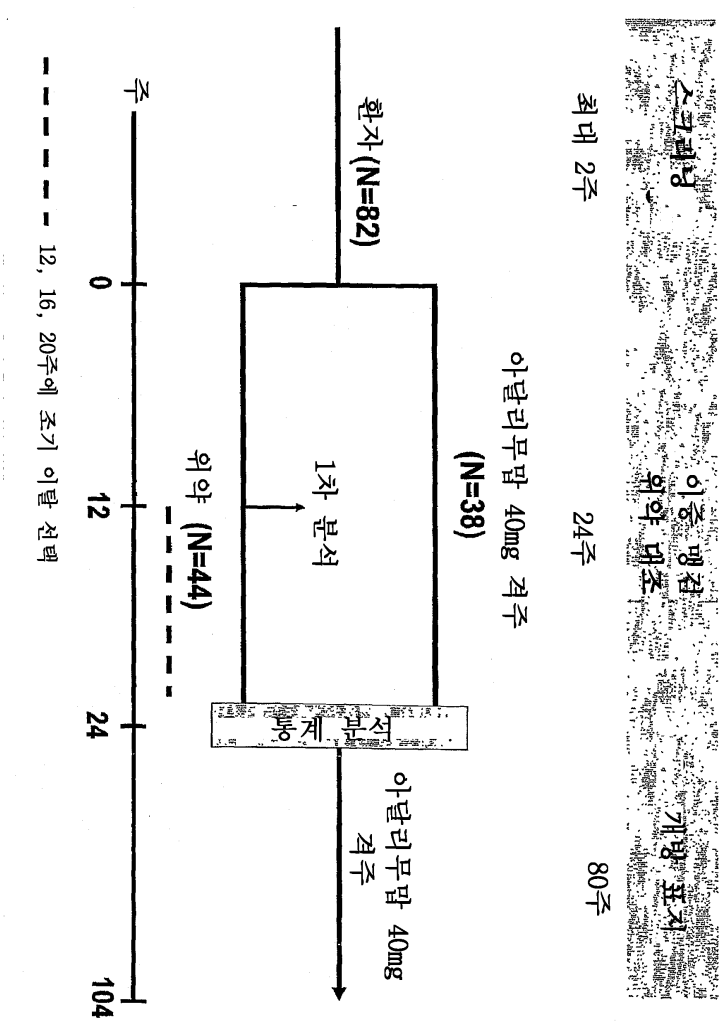
[0068] 도 2는, 아달리무맙 환자가 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 뇨 CTX-II 수준의 유의적인 감소를 경험함을 나타내는 그래프를 보여준다.

[0069] 도 3은, 아달리무맙 환자가 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 MMP3 수준의 통계적으로 유의적인 감소를 경험함을 나타내는 그래프를 보여준다.

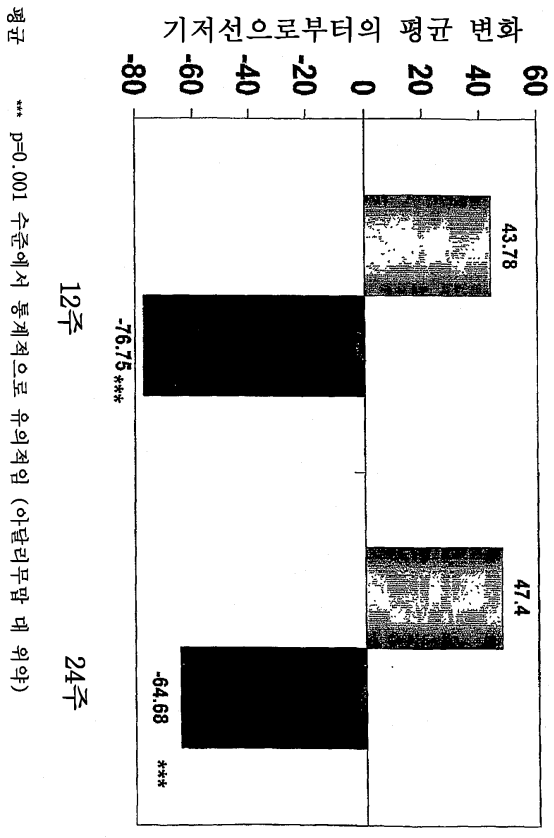
[0070] 도 4는 CRP 수준이 12주 및 24주에 위약 환자와 비교하여 아달리무맙 환자에서 유의적으로 감소되었다는 것을 나타내는 그래프를 보여준다.

도면

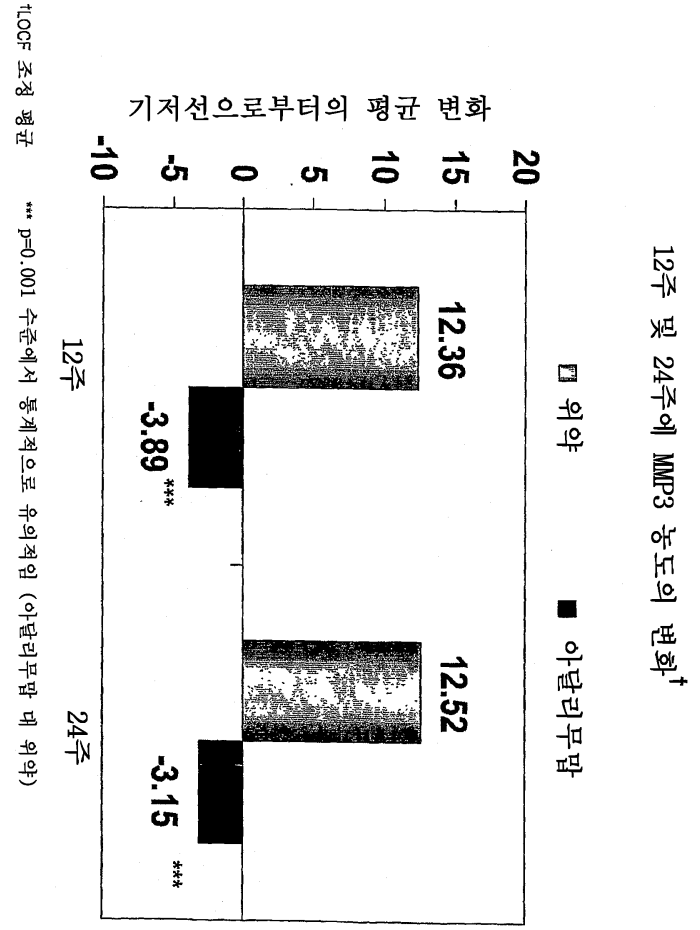
도면1


스크리닝
최대 2주
이중 맹검
위약 대조
24주
개방 표지
80주
환자 (N=82)
아달리무맙 40mg 격주
(N=38)
1차 분석
위약 (N=44)
아달리무맙 40mg
격주
주
0
12
24
104
12, 16, 20주에 조기 이탈 선택

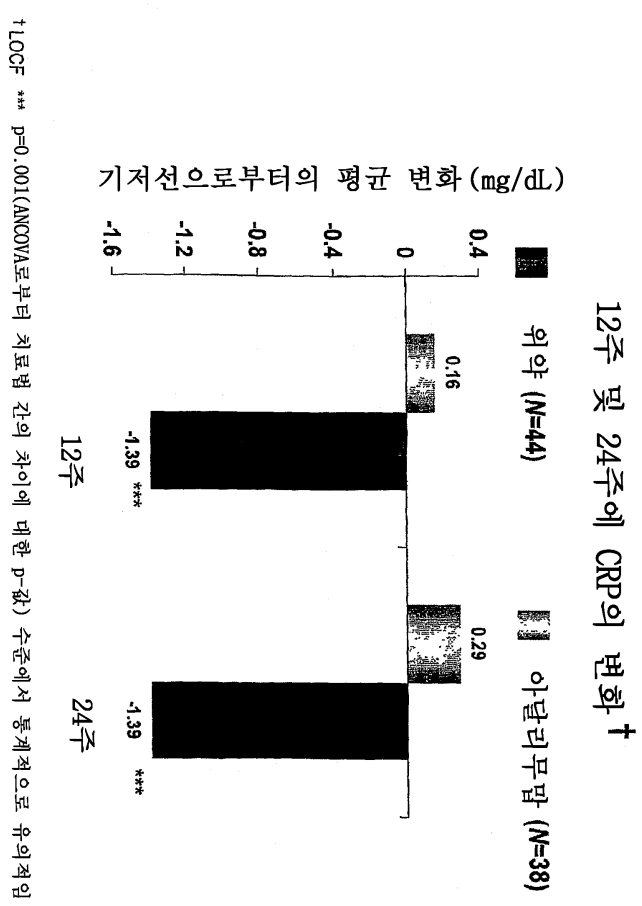
도면2


12주 및 24주에 CTX-II 농도의 변화†
위약
아달리무맙
기저선으로부터의 평균 변화
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
43.78
47.4
-76.75 ***
-64.68 ***
12주
24주
†LOCF 조정 평균
*** p=0.001 수준에서 통계적으로 유의적임 (아달리무맙 대 위약)

도면3


12주 및 24주에 MMP3 농도의 변화†
위약
아달리무맙
기저선으로부터의 평균 변화
20
15
10
5
0
-5
-10
12.36
12.52
-3.89***
-3.15***
12주
24주
†LOCF 조정 평균
*** p=0.001 수준에서 통계적으로 유의적임 (아달리무맙 대 위약)

도면4



서 열 목 록

<110> Abbott Biotechnology Ltd.

<120> Methods and compositions for diagnosing ankylosing spondylitis using biomarkers

<130> BBI-235PC

<150> US 60/732,444
<151> 2005-11-01

<160> 37

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 light chain variable region

<400> 1

```
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 Gly Ile Arg 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 Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 heavy chain variable region

<400> 2

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
```

115 120

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 light chain variable region CDR3

<221> VARIANT
<222>)9
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 3
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 heavy chain variable region CDR3

<221> VARIANT
<222> 12
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 4
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 light chain variable region CDR2

<400> 5
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1   5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 heavy chain variable region CDR2

<400> 6
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1   5   10   15
Gly

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 light chain variable region CDR1

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
 1   5   10

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 heavy chain variable region CDR1

<400> 8
Asp Tyr Ala Met His
 1   5

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2SD4 light chain variable region

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
                85   90   95
Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2SD4 heavy chain variable region

<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20   25   30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

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

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2SD4 light chain variable region CDR3

<400> 11
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1   5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EP B12 light chain variable region CDR3

<400> 12
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1   5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL10E4 light chain variable region CDR3

<400> 13
Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL100A9 light chain variable region CDR3

<400> 14
Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLL100D2 light chain variable region CDR3

<400> 15
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLL0F4 light chain variable region CDR3

<400> 16
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L0E5 light chain variable region CDR3

<400> 17
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
 1   5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLLOG7 light chain variable region CDR3

<400> 18
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
 1   5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLLOG9 light chain variable region CDR3

<400> 19
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLLOH1 light chain variable region CDR3

<400> 20
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
 1   5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VLLOH10 light chain variable region CDR3

<400> 21
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
 1   5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL1B7 light chain variable region CDR3

<400> 22
Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
 1   5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL1C1 light chain variable region CDR3

<400> 23
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL0.1F4 light chain variable region CDR3

<400> 24
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL0.1H8 light chain variable region CDR3

<400> 25
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L0E7.A light chain variable region CDR3

<400> 26
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1   5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 2SD4 heavy chain variable region CDR3

<400> 27
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
 1   5   10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1B11 heavy chain variable region CDR3

<400> 28
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
 1   5   10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1D8 heavy chain variable region CDR3

<400> 29
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
 1   5   10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1A11 heavy chain variable region CDR3

<400> 30
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
 1   5   10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1B12 heavy chain variable region CDR3

<400> 31
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
 1   5   10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1E4 heavy chain variable region CDR3

<400> 32
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
 1   5   10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1F6 heavy chain variable region CDR3

<400> 33
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
 1   5   10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3C-H2 heavy chain variable region CDR3

<400> 34
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr

1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VH1-D2.N heavy chain variable region CDR3

<400> 35
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 light chain variable region

<400> 36
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 37
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> D2E7 heavy chain variable region

<400> 37
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360

agt 363