



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0099228  
(43) 공개일자 2013년09월05일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7020073(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2005년06월02일  
심사청구일자 2013년08월28일
- (62) 원출원 특허 10-2006-7025348  
원출원일자(국제) 2005년06월02일  
심사청구일자 2010년06월01일
- (85) 번역문제출일자 2013년07월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2005/019641
- (87) 국제공개번호 WO 2005/117978  
국제공개일자 2005년12월15일
- (30) 우선권주장  
60/576,993 2004년06월04일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 다발성 경화증의 치료 방법

### (57) 요 약

특정 복용 요법 및 프로토콜을 사용하여 CD20 항체로 다발성 경화증 (MS)을 치료하는 방법이 기술된다. 이같은 방법에서 사용하기 위한 제조품 또한 기술된다.

대 표 도 - 도1a



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

CD20 항체가 약 0.5 내지 4 g의 초기 항체 노출에 이어서 약 0.5 내지 4 g의 2차 항체 노출을 제공하기에 유효한 양으로 대상에게 투여되고, 2차 노출은 초기 노출로부터 약 16 내지 60주까지 제공되지 않고, 각각의 항체 노출은 1회 또는 2회 용량의 항체로 대상에게 제공되는 것인, 대상에서 다발성 경화증을 치료하기 위한 방법.

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 특정 복용 요법 및 프로토콜을 사용하여 대상(對象)에서 다발성 경화증(MS)을 치료하는 방법, 및 이 같은 용도를 위한 사용설명서가 있는 제조품에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] **다발성 경화증**

[0003] 다발성 경화증 (MS)은 인간 중추 신경계 (CNS)의 염증성 및 탈수초성 퇴행성 질환이다. 이는 미국에서 약 300,000명의 사람에게 영향을 미치는 세계적인 질환이다; 이는 청년기의 질환으로, 70%-80%가 20세 내지 40세 사이에 발병된다 ([Anderson et al. Ann Neurology 31(3):333-6 (1992)]; [Noonan et al. Neurology 58:136-8 (2002)]). MS는 임상 경과, 자기 공명 영상화 (MRI) 스캔 평가, 및 생검 및 부검 재료의 병리학 분석을 기초로 하는 이질적인 장애이다 (Lucchinetti et al. Ann Neurol 47:707-17 (2000)). 이 질환은 척수, 뇌간, 뇌 신경, 소뇌, 뇌, 및 인지 증후군을 포함하여 다수의 가능한 조합으로 스스로 징조를 나타낸다. 특히 25년 전망이 포함되는 경우에, 진행성 장애는 대부분의 MS 환자의 운명이다. MS 환자 중 절반은 발병 15년 이내에 걷기 위해 지팡이를 필요로 한다. MS는 청년 및 중년에서 신경학적 장애의 주요 원인이고, 지난 10년 동안 공지된 이로운 치료법이 없었다. MS는 비-특이적 임상 소견으로 인해 진단하기가 어렵고, 이는 MRI 스캔, 유발 전위, 및 뇌척수액 (CSF) 연구로 구성되는 여러 기술적인 진보를 포함하는 고도로 구조화된 진단 기준의 개발에 이르게 하였다. 모든 진단 기준은 상이한 시간에 발생하고 감염, 혈관 장애 또는 자가면역 장애와 같은 다른 병인에 의해 설명되지 않는 중추 백색질에서의 산란된 병변의 일반적인 원리에 의존한다 (McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)). MS에는 4가지 패턴의 질환이 있다: 재발-완화성 MS (RRMS; 발병시 사례의 80%-85 %), 1차 진행성 MS (PPMS; 발병시 10%-15%), 진행 재발성 MS (PRMS; 발병시 5%); 및 2차 진행성 MS (SPMS) ([Kremenchutzky et al. Brain 122 (Pt 10):1941-50 (1999)]; [Confavreux et al. N Engl J Med 343(20):1430-8 (2000)]). RRMS 환자의 약 50%는 10년 내에 SPMS로 발달될 것이고, RRMS 환자의 90%까지는 결국 SPMS로 발달될 것이다 (Weinshenker et al. Brain 112(Pt 1):133-46 (1989)).

[0004] 현재, 4가지 클래스 내의 6개의 약물이 RRMS의 치료용으로 미국에서 승인되어 있는 반면, PPMS에 대해서는 승인된 약물이 없다. RRMS 치료약에는 하기의 것들이 포함된다: 인터페론 클래스, IFN-베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 및 IFN-베타-1b (BETASERON®); 글라티라며 아세테이트 (COPAXONE®), 폴리펩티드; 나탈리주맙 (TYSABRI®); 및 미톡산트론 (NOVANTRONE®), 세포독성제. 코르티코스테로이드, 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 및 정맥내 (IV) 면역글로불린을 포함하여 기타 약물이 다양한 정도로 성공적으로 사용되어 왔다. 현재 승인된 치료약의 이점은 최근의 2개의 베타-분석에 의해 제안된 바와 같이 RRMS에서의 장애의 예방 및 재발율에 대해 비교적 적당하다 (~30%) (Filippini et al. Lancet 361 :545-52 (2003)).

[0005] 다른 임상 연구에서는 종양 괴사 인자-α 억제제 및 변형 웨პ티드 리간드가 포함되는 다른 면역조절제가 MS에서 평가되었고, 이는 MS를 개선시키기 보다는 악화시켰다 ([Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Neurology 53:457-65 (1999)]; [Bielekova et al. Nat Med 2000;6:1167-75 (2000)] ([Nat Med 6:1412 (2000)]에는 오류가 있음)).

[0006] MS 병태생리학의 우세한 견해는 염증이 CD4+ Th1 T 세포에 의해 주로 매개된다고 생각하여 왔다. 이러한 이론을 기초로 한 치료적 접근법 예컨대 IFN-베타 및 글라티라며 아세테이트는 장애의 축적 또는 악화의 발생을 감소시키지만, 완전히 예방하지는 않는다.

- [0007] MS에 대한 진단 기준에 CSF 올리고클로날 밴드 및 증가된 경막내 IgG 합성을 포함하는 것에 의해 증명되는 바와 같이, 인간 MS에서의 체액 성분의 존재는 수십년 동안 암시적으로 인식되어 왔다 ([Siden A. J Neurol 221:39-51(1979)]; [McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)]; [Andersson et al. Eur J Neurol 9:243-51 (2002)]; [O'Connor, P. Neurology 59:S1-33 (2002)]). 올리고클로날 밴드, 증가된 유리 경쇄, 및 증가된 경막내 IgM 합성의 존재는 MS 질환 활성과 상호관련되고, 더욱 심각한 결과의 예보자일 수 있다 ([Rudick et al. Mult Scler 1:150-5 (1995)]; [Zeman et al. Acta Cytol 45:51-9 (2001)]; [Izquierdo et al. Acta Neurol Scand 105:158-63 (2002)]; [Wolinsky J. J Neurol Sci 206:145-52 (2003)]; [Villar et al. Ann Neurol 53:222-6 (2003)]).
- [0008] 항-미엘린 항체 (미엘린 염기성 단백질 (MBP) 및 미엘린 회소돌기아교세포 당단백질 (MOG))가 진행성 및 재발성 형태의 MS 환자의 혈청에서 검출되었다 ([Reindl et al. Brain 122:2047-56 (1999)]; [Egg et al. Mult Scler 7(5):285-9 (2001)]). 항-미엘린 항체는 또한 MS 환자의 CSF에서 검출되었다 ([Reindl et al. Brain 122:2047-56 (1999)]; [Egg et al. Mult Scler 7(5):285-9 (2001)]; [Andersson et al. Eur J Neurol 9:243-51 (2002)]). 추가적인 유형의 항체 예컨대 항-캥글리오사이드 항체 또는 항-신경 세사 항체가 MS 환자에서 관찰되었다 ([Mata et al. Mult Scler 5:379-88 (1999)]; [Sadatipour et al. Ann Neurol 44:980-3 (1998)]). 최근의 보고는 혈청 항-MOG 및 항-MBP 항체의 존재가 임상적으로 단리된 탈수초성 이벤트로부터 명확한 RRMS로 진행되는 것의 강력한 예보자임을 나타냈다 (Berger et al. N Engl J Med 349:139-45 (2003)). 악화를 겪는 것에 대한 조정 위험율은 양쪽 항체 모두에 양성혈청인 환자에 대해 76.5였고, 항-MOG에 대해서만 양성혈청인 환자에 대해서는 31.6였다.
- [0009] 국제 병리학 협회는, MS 병변에서 또한 발견된 형질세포 및 B 세포와 함께, 미엘린에 결합된 항체가 대다수의 MS 환자에 존재한다는 것을 발견하였고, 이는 MS에서의 체액 역할에 대한 추가적인 증거를 제공한다 ([Prineas and Wright, Lab Invest 38:409-21 (1978)]; [Esiri M. Neuropathol Appl Neurobiol 6:9-21 (1980)]; [Genain et al. Nat Med 5:170-5 (1999)]; [Lucchinetti et al. Ann Neurol 47:707-17 (2000)]; [Wingerchuk et al. Lab Invest 81:263-81 (2001)]). B 세포는 MS 환자의 CSF에서 검출가능하고, 비교적 높은 비율의 B 세포의 존재는 더욱 심각한 장애 진행의 전조가 될 수 있다 (Cepok et al. Brain 124(Pt 11):2169-76 (2001)).
- [0010] RRMS 또는 안간대-간대성 근경련 증후군 대상에서, 리툭시맙(Rituximab)은 모든 대상에서 말초 B 세포를 결핍시키고, 일부 환자에서 CSF B 세포의 수를 감소시킨 것으로 보고되었다 ([Pranzatelli et al. Neurology 60(Suppl 1) P05.128:A395 (2003)]; [Cross et al. "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" (abstract) Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis ACTRIMS 20-1 (October, 2003)]). 또한 [Cree et al. "Tolerability and Effects of Rituximab "Anti-CD20 Antibody" in Neuromyelitis Optica and Rapidly Worsening Multiple Sclerosis" Meeting of the Am. Acad. Neurol. (April, 2004)] 참조.
- [0011] **CD20 항체 및 이를 사용한 요법**
- [0012] 림프구는 조혈 프로세스 동안 골수에서 생산되는 많은 유형의 백혈구 중 하나이다. 림프구에는 2가지 주요 집단이 있다: B 림프구 (B 세포) 및 T 림프구 (T 세포). 본원에서 특히 흥미로운 림프구는 B 세포이다.
- [0013] B 세포는 골수 내에서 성숙되어, 이의 세포 표면 상에 항원-결합 항체를 발현하면서 골수를 떠난다. 나이브 (naive) B 세포가 이의 막-결합 항체가 특이적인 항원을 최초로 만나면, 세포가 급속하게 분열하기 시작하여, 이의 자손이 메모리(memory) B 세포 및 "형질 세포"로 칭해지는 이펙터(effectector) 세포로 분화된다. 메모리 B 세포는 수명 기간이 더 길고, 원래의 어버이 세포와 동일한 특이성을 갖는 막-결합 항체를 계속 발현한다. 형질 세포는 막-결합 항체를 발현하지 않지만, 대신 분비될 수 있는 형태의 항체를 생산한다. 분비된 항체는 체액성 면역의 주요 이펙터 분자이다.
- [0014] CD20 항원 (인간 B-림프구-제한 분화 항원, Bp35으로도 또한 칭해짐)은 프리(pre)-B 및 성숙 B 림프구 상에 위치한 분자량이 약 35 kD인 소수성 막형단 단백질이다 ([Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989)]; 및 [Einfeld et al. EMBO J. 7(3):711-717 (1988)]). 이 항원은 90 %를 조과하는 B-세포 비-Hodgkin (non-Hodgkin) 림프종 (NHL) 상에서 발현되지만 (Anderson et al. Blood 63(6):1424-1433 (1984)), 조혈 줄기 세포, 프로(pro)-B 세포, 정상 형질 세포 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 (Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)). CD20은 세포-주기 개시 및 분화를 위한 활성화 프로세스에서의 초기 단계 (들)를 조절하고 (Tedder et al., 상기 문헌), 아마도 칼슘 이온 채널로 기능한다 (Tedder et al. J. Cell

Biochem. 14D:195 (1990)).

[0015] B-세포 림프종에서의 CD20의 발현이 주어지면, 이러한 항원은 이같은 림프종의 "표적화"를 위한 후보물질로 작용할 수 있다. 본질적으로, 이같은 표적화는 하기와 같이 일반화될 수 있다: B 세포의 CD20 표면 항원에 특이적인 항체가 환자에게 투여된다. 이러한 항-CD20 항체는 정상 B 세포 및 악성 B 세포 모두 (표면 상으로)의 CD20 항원에 특이적으로 결합한다; CD20 표면 항원에 결합된 항체는 신생물 B 세포의 파괴 및 결핍에 이를 수 있다. 추가적으로, 종양을 파괴하는 잠재력을 갖는 화학 작용제 또는 방사성 표지가 작용제가 신생물 B 세포에 특이적으로 "전달"되도록 항-CD20 항체에 접합될 수 있다. 접근법과 상관없이, 1차 목표는 종양을 파괴하는 것이다; 구체적인 접근법은 사용된 특정 항-CD20 항체에 의해 결정될 수 있고, 따라서 CD20 항원을 표적화하기 위한 이용가능한 접근법은 상당하게 변할 수 있다.

[0016] 리툭시맙 (RITUXAN®) 항체는 CD20 항원에 대해 지시된, 유전자 조작된 키메라 마우스/인간 모노클로날 항체이다. 리툭시맙은 1998년 4월 7일 허여된 미국 특허 제5,736,137호 (Anderson et al.)에서 "C2B8"으로 청해진 항체이다. RITUXAN®은 재발된 또는 무반응 저악성 또는 소포형, CD20 양성, B-세포 비-호지킨 림프종 환자의 치료에 지시되었다. 작용 연구의 시험관내 메카니즘은 RITUXAN®이 인간 보체에 결합하여 보체-의존성 세포독성 (CDC(complement-dependent cytotoxicity))을 통해 림프모양 B-세포주를 용해시킨다는 것을 나타냈다 (Reff et al. Blood 83(2):435-445 (1994)). 추가적으로, 이는 항체-의존성 세포형 세포독성 (ADCC(antibody-dependent cellular cytotoxicity))을 갖는다. 더욱 최근에는, RITUXAN®은, 다른 항-CD19 및 CD20 항체와는 달리, 삼중수소화 티미딘 흔입 분석법에서 항-증식 효과를 갖고, 세포자멸사를 직접적으로 유도하는 것으로 나타났다 (Maloney et al. Blood 88(10):637a (1996)). RITUXAN®과 화학요법 및 독소 간의 상승작용 또한 실험적으로 관찰되었다. 특히, RITUXAN®은 약물-저항성 인간 B-세포 림프종 세포주를 독소루비신, CDDP, VP-16, 디프테리아 독소 및 리신의 세포독성 효과에 민감하게 한다 (Demidem et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997)). 생체내 임상전 연구는 RITUXAN®이 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이의 말초 혈관, 림프절, 및 골수로부터, 아마도 보체 및 세포-매개 프로세스를 통해, B 세포를 결핍시킨다는 것을 나타냈다 (Reff et al., Blood 83(2):435-445 (1994)).

[0017] 리툭시맙은 4회 용량에 대해 주1회 375 mg/m<sup>2</sup>의 용량으로 재발된 또는 무반응 저악성 또는 소포형 CD20<sup>+</sup> B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL) 환자의 치료용으로 1997년 11월에 미국에서 승인되었다. 2001년 4월에는, 미국 식품의약안전청 (FDA)은 저악성 NHL의 치료를 위한 추가적인 청구를 승인하였다: 재치료 (4회 용량에 대해 주1회) 및 추가적인 복용 요법 (8회 용량에 대해 주1회). 300,000명을 초과하는 환자가 단독요법으로서 또는 면역억제제 또는 화학요법 약물과의 조합된 리툭시맙에 노출되었다. 또한 환자들은 2년까지 유지 치료법으로서 리툭시맙으로 치료되었다 ([Hainsworth et al. J Clin Oncol 21:1746-51 (2003)]; [Hainsworth et al. J Clin Oncol 20:4261-7 (2002)]).

[0018] 리툭시맙은 B 세포 및 자가항체가 질환 병태생리학에서 역할을 하는 것으로 나타난 다양한 비-악성 자가면역 장애에서 또한 연구되었다 (Edwards et al., Biochem Soc Trans 30:824-828 (2002)). 리툭시맙은 류마티스 관절염 (RA) ([Leandro et al. Ann Rheum Dis. 61:883-8 (2002)]; [Emery et al., Arthritis Rheum 48(9):S439 (2003)]), 루푸스 ([Eisenberg R. Arthritis Res Ther 5:157-9 (2003)]; [Leandro et al. Arthritis Rheum 46:2673-7 (2002)]), 면역 혈소판감소 자색반 (D'Arena et al. Leuk Lymphoma 44:561-2 (2003), 자가면역성 빈혈 (Zaja et al. Haematologica 87:189-95 (2002) ([Haematologica 87:336 (2002)]에는 오류가 있음), 자가면역성 신경병증 (Pestronk et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:485-9 (2003)), 부신생물 안간대-간대성 근경련 증후군 (Pranzatelli et al. Neurology 60(Suppl1) P05.128:A395 (2003)), 및 재발-완화성 다발성 경화증 (RRMS) (Cross et al. (abstract) Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-1 (2003)의 정후 및 증상을 잠재적으로 경감시키는 것으로 보고되었다.

[0019] 제II상 연구 (WA16291)가 류마티스 관절염 (RA) 환자에서 수행되어, 리툭시맙의 안정성 및 효능에 대한 48-주 추적조사(follow-up) 데이터를 제공하였다. [Emery et al. Arthritis Rheum 48(9):S439 (2003)]; [Szczepanski et al. Arthritis Rheum 48(9):S121 (2003)]. 총 161명의 환자를 4가지 치료 병기로 무작위로 고르게 나누었다: 메토트렉세이트, 리툭시맙 단독, 리툭시맙 + 메토트렉세이트, 및 리툭시맙 + 시클로포스파미드 (CTX). 리툭시맙의 치료 요법은 1일 및 15일에 1 g을 정맥내에 투여하는 것이었다. 대부분의 RA 환자에서의 리툭시맙의 주입은 대부분의 환자에서 잘 허용되었고, 36 %의 환자는 최초 주입 동안 한가지 이상의 유해 사례를 겪었다 (플라시보를 수여받은 30 %의 환자와 비교). 전반적으로, 대부분의 유해 사례는 경미하여 중증도가 온건한 것으로 간주되었고, 모든 처리 군에 대해 균형을 잘 이루었다. 48주에 걸쳐 4개의 병기에서 19

개의 심각한 유해 사례가 있었고, 이는 리툭시맙/CTX 군에서 더욱 빈번하였다. 감염 발생은 모든 군에 대해 균형을 잘 이루었다. 이러한 RA 환자 집단에서의 심각한 감염의 평균 비율은 100 환자-년 당 4.66이었고, 이는 커뮤니티를 기초로 하는 역학 연구에서 보고된 RA 환자에서 병원 입원을 필요로 하는 감염 비율 (100 환자-년 당 9.57)보다 낮다 (Doran et al., *Arthritis Rheum.* 46:2287-93 (2002)).

- [0020] 자가면역성 신경병증 (Pestronk et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:485-9 (2003)), 안간대/간대성 근경련 증후군 (Pranzatelli et al. *Neurology* 60(Suppl1) P05.128:A395 (2003)), 및 RRMS (Cross et al. *Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS (abstract)* Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis ACTRIMS 20-1 (October, 2003))가 포함되는 소수의 신경 장애 환자에서의 리툭시맙의 보고된 안정성 프로파일은 종양학 또는 RA에서 보고된 것과 유사하였다. RRMS 대상에서의 인터페론-베타 (IFN-베타) 또는 글라티라며 아세테이트와 조합된 리툭시맙의 진행중인 연구자-스폰서 시도 (IST: investigator-sponsored trial)에서 (Cross et al., 상기 문헌), 치료된 대상 10명 중 1명은 리툭시맙의 최초 주입 후 중등도의 열 및 오한을 겪은 후에 약간 관찰을 위해 병원에 입원하였고, 나머지 9명은 4가지의 주입 요법을 어떠한 보고된 유해 사례도 없이 완료하였다.
- [0021] CD20 항체에 관한 특허 및 특허 공보에는 미국 특허 제5,776,456호, 제5,736,137호, 제5,843,439호, 제6,399,061호, 및 제6,682,734호, 뿐만 아니라 US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson et al.); 미국 특허 제6,455,043호, US 2003/0026804, 및 WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez 및 White); WO 2000/27433 및 US 2004/0213784 (Grillo-Lopez 및 Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO 2001/10461 (Rastetter 및 White); WO 2001/10460 (White 및 Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna 및 Hariharan); US 2002/0006404 및 WO 2002/04021 (Hanna 및 Hariharan); US 2002/0012665 및 WO 2001/74388 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan 및 Hanna); US 2002/0009444 및 WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C.); US 2002/0128488 및 WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); WO 2002/096948 (Braslawsky et al.); WO 2002/079255 (Reff 및 Davies); 미국 특허 제6,171,586호 및 WO 1998/56418 (Lam et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, 미국 특허 제6,194,551호, 미국 특허 제6,242,195호, 미국 특허 제6,528,624호 및 미국 특허 제6,538,124호 (Idusogie et al.); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd et al.); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al.); US 2002/0004587 및 WO 2001/77342 (Miller 및 Presta); US 2002/0197256 (Grewal, I.); US 2003/0157108 (Presta, L.); WO 04/056312 (Lowman et al.); US 2004/0202658 및 WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan, A.); US 2005/0032130A1 (Beresini et al.); US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); 미국 특허 제 6,565,827호, 제 6,090,365호, 제6,287,537호, 제6,015,542호, 제5,843,398호, 및 제5,595,721호, (Kaminski et al.); 미국 특허 제 5,500,362호, 제5,677,180호, 제5,721,108호, 제6,120,767호, 및 제6,652,852호 (Robinson et al.); 미국 특허 제6,410,391호 (Raubitschek et al.); 미국 특허 제6,224,866호 및 WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); US2005/0079174A1 (Barbera-Guillem et al.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930 및 WO 2000/74718 (Goldenberg 및 Hansen); US 2003/0219433 및 WO 2003/68821 (Hansen et al.); WO2004/058298 (Goldenberg 및 Hansen); WO 2000/76542 (Golay et al.); WO 2001/72333 (Wolin 및 Rosenblatt); 미국 특허 제6,368,596호 (Ghetie et al.); 미국 특허 제6,306,393호 및 US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner 및 Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar et al.); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US 2002/0009427, 및 US 2003/0185796 (Wolin et al.); WO 2003/061694 (Sing 및 Siegal); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US 2003/0219433 및 WO 2003/068821 (Hansen et al.); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US2002/0136719 (Shenoy et al.); WO 2004/032828 (Wahl et al.); 및 WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter)이 포함된다. 또한 미국 특허 제5,849,898호 및 EP 330,191 (Seed et al.); EP332.865A2 (Meyer 및 Weiss); 미국 특허 제4,861,579호 (Meyer et al.); US2001/0056066 (Bugelski et al.); WO 1995/03770 (Bhat et al.); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al.); WO 2004/035607 (Teeling et al.); US 2004/0093621 (Shitara et al.); WO 2004/103404 (Watkins et al.); WO 2005/000901 (Tedder et al.); US 2005/0025764 (Watkins et al.); WO 2005/016969 및 US 2005/0069545 A1 (Carr et al.); WO 2005/014618 (Chang et al.) 참조. 이들 중 몇개는 다발성 경화증의 치료를 특허 포함한다.
- [0022] 리툭시맙을 사용한 요법에 관련된 공개문헌으로는 하기의 것들이 포함된다: [Perotta and Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab" Abstract #3360 Blood 10(1)(part 1-2): p. 88B

(1998)]; [Stashi et al. "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" *Blood* 98(4):952-957 (2001)]; [Matthews, R. "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001)]; [Leandro et al. "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis* 61:833-888 (2002)]; [Leandro et al. "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. *Arthritis and Rheumatism* 44(9):S370 (2001)]; [Leandro et al. "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism* 46(1):2673-2677 (2002)]; [Edwards and Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001)]; [Edwards et al. "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):824-828 (2002)]; [Edwards et al. "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9):S197 (2002)]; [Levine and Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" *Neurology* 52:1701-1704 (1999)]; [DeVita et al. "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002)]; [Hidashida et al. "Treatment of DMARD-Refactory rheumatoid arthritis with Rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002]; [Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab- refractory rheumatoid arthritis with Rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002]; [Specks et al. "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44(12):2836-2840 (2001)]; [Anolik et al., "B lymphocyte Depletion in the Treatment of Systemic Lupus (SLE): Phase I/II Trial of Rituximab (RITUXAN®) in SLE" *Arthritis And Rheumatism*, 46(9), S289-S289 Abstract 717 (October, 2002)], 및 [Albert et al., "A Phase I Trial of Rituximab (ant-CD20) for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus" *Arthritis And Rheumatism*, 48(12):3659-3659, Abstract LB9 (December, 2003)]; [Martin and Chan "Pathogenic Roles of B cells in Human Autoimmunity: Insights from the Clinic" *Immunity* 20:517-527 (2004)].

## 발명의 내용

- [0023] **발명의 개요**
- [0024] 본 발명에는 다발성 경화증, 예컨대 PPMS 또는 RRMS 대상에서 안전하고 활성인 치료 요법을 제공하는 CD20 항체에 대한 용량을 선택하는 것이, 적어도 부분적으로, 수반된다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 약 0.5 내지 4 g의 초기 항체 노출에 이어서 약 0.5 내지 4 g의 2차 항체 노출을 제공하기 위해 유효량의 CD20 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 2차 노출은 초기 노출로부터 약 16 내지 60 주까지 제공되지 않으며, 각각의 항체 노출은 1회 또는 2회 용량의 항체로 대상에게 제공되는, 대상에서 다발성 경화증을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 (a) CD20 항체를 포함하는 용기; 및 (b) 대상에서 다발성 경화증을 치료하기 위한 사용설명서로서, 약 0.5 내지 4 g의 초기 항체 노출에 이어서 약 0.5 내지 4 g의 2차 항체 노출을 제공하기에 효과적인 양의 항체가 대상에게 투여되고, 2차 노출은 초기 노출로부터 약 16 내지 60 주까지 제공되지 않으며, 각각의 항체 노출은 1회 또는 2회 용량의 항체로 대상에게 제공되는 것을 지시하는 사용설명서가 있는 포장 삽입물을 포함하는 제조품에 관한 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1A는 각각의 마우스 2H7 (서열 1), 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 2), 및 인간 카파 경쇄 아군 I (서열 3)의 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )의 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7.v16의  $V_L$ 의 CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 4), CDR2 (서열 5), 및 CDR3 (서열 6).
- 도 1B는 각각의 마우스 2H7 (서열 7), 인간화 2H7.v16 변이체 (서열 8), 및 중쇄 아군 III의 인간 컨센서스 서열 (서열 9)의 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )의 아미노산 서열을 비교하는 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7.v16의  $V_H$ 의

CDR은 하기와 같다: CDR1 (서열 10), CDR2 (서열 11), 및 CDR3 (서열 12).

도 1A 및 도 1B에서, 각각의 사슬 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3은, 표시된 바와 같이, 프레임워크 영역 FR1-FR4이 플랭킹되어(flanked) 팔호 내에 넣어진다. 2H7은 마우스 2H7 항체를 지칭한다. 2개의 열의 서열 간의 별표는 두 서열 간에 상이한 위치를 가리킨다. 잔기 번호매김은 [Kabat et al. Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 따른 것이고, 삽입은 a, b, c, d, 및 e로 표시된다.

도 2는 성숙형 2H7.v16 경쇄의 아미노산 서열 (서열 13)을 나타낸다.

도 3은 성숙형 2H7.v16 중쇄의 아미노산 서열 (서열 14)을 나타낸다.

도 4는 성숙형 2H7.v31 중쇄의 아미노산 서열 (서열 15)을 나타낸다. 2H7.v31의 L 사슬은 2H7.v16에 대한 것과 동일하다.

도 5는, Kabat 가변 도메인 잔기 번호매김 및 Eu 불변 도메인 잔기 번호매김으로, 성숙형 2H7.v16 및 2H7.v511 경쇄 (각각 서열 13 및 16)의 정렬을 나타낸다.

도 6은, Kabat 가변 도메인 잔기 번호매김 및 Eu 불변 도메인 잔기 번호매김으로, 성숙형 2H7.v16 및 2H7.v511 중쇄 (각각 서열 14 및 17)의 정렬을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

#### I. 정의

[0029]

"B-세포"는 골수 내에서 성숙되는 림프구이고, 나이브(naive) B 세포, 메모리(memory) B 세포, 또는 이펙터 (effector) 세포 (형질 세포)가 포함된다. 본원에서의 B-세포는 정상적 또는 비-악성 B 세포일 수 있다.

[0030]

본원에서의 "B-세포 표면 마커" 또는 "B-세포 표면 항원"은 이에 결합하는 항체가 표적으로 할 수 있는 B 세포의 표면 상에서 발현되는 항원이다. 예시적인 B-세포 표면 마커로는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 및 CD86 백혈구 표면 마커가 포함된다 (설명을 위해서는, [The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York] 참조). 기타 B-세포 표면 마커로는 RP105, FcRH2, B-세포 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 및 239287이 포함된다. 본원에서 특히 흥미로운 B-세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B-세포 조직과 비교하여 B 세포 상에서 우선적으로 발현되고, 전구체 B 세포와 성숙형 B 세포 모두에서 발현될 수 있다. 본원에서 바람직한 B-세포 표면 마커는 CD20이다.

[0031]

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

[0032]

본원에서의 "항체 길항제"는, B 세포 상의 B 세포 표면 마커에의 결합 시, 포유동물에서 B 세포를 파괴 또는 결핍시키고/시키거나, 예를 들어 B 세포에 의해 유발되는 체액성 응답을 감소시키거나 방지함으로써, 한가지 이상의 B-세포 기능을 방해하는 항체이다. 바람직하게는 항체 길항제는 이것으로 치료된 포유동물에서 B 세포를 결핍시킬 수 있다 (즉, 순환되는 B-세포 수준을 감소시킬 수 있다). 이같은 결핍은 다양한 메카니즘 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC: complement dependent cytotoxicity), B-세포 증식 억제, 및/또는 B-세포 사멸 유도 (예를 들어, 세포자멸사를 통해 이루어질 수 있다).

[0033]

"항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)을 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc  $\gamma$  RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RII 및 Fc  $\gamma$  RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평

가하기 위하여, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기술된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이같은 분석에 유용한 이펙터 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 추가적으로, 당해 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어, [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0034] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이러한 세포는 적어도 Fc  $\gamma$ RII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구가 포함되고, PBMC와 NK 세포가 바람직하다.

[0035] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연-서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, 이것으로는 Fc  $\gamma$ RI, Fc  $\gamma$ RII 및 Fc  $\gamma$ RIII 서브클래스의 수용체 (이러한 수용체들의 대립유전자 변이체 및 별법적으로 스플라이싱된 형태 포함)가 포함된다. Fc  $\gamma$ RII 수용체에는 Fc  $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체")와 Fc  $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")가 포함되고, 이들은 주로 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc  $\gamma$ RIIA는 세포질 도메인 내에 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc  $\gamma$ RIIB는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 ([Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에 개설되어 있다. 추후에 확인될 것이 포함되는 기타 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어에는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn 또한 포함된다 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0036] "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1성분 (C1q)이 동족 항원과 복합체를 형성한 분자 (예를 들어 항체)에 결합하는 것에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어, [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기술된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

[0037] "성장-억제" 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지하거나 감소시키는 것들이다. 예를 들어, 항체는 B 세포의 증식을 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 방지하거나 감소시킬 수 있다.

[0038] "세포자멸사를 유도"하는 항체는, 표준 세포자멸사 분석법 예컨대 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (세포자멸사체(apoptotic body)로 칭해짐)의 형성에 의해 결정되는 바와 같이, 계획된 세포 사멸, 예를 들어 B 세포의 계획된 세포 사멸을 유도하는 것들이다.

[0039] 본원에서의 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편이 포함된다.

[0040] "항체 단편"은 무손상 항체의 항원-결합 영역을 바람직하게는 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0041] 본원의 목적을 위해, "무손상 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인뿐만 아니라 Fc 영역을 포함하는 것이다.

[0042] 일반적으로 "천연 항체"는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종 사량체성(heterotetrameric) 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 디슬피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디슬피드 연결의 수는 여러 면역글로불린 이소형(isotype)의 중쇄에 따라 다르다. 또한 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적인 간격의 사슬내 디슬피드 다리를 갖는다. 각각의 중쇄는 다수의 불변 도메인이 이어지는 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 한쪽 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)을 갖고 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫번째 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0043] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간에서 서열이 크게 상이하고 각각의 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐

고르게 분포되지 않다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인에서 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은  $\beta$ -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된,  $\beta$ -시트 배열을 주로 채택한 4개의 FR을 포함한다. 각각의 사슬 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른쪽 사슬로부터의 초가변 영역들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 ([Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 데에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포형 세포 독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0044] 항체를 파파인(papain)으로 소화시키면 "Fab" 단편이라고 칭해지는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 나머지 "Fc" 단편이 생성되는데, Fc라는 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신으로 처리하면 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원과 교차결합할 수 있는  $F(ab')_2$  단편이 생성된다.

[0045] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 지닌 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유결합으로 결합되어 있는 이량체로 구성된다. 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 규정하는 것은 이러한 배열 때문이다. 총괄적으로, 6개의 초가변 영역이 항원-결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 초가변성 영역만을 포함한 Fv의 절반)도, 비록 전체 결합 부위보다는 낮은 친화력이지만, 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0046] 또한, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은, 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기들이 부가되어 있어서 Fab 단편과 다르다. 본원에서 Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 하나 이상의 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 힌지 시스테인을 사이에 갖는 Fab' 단편들의 쌍으로서 본래 생성되었다. 항체 단편들의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

[0047] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 칭해지는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0048] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 여러 클래스로 지정될 수 있다. 무손상 항체에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 주요 5개 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 칭해진다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 주지되어 있다.

[0049] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는 항체의  $V_H$  및  $V_L$  항체 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는  $V_H$  및  $V_L$  도메인 간의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개관을 위해서는, [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)] 참조.

[0050] 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 사슬 ( $V_H$ - $V_L$ ) 내의 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 의미한다. 동일한 사슬 상의 두 도메인 간에 쌍을 형성하도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루도록 강요되고, 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 디아바디는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0051] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은, 모노클로날 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체들을 제외하고는, 동일하고/하거나 같은 항체에 결합하고, 이같은 변이체들은 일반적으로 미량으로 존재한다. 여러 결정 인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모

노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 이들이 다른 면역글로불린에 오염되지 않은 것이라는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 것이라는 항체의 특성을 가리키는 것이며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 [Kohler et al., *Nature*, 256:495(1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)으로 제조할 수 있다. 또한 "모노클로날 항체"는, 예를 들어, [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991)]에 기술된 기술을 이용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0052] 본원에서의 모노클로날 항체에는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 사슬(들)의 나머지부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린), 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편이 특히 포함된다(미국 특허 제4,816,567호; [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984)]). 본원에서 당해 키메라 항체에는 비-인간 영장류(예를 들어, 구대륙 원숭이, 예컨대 개코원숭이, 붉은털 원숭이 또는 사이노몰거스 원숭이)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화(primitized)" 항체가 포함된다(미국 특허 제5,693,780호).

[0053] 비-인간(예를 들어, 마우스) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 부분에 대해서, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종의 초가변 영역(공여자 항체)으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변경은 항체의 성능을 더욱 정련시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은, 상기 언급된 바와 같은 FR 치환(들)을 제외하고는, 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 또한 인간화 항체는 임의로 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 임의로 포함할 것이다. 추가적인 상세사항은 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)] 참조.

[0054] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0055] "네이키드(naked) 항체"는 이종 분자, 예컨대 세포독성 모이어티(moiety) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체(본원에서 정의된 바와 같음)이다.

[0056] CD20 항원에 결합하는 항체의 예로는 현재 "리툭시맙" ("RITUXAN®")으로 칭해지는 "C2B8" (미국 특허 제5,736,137호); IDEC Pharmaceuticals, Inc.에서 시판하는, "Y2B8" 또는 "이브리튜모맙 티وخ세탄(Ibrutumomab Tiuxetan)" (ZEVALIN®)으로 명명된 이트륨-[90]-표지 2B8 마우스 항체(미국 특허 제5,736,137호; 2B8은 ATCC 접속 번호 HB11388로 1993년 6월 22일 기탁됨); "토시튜모맙(Tositumomab)"으로 또한 칭해지는 마우스 IgG2a "B1" (임의로 <sup>131</sup>I로 표지되어, Corixa에서 시판하는 "<sup>131</sup>I-B1" 또는 "요오드 I131 토시튜모맙" 항체(BEXXAR™)이 생성됨) (또한 미국 특허 제5,595,721호 참조); 마우스 모노클로날 항체 "1F5" (Press et al. *Blood* 69(2):584-591 (1987)) 및 "프레임워크 패치(patched)" 또는 인간화 1F5이 포함되는 이의 변이체(W003/002607, Leung, S.; ATCC 기탁 HB-96450); 마우스 2H7 및 키메라 2H7 항체(미국 특허 제5,677,180호); 인간화 2H7; huMax-CD20 (Genmab, Denmark, WO2004/035607); AME-133 (Applied Molecular Evolution); A20 항

체 또는 이의 변이체 예컨대 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각 cA20, hA20) 또는 IMMU-106 (US 2003/0219433, Immunomedics); US 2005/0069545 A1 및 WO 2005/16969 (Carr et al.)에서와 같이, IL-2가 임의로 결합된, 에피토프-결핍 Leu-16, 1H4, 또는 2B8이 포함되는, CD20-결합 항체; CD22 및 CD20에 결합하는 이중 특이적 항체, 예를 들어, hLL2xhA20 (WO2005/14618, Chang et al.); International Leukocyte Typing Workshop으로부터 입수 가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 (Valentine et al., Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p446, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma et al. Blood 92:184 (1998)); 항-CD20 아우리스타틴(auristatin) E 결합체 (Seattle Genetics); 항-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); 항-CD20 MAb 요법 (EpiCyte); 및 항-CD20 항체 TRU 015 (Trubion)가 포함된다.

[0057] 본원에서의 용어 "리툭시맙" 및 "RITUXAN®"은 CD20 항원에 대해 지시되고 미국 특허 제5,736,137호에서 "C2B 8"으로 명명된, 유전자 조작된 키메라 마우스/인간 모노클로날 항체를 지칭하고, CD20에 결합하는 능력이 유지된 이의 단편이 포함된다. 리툭시맙은 Genentech에서 시판한다.

[0058] 순수하게 본원에서의 목적을 위해, "인간화 2H7"은 인간 CD20에 결합하는 인간화 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭하고, 이때 항체는 생체내에서 영장류 B 세포를 결핍시키는 데 효과적이고, 항체는 H 사슬 가변 영역 ( $V_H$ ) 내에 적어도 항-인간 CD20 항체로부터의 서열 12 (도 1B)의 CDR H3 서열 및 실질적으로 인간 중쇄 아군 III ( $V_H$  III)의 인간 컨센서스 프레임워크 (FR) 잔기를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 항체는 서열 10의 H 사슬 CDR H1 서열 및 서열 11의 CDR H2 서열을 추가로 포함하고, 더욱 바람직하게는 서열 4의 L 사슬 CDR L1 서열, 서열 5의 CDR L2 서열, 서열 6의 CDR L3 서열 및 실질적으로 인간 경쇄 아군 I (VI)의 인간 컨센서스 프레임워크 (FR) 잔기를 포함하고, 이때  $V_H$  영역은 인간 IgG 사슬 불변 영역에 연결될 수 있고, 이 영역은, 예를 들어, IgG1 또는 IgG3일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이같은 항체는 서열 8의  $V_H$  서열을 포함하고 (v16, 도 1B에 제시됨), 또한 서열 2의  $V_L$  서열을 임의로 포함하고 (v16, 도 1A에 제시됨), 이는 H 사슬 내의 D56A 및 N100A 및 L 사슬 내의 S92A의 아미노산 치환을 가질 수 있다 (v96). 바람직하게는 항체는 각각 도 2 및 3에 제시된 바와 같은 서열 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 무손상 항체이다. 또다른 바람직한 실시양태는 항체가 각각 도 2 및 4에 제시된 바와 같은 서열 13 및 15의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 2H7.v31인 것이다. 아미노산 치환이 S298A/E333A/K334A인 것, 더욱 바람직하게는 서열 15 (도 4에 제시됨)의 중쇄 아미노산 서열을 갖는 2H7.v31와 같이, 본원에서의 항체는 ADCC 및/또는 CDC 활성을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 Fc 영역 내에 추가로 포함할 수 있다. 임의의 이러한 항체들은 CDC 활성을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 Fc 영역 내에 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어, 하나 이상의 치환 K322A를 포함한다. 미국 특허 제6,528,324B1 (Idusogie et al.) 참조.

[0059] 바람직한 인간화 2H7은 하기의 가변 경쇄 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG

[0060] SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

[0061] 및 하기의 가변 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSY  
NQKFKGRFTISVDKSNTLYLQMNLRAEDTAVYYCARVYYNSNSYWFDFVWGQGTLVTV

[0062] SS (SEQ ID NO:8).

[0063] 을 포함하는 무손상 항체 또는 항체 단편이다.

[0064] 인간화 2H7 항체가 무손상 항체인 경우, 바람직하게는 이는 하기의 경쇄 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG

SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKH

KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

[0066] 및 하기의 중쇄 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY  
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVVGQGTLVT  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDLYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNWKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVF  
LFPPPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

[0067] 또는 하기의 중쇄 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY  
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVVGQGTLVT  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDLYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNWKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVF  
LFPPPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNATYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIATISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

[0069] 을 포함한다.

[0070] [0071] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 2H7 버전 16을 기초로 하는 변이체의 가변 영역은 하기 표에 지시되는 아미노산 치환의 위치를 제외하고는 v16의 아미노산 서열을 가질 것이다. 달리 지시되지 않는 한, 2H7 변이체는 v16과 동일한 경쇄를 가질 것이다.

2H7 버전	중쇄 (V <sub>H</sub> ) 변화	경쇄 (V <sub>L</sub> ) 변화	Fc 변화
31			S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N10	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L

[0072]

[0073] "단리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 천연 환경의 오염 성분은 항체가 진단 또는 치료에 사용되는 것을 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시 항체의 95 중량 %를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 서열분석기 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기 15개 이상을 염기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하는 환원 또는 비-환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의한 균질성 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체에는 재조합 세포내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0074]

본원에서의 "대상"은 인간 대상이다. 일반적으로, 대상은 다발성 경화증의 치료에 적합하다. 본원에서의 목적을 위해, 이같은 적합한 대상은 다발성 경화증의 한가지 이상의 징후, 증상 또는 기타 지표를 겪고 있거나, 겪었던, 또는 겪을 것 같은 사람; 예를 들어, 새롭게 진단 ("새롭게 발병된" MS으로 진단)었는지, 기존에 진단되었고 새롭게 재발 또는 악화되었는지, 기존에 진단되었고 완화되었는지 등의 여부와 상관없이, 다발성 경화증으로 진단된 사람; 및/또는 다발성 경화증이 발전될 위험에 있는 사람이다. 다발성 경화증을 앓고 있거나 이에 걸릴 위험이 있는 사람은 혈청, 뇌척수액 (CSF) 및/또는 MS 병변(들) 내의 상승된 수준의 CD20-양성 B 세포에 대해 스크리닝된 사람으로 임의로 확인될 수 있고/있거나, 질적으로, 그리고 바람직하게는 정량적으로 평가된 자가항체를 검출하기 위한 분석법을 사용하는 것에 대해 스크리닝된다. 다발성 경화증과 관련된 이같은 자가항체의 예로는 항-미엘린 염기성 단백질 (MBP), 항-미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG), 항-갱글리오사이드 및/또는 항-신경세사 항체가 포함된다. 이같은 자가항체는 대상의 혈청, 뇌척수액 (CSF) 및/또는 MS 병변에서 검출될 수 있다. "상승된" 자가항체 또는 B 세포 수준(들)은 본원에서 MS에 걸리지 않은 개인에서의

수준(들)을 유의하게 초과하는 이같은 자가항체 또는 B 세포의 수준(들)을 의미한다.

- [0075] 본원에서의 대상의 "치료"는 치료용 처치 및 예방용 또는 방지용 조치 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상에는 이미 다발성 경화증을 앓고 있는 사람들뿐만 아니라, 다발성 경화증을 방지하려는 대상도 포함된다. 따라서, 대상은 다발성 경화증을 앓고 있는 것으로 진단되었을 수 있거나, 또는 다발성 경화증에 걸리기 쉬울 수 있다.
- [0076] MS의 "증상"은 대상이 경험하고 MS의 지표인, 구조, 기능 또는 감각에서의 표준으로부터의 임의의 병적인 현상 또는 이탈이다.
- [0077] "다발성 경화증"은 미엘린의 진행성 파괴를 특징으로 하는 중추신경계의 만성이고 종종 불구이게 하는 질환을 지칭한다. 국제적으로 MS는 4가지 형태로 인식되고, 즉 1차 진행성 다발성 경화증 (PPMS), 재발-완화성 다발성 경화증 (RRMS), 2차 진행성 다발성 경화증 (SPMS), 및 진행 재발성 다발성 경화증 (PRMS)으로 인식된다.
- [0078] "1차 진행성 다발성 경화증" 또는 "PPMS"는 재발 또는 완화가 전혀 중복되지 않으면서 이의 발병으로부터의 질환이 점진적으로 진행되는 것을 특징으로 한다. 질환 활성이 평평하게 되는 기간이 있을 수 있고, 좋고 나쁜 날 또는 주가 있을 수 있다. PPMS는 전형적으로 30대 후반 또는 40대 초반에 발병되고, 여성만큼 남성에서 나타나기 쉬우며, 초기 질환 활성이 종종 뇌가 아니라 척수에 존재한다는 점에서 RRMS 및 SPMS와 상이하다. PPMS는 종종 뇌로 이동하지만, RRMS 또는 SPMS보다는 뇌 영역을 덜 손상시킬 것이다; 예를 들어, PPMS에 걸린 사람들은 인지 문제를 덜 나타낼 것이다. PPMS는 MRI 스캔 상에서 염증성 (가돌리늄 증강) 병변을 가장 적게 나타낼 MS의 아유형이다. 1차 진행성 형태의 질환은 다발성 경화증에 걸린 모든 사람의 10 내지 15%에 영향을 미친다. PPMS는 [McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)]에서의 기준에 따라 정의될 수 있다. 본원에서 치료된 PPMS 대상은 일반적으로 PPMS로 가능 진단(probable diagnosis) 또는 최종 진단된 사람이다.
- [0079] "재발-완화성 다발성 경화증" 또는 "RRMS"는 재발 (악화로 또한 공지됨)을 특징으로 하고, 이 기간 동안에는 새로운 증상이 나타날 수 있고, 기존의 것이 다시 나타나거나 심해질 수 있다. 재발 후에는 완화 기간이 이어지고, 이 기간 동안에는 개인은 재발 동안 취득된 결손으로부터 완전히 또는 부분적으로 회복된다. 재발은 수일, 수주 또는 수개월 동안 지속될 수 있고, 회복은 느리고 점진적이거나 거의 순간적일 수 있다. MS를 나타내는 거의 대부분의 사람들은 우선 RRMS로 진단된다. 이는 이들이 20대 또는 30대일 때 전형적이지만, 더 어리거나 나이들어서 진단된 경우도 공지되어 있다. 남성보다 2배의 여성이 이러한 아유형의 MS를 나타낸다. 재발 동안, 중추 신경계 (CNS)의 백색질 영역 내의 신경 섬유 (뉴런) 둘레의 보호성 절연 쇠쓰(sheath)인 미엘린이 염증성 응답에서 신체 자신의 면역계에 의해 손상될 수 있다. 이는 CNS의 어떤 영역이 손상되었는지에 따라 상당히 다른 광범위한 신경학적 증상을 야기한다. 재발 직후, 염증성 응답은 차차 진정되고, CNS 내의 특별한 유형의 아교 세포 (회소돌기아교세포로 칭해짐)가 축삭 둘레의 미엘린 쇠쓰가 수리될 수 있는 프로세스인 미엘린재형성(remyelination)을 후원한다. 완화를 담당할 수 있는 것은 이러한 미엘린재형성이다. 약 50%의 RRMS 환자가 발병 10년 이내에 SPMS로 전환된다. 30년 후, 이러한 숫자는 90%로 상승된다. 임의의 시기에, 재발-완화성 형태의 질환은 MS에 걸린 모든 사람의 약 55%를 차지한다.
- [0080] "2차 진행성 다발성 경화증" 또는 "SPMS"는 재발 및 미량의 완화 및 정체기(plateau)가 중복되거나 중복되지 않으면서 임상적인 신경학적 손상이 일정하게 진행되는 것을 특징으로 한다. SPMS를 나타내는 사람들은 2년 내지 4년 이상 지속되었을 수 있는 RRMS의 기간을 이전에 겪었을 것이다. 존재하는 모든 중복된 재발 및 완화는 시간이 지남에 따라 차츰 감소하는 경향이 있다. 2차 진행성 단계의 질환이 발병하고부터, 장애가 RRMS 동안 보다 훨씬 더 빠르게 진행되기 시작하지만, 진행은 일부 개인에게서는 여전히 꽤 느릴 수 있다. 10년 후, RRMS에 걸린 사람의 50%가 SPMS로 발전될 것이다. 25년 내지 30년까지는, 이 숫자는 90%로 증가될 것이다. SPMS는 RRMS보다 더 낮은 수준의 염증성 병변 형성과 관련되는 경향이 있지만, 질환의 전체적인 부담은 계속 진행된다. 임의의 시기에, SPMS는 다발성 경화증에 걸린 모든 사람의 약 30%를 차지한다.
- [0081] "진행 재발성 다발성 경화증" 또는 "PRMS"는 재발 및 완화가 중복되면서 임상적인 신경학적 손상이 일정하게 진행되는 것을 특징으로 한다. 재발 직후에는 상당히 회복되지만, 재발들 사이에는 증상들이 점진적으로 악화된다. PRMS는 다발성 경화증에 걸린 모든 사람의 약 5%에 영향을 미친다. 일부 신경학자들은 PRMS가 PPMS의 변종이라고 여기고 있다.
- [0082] "유효량"이라는 표현은 다발성 경화증을 예방하거나, 개선시키거나 또는 치료하는데 효과적인 항체 (또는 기타 약물)의 양을 지칭한다. 일반적으로 이같은 유효량으로 MS의 징후, 증상 또는 기타 지표가 개선될 것이고, 예컨대 재발을 저하, 장애 예방, 뇌 MRI 병변의 수 및/또는 부피의 저하, 타임드 25-풋 워크(timed 25-foot wal

k)의 개선, 질환 진행에 대한 시간의 연장 (예를 들어, EDSS (확장 장애 상태 척도(Expanded Disability Status Scale)를 사용함) 등이 이루어질 것이다.

[0083] "항체 노출"은 약 1-20일의 기간에 걸쳐 투여된 1회 이상의 용량으로 본원에서의 항체와 접촉시키거나 또는 이에 노출시키는 것을 지칭한다. 용량은 이러한 노출 기간에 걸쳐 1회로, 또는 고정되거나 불규칙적인 시간 간격으로 제공될 수 있다. 초기 항체 노출과 추후 (예를 들어 2차 또는 3차)의 항체 노출은 하기에 상세하게 기술되는 바와 같이 서로 시간적으로 분리된다.

[0084] 보조 요법을 위해 본원에서 사용된 용어 "면역억제제"는 본원에서 치료될 포유동물의 면역계를 억제하거나 차폐하는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 사이토카인 생산을 억제하거나, 자가-항원 발현을 하향조절 또는 억제하거나, MHC 항원을 차폐하는 물질이 포함될 것이다. 이같은 면역억제제의 예로는 2-아미노-6-아릴-5-치환 피리미딘 (미국 특허 제4,665,077호 참조); 비스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID); 간시클로비르, 타크로리무스, 글로코코르티코이드 예컨대 코르티솔 또는 알도스테론, 항-염증제 예컨대 시클로옥시게나제 억제제, 5-리폭시게나제 억제제, 또는 류코트리엔 수용체 길항제; 푸린 길항제 예컨대 아자티오프린 또는 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF); 알킬화제 예컨대 시클로포스파미드; 브로모크립틴; 단졸; 텁손; 글루타르알데히드 (미국 특허 제4,120,649호에 기술된 바와 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-개별특이형 항체; 시클로스포린 A; 스테로이드 예컨대 코르티코스테로이드 및 글루코코르티코스테로이드, 예를 들어, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 및 텍사메타손; 디히드로폴레이트 환원효소 억제제 예컨대 메토트렉세이트 (경구 또는 피하); 히드록시클로로퀸; 술파잘라진; 레플루노미드; 항-인터페론-알파, -베타 또는 -감마 항체, 항-종양 괴사 인자-알파 항체 (인플릭시맙(infliximab) 또는 아달리무맙(adalimumab)), 항-TNF-알파 이뮤노어드레신 (이태너셉트(etanercept)), 항-종양 괴사 인자-베타 항체, 항-인터루킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체가 포함되는, 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 길항제; 항-CD11a 및 항-CD18 항체가 포함되는 항-LFA-1 항체; 항-L3T4 항체; 이종 항-립프구 글로불린; pan-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 웨პ티드 (1990년 7월 26일 공개된 WO 90/08187); 스트렙토키나제; TGF-베타; 스트렙토도나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시스페구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (Cohen et al., 미국 특허 제5,114,721호); T-세포 수용체 단편 ([Offner et al. Science, 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Ianeway, Nature, 341:482 (1989)]; 및 WO 91/01133); 및 T 세포 수용체 항체 (EP 340,109) 예컨대 T10B9가 포함된다.

[0085] 본원에서 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  및  $Lu$ 의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 소형-분자 독소와 같은 독소, 또는 이의 단편을 포함하도록 의도된다.

[0086] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학 화합물이다 화학요법제의 예로는 알킬화제 예컨대 티오텐과 및 CYTOXAN® 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸콜로멜라민이 포함되는, 에틸렌이민 및 메틸렌이민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 메팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 엔다이인 항생제 (예를 들어, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마II 및 칼리키아마이신 오메가II (예를 들어, [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994) 참조); 다이네마이신 A가 포함되는 다이네마이신; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색단백질 엔다이인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카라바이신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 텍토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니

그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스유리딘; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스탈론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신제 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀴온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산칼륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아준; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다양류 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 라죽산; 리죽신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아준산; 트리아지퀴온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 아나퀴딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL® 파클리탁셀 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.), ABRAXANE™ 크레모포르-프리, 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), 및 TAXOTERE® 독세탁셀 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; GEMZAR® 겹시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빙크리스틴; NAVELBINE® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 및 임의의 상기 물질들의 제약상 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0087] 이러한 정의에는 종양에서의 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제 예컨대 타목시펜 (NOLVADEX® 타목시펜 포함), 라록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON 토레미펜이 예를 들어 포함되는 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조정제 (SERM); 부신에서의 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN® 액세메스탄, 포르메스타니에, 파드로졸, RIVISOR® 보로졸, FEMARA® 레트로졸, 및 ARIMIDEX® 아나스트로졸; 및 항-안드로겐 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 사이토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로에서의 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어, PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; 백신 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; PROLEUKTN® r IL-2; LURTOTECAN® 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX® rmRH; 및 임의의 상기 물질의 제약상 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 또한 포함된다.

[0088] 용어 "사이토카인"은 또 다른 세포 상에서 세포간 매개자로서 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반명이다. 이같은 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인, 인터루킨 (IL) 예컨대 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; 종양 괴사 인자 예컨대 TNF- $\alpha$  또는 TNF- $\beta$ ; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)가 포함되는 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에 사용된 용어 사이토카인에는, 합성 생산된 소형-분자 실재물 및 이의 제약상 허용가능한 유도체 및 염을 포함하여, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적으로 활성인 등가물이 포함된다.

[0089] 용어 "호르몬"은 폴리펩티드 호르몬을 지칭하고, 이는 관이 있는 샘 기관에 의해 일반적으로 분비된다. 호르몬 중에서, 예를 들어, 성장 호르몬 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 당단백질 호르몬 예컨대 난포-자극 호르몬 (FSH), 갑상선-자극 호르몬 (TSH), 및 황체형성 호르몬 (LH); 프로락틴; 태반 락토겐; 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 물러관-저해 물질; 및 트롬보포이에틴이 포함된다. 본원에서 사용된 용어 호르몬에는, 합성 생산된 소형-분자 실재물 및 이의 제약상 허용가능한 유도체 및 염을 포함하여, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 호르몬의 생물학적으로 활성인 등가물이 포함된다.

- [0090] 용어 "성장 인자"는 성장을 촉진하는 단백질을 지칭하고, 예를 들어, 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 혈관 내피 성장 인자; 신경 성장 인자 예컨대 NGF- $\beta$ ; 혈소판-유래 성장 인자; 전환 성장 인자 (TGF) 예컨대 TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ ; 인슐린형 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론 예컨대 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ , 및 - $\gamma$ ; 및 콜로니 자극 인자 (CSF) 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF), 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF), 및 과립구-CSF (G-CSF)가 포함된다. 본원에서 사용된 용어 성장 인자에는, 합성 생산된 소형-분자 실재물 및 이의 제약상 허용가능한 유도체 및 염을 포함하여, 천연 공급원으로부터 또는 제조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 성장인자의 생물학적으로 활성인 등가물이 포함된다.
- [0091] 용어 "인테그린"은 세포가 세포외 매트릭스에 결합하여 응답하도록 하고, 다양한 세포 기능 예컨대 상처 치유, 세포 분화, 종양 세포의 귀소 및 세포자멸사에 수반되는 수용체 단백질을 지칭한다. 이들은 세포-세포외 매트릭스 및 세포-세포 상호작용에서 수반되는 세포 부착 수용체의 대형 족의 일부이다. 기능성 인테그린은 비-공유결합적으로 결합된, 알파 및 베타로 칭해지는 2개의 막횡단 당단백질 서브유닛으로 구성된다. 알파 서브유닛 모두는 서로 약간의 상동성을 공유하고, 베타 서브유닛도 마찬가지이다. 수용체는 항상 1개의 알파 사슬 및 1개의 베타 사슬을 함유한다. 예로는 알파6베타1, 알파3베타1 및 알파7베타1이 포함된다. 본원에서 사용된 용어 인테그린에는, 합성 생산된 소형-분자 실재물 및 이의 제약상 허용가능한 유도체 및 염을 포함하여, 천연 공급원으로부터 또는 제조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 인테그린의 생물학적으로 활성인 등가물이 포함된다.
- [0092] 본원에서의 "인테그린 길항체 또는 항체"의 예로는 LFA-1 항체 예컨대 Genentech이 시판하는 에팔리주맙 (Efalizumab) (RAPTIV A®); 알파 4 인테그린 항체 예컨대 Biogen이 판매하는 나탈리주맙 (TYSABRI®); 디아자시클릭 페닐알라닌 유도체 (WO 2003/89410); 페닐알라닌 유도체 (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 및 WO 2003/53926); 페닐프로페온산 유도체 (WO 2003/10135); 엔아민 유도체 (WO 2001 /79173); 프로판산 유도체 (WO 2000/37444); 알칸산 유도체 (WO 2000/32575); 치환된 페닐 유도체 (미국 특허 제6,677,339호 및 제6,348,463호); 방향족 아민 유도체 (미국 특허 제6,369,229호); 및 ADAM 디스인테그린 도메인 폴리펩티드 (US2002/0042368), 알파v베타3 인테그린에 대한 항체 (EP 633945); 아자-다리결합(bridged) 2고리형 아미노산 유도체 (WO 2002/02556) 등이 포함된다.
- [0093] 본원에서의 목적을 위해, "종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파)"는 [Pennica et al., Nature, 312:721 (1984)] 또는 [Aggarwal et al., JBC, 260:2345 (1985)]에 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 인간 TNF-알파 분자를 지칭한다.
- [0094] 본원에서의 "TNF-알파 억제제"는, 일반적으로 TNF-알파에 결합하여 이의 활성을 중화시키는 것을 통해, TNF-알파의 생물학적 기능을 어느 정도 억제하는 작용제이다. 본원에서 구체적으로 구현되는 TNF 억제제의 예는 이태너셉트(Etanercept) (ENBREL®), 인플릭시맙(Infliximab) (REMICADE®) 및 아달리무맙(Adalimumab) (HUMIRA™)이다.
- [0095] "질환-변형 항-류마티스 약물" 또는 "DMARD"에는 히드록시클로로퀸, 술파잘라진, 메토트렉세이트, 레플루노미드, 이태너셉트, 인플릭시맙 (더하기 경구 및 피하 메토트렉세이트), 아자티오프린, D-페니실라민, 금 (경구), 금 (근육내), 미노시클린, 시클로스포린, 포도알균 단백질 A 면역흡착 등이 포함된다 (이들의 염 및 유도체 포함) .
- [0096] "비스테로이드성 항-염증 약물" 또는 "NSAID"의 예는 아세틸살리실산, 이부프로펜, 나프록센, 인도메타신, 술린탁, 툴메틴 등이다 (이들의 염 및 유도체 포함).
- [0097] "코르티코스테로이드"는 천연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 이를 증가시키는 스테로이드의 일반 화학 구조를 갖는 여러 합성 또는 천연 발생 물질들 중 임의의 것을 지칭한다. 합성 코르티코스테로이드의 예로는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론 포함), 엑사메타손, 글루코코르티코이드 및 베타메타손이 포함된다.
- [0098] "포장 삽입물"은 치료용 제품의 시판되는 포장에 관례적으로 포함되는 사용설명서를 지칭하기 위해 사용되고, 이같은 치료용 제품의 사용에 관련된 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기, 포장된 제품과 조합되는 다른 치료 제품, 및/또는 경고에 대한 정보를 함유한다.
- [0099] II. 요법
- [0100] 본 발명은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 (바람직하게는 CD20 항체)를 유효량으로 대상에게 투여하는 것을

포함하는, 다발성 경화증을 앓고 있는 대상에서 다발성 경화증을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 치료될 MS에는 1차 진행성 다발성 경화증 (PPMS), 재발-완화성 다발성 경화증 (RRMS), 2차 진행성 다발성 경화증 (SPMS), 및 진행 재발성 다발성 경화증 (PRMS)이 포함되지만, PPMS 또는 RRMS의 요법이 본원에서 바람직한 실시 형태이다.

- [0101] 바람직한 투여 프로토콜에 따르면, 본 발명의 방법은 약 0.5 내지 4 g (바람직하게는 약 1.5 내지 2.5 g)의 초기 항체 노출에 이어 약 0.5 내지 4 g (바람직하게는 약 1.5 내지 2.5 g)의 2차 항체 노출을 제공하기 위해 MS 대상에게 유효량의 CD20 항체를 투여하는 것을 포함하고, 2차 항체 노출은 초기 항체 노출로부터 약 16 내지 60 주까지 제공되지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, 2차 항체 노출은 초기 항체 노출 후 대상이 CD20 항체로 치료되는 다음 시간이며, 초기 노출과 2차 노출 사이에는 CD20 항체 치료 또는 노출이 개입되지 않는다.
- [0102] 초기 노출과 2차 또는 후속 항체 노출 간의 간격은 초기 항체 노출의 1차 또는 2차 용량에서부터 측정될 수 있지만, 바람직하게는 초기 항체 노출의 1차 용량에서부터 측정된다.
- [0103] 본원에서의 바람직한 실시양태에서, 항체 노출은 약 24주 또는 6개월 떨어지거나; 약 48주 또는 12개월 떨어진다.
- [0104] 한 실시양태에서, 2차 항체 노출은 초기 노출로부터 약 20 내지 30주까지 제공되지 않고, 임의로 약 0.5 내지 4 g (바람직하게는 약 1.5 내지 2.5 g)의 3차 노출이 이어지고, 3차 노출은 초기 노출로부터 약 46 내지 60주 (바람직하게는 약 46 내지 54주)까지 투여되지 않고, 이어서 바람직하게는 초기 노출로부터 적어도 약 70-75주까지 추가적인 항체 노출이 제공되지 않는다.
- [0105] 별법적인 실시양태에서, 2차 항체 노출은 초기 노출로부터 약 46 내지 60주까지 제공되지 않고, 후속 항체 투여는, 존재한다면, 이전의 항체 노출로부터 약 46 내지 60주까지 제공되지 않는다.
- [0106] 본원에서의 1회 이상의 항체 노출은 단일 용량의 항체로서, 또는 2회의 분리된 용량의 항체 (즉 1차 및 2차 용량으로 구성됨)로서 제공될 수 있다. 각각의 항체 노출에 대해 사용된 특정 횟수의 용량 (1회 또는 2회)는, 예를 들어, 치료될 MS의 유형, 사용된 항체의 유형, 2차 약제가 사용되었는지 여부와 사용된 2차 약제의 유형, 및 투여 방법 및 빈도에 따라 좌우된다. 2회의 분리된 용량이 투여되는 경우, 2차 용량은 바람직하게는 1차 용량이 투여된 시간으로부터 약 3 내지 17일, 더욱 바람직하게는 약 6 내지 16일, 가장 바람직하게는 약 13 내지 16일에 투여된다. 2회의 분리된 용량이 사용되는 경우, 항체의 1차 용량과 2차 용량은 바람직하게는 약 0.5 내지 1.5 g, 더욱 바람직하게는 약 0.75 내지 1.3 g이다.
- [0107] 한 실시양태에서, 대상에게 약 3회 이상, 또는 4회 이상의 항체 노출, 예를 들어, 약 3 내지 60회의 노출, 더욱 특히 약 3 내지 40회의 노출, 가장 특히 약 3 내지 20회의 노출이 제공된다. 바람직하게는, 이같은 노출은 각각 약 24주 또는 6개월, 또는 48주 또는 12개월의 간격으로 투여된다. 한 실시양태에서, 각각의 항체 노출은 단일 용량의 항체로서 제공된다. 별법적인 실시양태에서, 각각의 항체는 2회의 분리된 용량의 항체로 제공된다. 그러나, 모든 항체 노출이 단일 용량 또는 2회의 분리된 용량으로 제공될 필요는 없다.
- [0108] 항체는 네이키드 항체일 수 있거나, 또는 방사성활성 화합물과 같은 세포독성제와 같은 또다른 분자와 접합될 수 있다. 본원에서 바람직한 항체는 리툭시맙, 인간화 2H7 (예를 들어 서열 2 및 8의 가변 도메인 서열 포함) 또는 서열 23 및 24의 가변 도메인 서열을 포함하는 인간화 2H7, 또는 huMax-CD20 (Genmab)이다.
- [0109] 한 실시양태에서, 대상은 다발성 경화증을 치료하기 위해 면역억제제(들)과 같은 약물(들)로 이전에 치료된 적이 없고/없거나 B-세포 표면 마커에 대한 항체로 이전에 치료된 적이 없다 (예를 들어 CD20 항체로 이전에 치료된 적이 없음).
- [0110] 항체는 비경구, 국소, 피하, 복막내, 폐내, 비강내 및/또는 병변내 투여가 포함되는 임의의 적절한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내 또는 피하 투여가 포함된다. 경막내 투여가 또한 구현된다 (예를 들어, [미국 특허 출원 제2002/0009444호, Grillo-Lopez, A concerning intrathecal delivery of CD20 antibody] 참조). 또한, 항체는, 예를 들어, 항체의 용량을 감쇠시키면서, 펠스 주입에 의해 적절하게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 정맥내, 피하 또는 경막내 제공되고, 가장 바람직하게는 정맥내 주입(들)에 의해 제공된다.
- [0111] CD20 항체가 다발성 경화증을 치료하기 위해 대상에게 투여되는 유일한 약물일 수 있지만, 제2약제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제, 면역억제제, 사이토카인, 사이토카인 길항체 또는 항체, 성장 인자, 호르몬, 인테그린, 인테그린 길항체 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체 예컨대 Genentech가 시판하는 에팔리주맙 (RAPTIVA®), 또

는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 Biogen이 판매하는 나탈리주맙 (TYSABRI®)) 등을 B 세포 표면 마커에 결합하는 항체와 함께 (예를 들어 CD20 항체와 함께) 임의로 투여할 수 있다.

[0112] 조합 요법의 바람직한 실시양태에서, 항체는 인터페론 클래스 약물 예컨대 IFN-베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 또는 IFN-베타-1b (BETASERON®); 올리고펩티드 예컨대 글라티라며 아세테이트 (COPAXONE®); 세포독성제 예컨대 미톡산트론 (NOVANTRONE®), 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 클로르암부실, 아자티오프린; 정맥내 면역글로불린 (감마 글로불린); 림프구-결핍 요법 (예를 들어, 미톡산트론, 시클로포스파미드, 캠파스(Campath), 항-CD4, 클라드리빈, 전체 신체 조사(照射), 골수 이식); 전신성 코르티코스테로이드 요법이 포함되는, 코르티코스테로이드 (예를 들어 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 텍사메티손, 또는 글루코르티코이드); 비-림프구-결핍 면역억제 요법 (예를 들어, 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 시클로스포린); 세리바스타틴 (BAYCOL®), 폴루바스타틴 (LESCOL®), 아토바스타틴 (LIPITOR®), 로바스타틴 (MEVACOR®), 프라바스타틴 (PRAVACHOL®), 심바스타틴 (ZOCOR®)이 포함되는 "스타틴" 클래스의 콜레스테롤-저하 약물; 에스트라디올; 테스토스테론 (임의로 상승된 투여량으로; [Stuve et al. Neurology 8:290-301 (2002)]); 호르몬 대체 요법; MS에 대해 2차적인 또는 MS와 관련된 증상 (예를 들어, 경직, 실금, 통증, 피로)의 치료; TNF 억제제; 질환-변형 항-류마티스 약물 (DMARD); 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID); 혈장분리반출술; 레보티록신; 시클로스포린 A; 소마토스타틴 유사체; 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 길항제; 항-대사물질; 면역억제제; 재활 수술; 방사성요오드; 갑상선절제술; 또다른 B-세포 표면 길항제/항체 등과 조합된다.

[0113] 제2약제는 CD20 항체의 초기 노출 및/또는 그후의 노출과 함께 투여되고, 이같은 조합 투여에는 별도의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하는 동시투여, 및 임의 순서의 연속 투여가 포함되고, 연속 투여에서 양쪽 (또는 모든) 활성 작용제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하면서 시간 간격이 존재하는 것이 바람직하다.

[0114] 항체를 대상에게 투여하는 것 이외에, 본 출원에서는 유전자 요법에 의해 항체를 투여하는 것이 구현된다. 항체를 코딩하는 핵산의 이같은 투여는 "유효량"의 항체를 투여하는 것에 포함된다. 예를 들어, 세포내 항체의 생성을 위해 유전자 요법을 사용하는 것에 관해서 1996년 3월 14일 공개된 WO 96/07321 참조.

[0115] 핵산 (임의로 백터 내에 함유됨)을 대상의 세포 내로 넣는 것에 관하여 2가지 주요 접근법이 있다: 생체내 및 생체외. 생체내 전달을 위해서는, 일반적으로 항체가 필요한 부위에, 핵산을 대상에게 직접적으로 주사한다. 생체외 치료를 위해서는, 대상의 세포를 제거하고, 핵산을 이러한 단리된 세포 내로 도입하고, 변형된 세포를 대상에게 직접적으로, 또는, 예를 들어, 대상 내로 이식되는 다공성 막 내에 캡슐화시켜 투여한다 (예를 들어, 미국 특히 제4,892,538호 및 제5,283,187호 참조). 핵산을 살아있는 세포로 도입하는데 이용가능한 다양한 기술이 있다. 이 기술은 핵산이 배양된 세포 내로 시험관내에서 전달되는지 또는 의도된 숙주의 세포에 생체내 전달되는지 여부에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포 내로 시험관내 전달하는데 적절한 기술에는 리포좀, 전기영동, 미세주사, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산칼슘 침전 방법 등의 사용이 포함된다. 유전자의 생체외 전달을 위한 통상적으로 사용되는 백터는 레트로바이러스이다.

[0116] 현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술로는 바이러스 백터 (예컨대 아데노바이러스, 단순 포진 I형 바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스) 및 지질계 시스템 (유전자의 지질-매개 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol이다)이 포함된다. 일부 상황에서는, 표적 세포를 표적으로 하는 작용제, 예컨대 세포-표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등과 함께 핵산 공급원을 제공하는 것이 바람직하다. 리포좀이 사용되는 경우에는, 세포내이입과 관련된 세포-표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어, 특정 세포 유형에 대해 줄성인 캡시드 단백질 또는 이의 단편, 순환시 내재화가 일어나는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 국소화를 표적으로 하고 세포내 반감기를 증강시키는 단백질 등을 표적화에 및/또는 섭취를 용이하게 하는데 사용할 수 있다. 수용체-매개 세포내이입의 기술은, 예를 들어, [Wu et al., J. Biol. Chem, 262:4429-4432 (1987)] 및 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414 (1990)]에 기술되어 있다. 현재 공지된 유전자 마킹(marketing) 및 유전자 요법 프로토콜의 개관에 대해서는, [Anderson et al., Science, 256:808-813 (1992)] 참조. 또한 WO 93/25673 및 이에 인용된 참고문헌 참조.

### III. 항체의 생산

[0118] 본 발명의 방법 및 물품은 B-세포 표면 마커에 결합하는 항체, 특히 CD20에 결합하는 항체를 사용하거나, 또는 항체가 혼입된다. 따라서, 이같은 항체의 생성 방법이 하기에 기술될 것이다.

[0119] 항체의 생산 또는 스크리닝에 사용될 B 세포 표면 마커는, 예를 들어, 원하는 에피토프를 함유하는, 가용성 형태의 항원, 또는 이의 일부일 수 있다. 별법적으로 또는 추가적으로, 마커를 세포 표면에 발현하는 세포를 사

용하여 항체를 생성시키거나 이를 스크리닝할 수 있다. 항체의 생성에 유용한 다른 형태의 B 세포 표면 마커는 당업자에게 명백할 것이다.

[0120] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 생산을 위한 예시적인 기술이 하기에 기술된다.

[0121] (i) 폴리클로날 항체.

[0122] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 애주번트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (라이신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물,  $\text{SOCl}_2$ , 또는  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$  (식중, R 및  $\text{R}^1$ 은 상이한 알킬기이다)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0123] 예를 들어, 100  $\mu\text{g}$  또는 5  $\mu\text{g}$ 의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3배 용량의 프로인트 완전 애주번트와 합하고, 이 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써, 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 동물들을 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 애주번트 내의 웨티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 혈청을 분석한다. 역가가 정체기(plateau)에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교결합 시약을 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅시킨다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 응답을 증강시킨다.

[0124] (ii) 모노클로날 항체.

[0125] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득되고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은, 모노클로날 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체들을 제외하고는, 동일하고/하거나 같은 항체에 결합하고, 이같은 변이체들은 일반적으로 미량으로 존재한다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 개별적인 항체들의 혼합물이 아닌 것으로 항체의 특징을 가리킨다.

[0126] 예를 들어, 모노클로날 항체는 [Kohler et al., Nature, 256:495[1975]]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)으로 제조할 수 있다.

[0127] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 상기 기술한 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 별법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포가 형성된다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0128] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 어버이 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적절한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 어버이 골수종 세포에 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPGRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0129] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 마우스 골수종 세포주, 예컨대 [Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California USA)]로부터 입수 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 [American Type Culture Collection (Rockville, Maryland USA)]으로부터 입수 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 또한, 인간 골수종 및 마우스-인간 혜테로골수종 세포주 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 기술되어 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0130] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관

- 내 결합 분석법, 예컨대 방사선면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)으로 측정한다.
- [0131] 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석법에 의해 측정할 수 있다.
- [0132] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986))에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적으로 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.
- [0133] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0134] 통상적인 방법 (예를 들어, 마우스 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 쉽게 단리하고 서열분석한다. 하이브리도마 세포는 이같은 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 백터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이를 형질감염되지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 생산을 수득한다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 리뷰 논문에는 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)] 및 [Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188(1992)]이 포함된다.
- [0135] 추가적인 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기술된 기술을 사용하여 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991)]에는 파지 라이브러리를 사용한 마우스 및 인간 항체의 단리가 각각 기술되어 있다. 후속적인 문헌들에는 사슬 셔플링(shuffling)에 의한 고친화성 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266(1993))이 기술되어 있다. 따라서, 이러한 기술들은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- [0136] 또한, 예를 들어, 상동성 마우스 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; [Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 DNA를 변형시킬 수 있다.
- [0137] 전형적으로, 이같은 비-면역글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 한 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체가 생성된다.
- [0138] (iii) 인간화 항체
- [0139] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열에 대한 초가변 영역을 치환함으로써 Winter 및 공동 연구자의 방법 ([Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)])에 따라 본질적으로 수행할 수 있다. 따라서, 이같은 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0140] 인간화 항체를 제조하는데 사용되는 인간 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 모두)을 선택하는 것은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "베스트-핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간

서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로서 허용한다 ([Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]). 또 다른 방법에서는 경쇄 또는 중쇄의 특정 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 다수의 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 ([Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)]).

[0141] 항원에 대한 높은 친화성 및 기타 유리한 생물학적 성질을 유지시키면서 항체를 인간화시키는 것 또한 중요하다. 이러한 목적을 이루기 위해, 바람직한 방법에 따라, 어버이 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용한 어버이 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 프로세스에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 당업자가 이용가능하고, 이들에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이러한 디스플레이들의 정밀검사로 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성이 달성되도록 수용자 및 수입 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 조합시킬 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역은 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 관여한다.

[0142] (iv) 인간 항체

[0143] 인간화의 대안으로서, 인간 항체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역화시키면 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉(trnasgenic) 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 영역 ( $J_H$ ) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제되는 것으로 기술되었다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 이같은 생식계열 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접종시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제5,591,669호, 제5,589,369호, 제5,545,807호 참조.

[0144] 별법으로, 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990))을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내에서 생산할 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 M13 또는 fd와 같은 섬유상 박테리오파지의 주요 또는 소수 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임(in-frame) 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로 디스플레이된다. 섬유상 입자가 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 성질을 기초로 하는 선택으로 이러한 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자가 선택된다. 따라서, 파지는 B-세포의 성질을 일부 모방한다. 파지 디스플레이에는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 이의 개관을 위해서는, 예를 들어, [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)] 참조. V-유전자 절편의 다양한 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. [Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이가 단리되었다. 본질적으로 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기술된 기술에 따라, 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체를 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호 참조.

[0145] 또한 인간 항체는 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

[0146] (v) 항체 단편

[0147] 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이러한 단편들은 무순상 항체의 단백질분해성 분해를 통해 유도되었다 (예를 들어, [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편이 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어  $F(ab')_2$  단편이 형성될 수 있다 (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근법

에 따르면,  $F(ab')_2$  단편이 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 기타 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 또 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호 참조. 또한 항체 단편은, 예를 들어, 미국 특허 제5,641,870호에 기술된 것과 같이, "선형 항체"일 수 있다. 이같은 선형 항체 단편은 단일 특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0148] (vi) 이중특이적 항체

[0149] 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 B-세포 표면 마커의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 또 다른 이같은 항체는 B-세포 표면 마커에 결합할 수 있고, 추가로 제2 B-세포 표면 마커에 결합할 수 있다. 별법으로, 세포성 방어 메카니즘이 B 세포에 집중되도록, 항-B 세포 표면 마커 결합 팔(arm)이  $Fc \gamma RI$  (CD64),  $Fc \gamma RII$  (CD32) 및  $Fc \gamma RIII$  (CD16) 과 같은 IgG에 대한  $Fc$  수용체 ( $Fc \gamma R$ ), 또는 T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2 또는 CD3)와 같은 백혈구 상의 축발 분자에 결합하는 팔과 조합될 수 있다. 또한 이중특이적 항체를 사용하여 세포독성제를 B-세포에 국소화시킬 수 있다. 이러한 항체들은 B-세포 표면 마커-결합 팔, 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 라이신(ricin) A 사슬, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 팔을 갖는다. 이중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어,  $F(ab')_2$  이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0150] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현을 기초로 하고, 여기서 두 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성으로 인해, 이러한 하이브리도 마 (쿼드로마(quadroma))는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하고, 이중 하나만이 올바른 이중 특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0151] 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 적어도 일부의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이 바람직하다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체, 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA들을 별도의 발현 벡터에 삽입하고, 적절한 숙주 세포 내로 공-형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 등등하지 않은 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2개 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우 또는 비율이 특별한 의미를 갖지 않는 경우, 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0152] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 팔 내의 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른쪽 팔 내의 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하여 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터의 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 발견되었다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성을 위한 추가적인 상세한 내용은, 예를 들어, [Suresh et al., Methods in Enzymmology, 121:210 (1986)] 참조.

[0153] 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동(cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0154] 이중특이적 항체에는 가교결합된 또는 "이종접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이같은 항체들은, 예를 들어, 면역계

세포를 원치않는 세포에 표적화시키기 위해서 (미국 특허 제4,676,980호), 그리고 HIV 감염의 치료를 위해서 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 다수의 가교결합 기술과 함께, 적절한 가교결합제는 당업계에 주지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 제4,676,980에 개시되어 있다.

[0155] 항체 단편으로부터 이종특이적 항체를 생성시키는 기술 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이종특이적 항체를 제조할 수 있다. [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에는 무순상 항체를 단백질분해적으로 절단시켜  $F(ab')_2$  단편을 생성시키는 방법이 기술되어 있다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시켜 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디술피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된  $Fab'$  단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후  $Fab'$ -TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해  $Fab'$ -티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른  $Fab'$ -TNB 유도체와 혼합하여 이종특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이종특이적 항체를 효소의 선택적 고정을 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0156] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이종특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이종특이적 항체를 생산하였다. [Kostelnik et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)].  $Fos$  및  $Jun$  단백질로부터의 류신 지퍼 웨티드를 2개의 상이한 항체의  $Fab'$  부분에 유전자 융합에 의해 연결하였다. 항체 동종이량체의 헌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성시킨 후, 다시 산화시켜 항체 이종이량체를 형성시켰다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편의 별법적인 제조 메카니즘을 제공하였다. 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인이 쌍을 이루게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )을 포함한다. 따라서, 한 단편의  $V_H$  및  $V_L$  도메인이 또다른 단편의 상보적인  $V_H$  및  $V_L$  도메인과 쌍을 이루도록 강요됨으로써, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄  $Fv$  ( $sFv$ ) 이량체를 사용하여 이종특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또다른 전략 또한 보고되었다. [Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참조.

[0157] 2가를 초과하는 항체도 구현된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)].

#### 0158] IV. 접합체 및 항체의 기타 변형

[0159] 본원의 방법에서 사용된 또는 본원의 물품에 포함된 항체는 세포독성제에 임의로 접합된다. 예를 들어, 항체는 WO2004/032828에 기술된 것과 같은 약물에 접합될 수 있다.

[0160] 이같은 항체-세포독성제 접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기술되어 있다.

[0161] 항체와 하나 이상의 소형 분자 독소, 예컨대 칼리케아마이신, 메이탄신 (미국 특허 제5,208,020호), 트리코텐 및 CC1065의 접합체 또한 본원에서 구현된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 메이탄신 분자 (예를 들어, 항체 분자 당 약 1 내지 약 10 개의 메이탄신 분자)에 접합될 수 있다. 메이탄신은, 예를 들어, May-SS-Me로 전환될 수 있고, 이는 May-SH3로 환원되어 변형된 항체와 반응하여 (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), 메이타시노이드-항체 접합체가 생성될 수 있다.

[0162] 별법으로, 항체는 하나 이상의 칼리케아마이신 분자와 접합될 수 있다. 칼리케아마이신 족의 항생제는 피코몰 이하 농도에서 이중-가닥 DNA 파괴를 일으킬 수 있다. 이용될 수 있는 칼리케아마이신의 구조 유사체로는  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-아세틸- $\gamma_1^I$ , PSAG 및  $\Theta_1^I$ 이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다 ([Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)] 및 [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]).

[0163] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편에는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 라이신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 켈로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테세네스가 포함된다. 예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조.

[0164] 본 발명에서는 뉴클레오분해(nucleolytic) 활성을 나타내는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도

뉴클레아제 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase)과 접합된 항체가 또한 구현된다.

- [0165] 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합된(radioconjugated) 항체의 생산에 이용가능하다. 예로는 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다.
- [0166] 다양한 이관능성 단백질 커플링제 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, [Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)]에 기술된 바와 같이 리신 면역독소를 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오디드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 키페이트화제이다. WO 94/11026 참조. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 웨티다제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬피드-함유 링커 (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992))를 사용할 수 있다.
- [0167] 별법으로, 예를 들어, 재조합 기술 또는 웨티드 합성에 의해 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질을 제조할 수 있다.
- [0168] 또다른 실시양태에서, 종양 예비표적화에 사용하기 위해 항체를 "수용체" (예컨대 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있는데, 이때 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여하고, 이어서 제거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거한 후, 세포독성제 (예를 들어 방사성뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예컨대, 아비딘)를 투여한다.
- [0169] 또한 본 발명의 항체는 전구약물 (예를 들어, 웨티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구약물-활성화 효소에 접합될 수 있다. 예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호 참조.
- [0170] 이같은 접합체의 효소 성분으로는 전구약물을 이의 더욱 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 작용할 수 있는 임의의 효소가 포함된다.
- [0171] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술파타제; 비독성 5-플루오로사이토신을 항암 약물 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 사이토신 디아미나제; 웨티드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예컨대 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 서브틸리신, 카르복시웨티다제 및 카텝신 (예컨대 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시웨티다제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한  $\beta$ -갈라토시다제 및 뉴라미니다제와 같은 탄수화물-절단 효소;  $\beta$ -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한  $\beta$ -락타마제; 및 각각 폐녹시아세틸 또는 폐닐아세틸기로 아민 질소에서 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 폐니실린 V 아미다제 또는 폐니실린 G 아미다제와 같은 폐니실린 아미다제가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 별법으로, 당업계에 "아브자임(abzyme)"으로 또한 공지된, 효소 활성을 갖는 항체를 이용하여 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시킬 수 있다 (예를 들어, [Massey, Nature 328:457-458 (1987)] 참조). 아브자임을 종양 세포 집단에 전달하기 위해 본원에 기술된 바와 같이 항체-아브자임 접합체를 제조할 수 있다.
- [0172] 본 발명의 효소는 상기 논의된 이종이관능성 가교결합 시약을 이용하는 것과 같이 당업계에 주지된 기술에 의해 항체에 공유 결합될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적으로 활성인 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원-결합 영역을 포함하는 융합 단백질을 당업계에 주지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 구축할 수 있다 (예를 들어, [Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조).
- [0173] 항체의 또다른 변형이 본원에서 구현된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비-단백질성 종합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다. 하나 이상의 PEG 분자에 연결된 항체 단편, 예컨대 Fab'이 본 발명의 특히 바람직한 실시양태이다.
- [0174] 본원에 개시된 항체는 리포좀으로 또한 제형화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은 당업계에 공지된 방법에

의해, 예컨대 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호에 기술된 바와 같이 제조된다. 순환 시간이 증강된 리포좀은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

[0175] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 규정된 세공 크기의 필터를 통해 리포좀을 압출하여 원하는 직경을 갖는 리포좀을 수득한다. 디슬퍼드 상호교환 반응을 통해 [Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)]에 기술된 바와 같이 본 발명의 항체의 Fab' 단편이 리포좀에 접합될 수 있다. 화학요법제가 리포좀 내에 임의로 함유될 수 있다. [Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989)] 참조.

[0176] 본원에 기술된 단백질 또는 웨티드 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 구현된다. 예를 들어, 이것은 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 성질을 개선시키는데 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 웨티드 합성에 의해 제조된다. 이같은 변형에는, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환이 포함된다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 또한 아미노산 변화는 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 항체의 번역후 프로세스를 변경시킬 수 있다.

[0177] 돌연변이 유발에 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위해 유용한 방법은, [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기술된 바와 같이 "알라닌-스캐닝 돌연변이유발"으로 칭해진다. 여기서, 표적 잔기의 잔기 또는 군이 확인되고 (예를 들어, Arg, asp, His, lys 및 Glu와 같은 대전 잔기), 중성 또는 음으로 대전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어, 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치를 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서 돌연변이의 성과를 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 항체 변이체들을 원하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0178] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리웨티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복시 말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리웨티드에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체에는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리웨티드 또는 효소가 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것이 포함된다.

[0179] 또다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된 것이다. 항체의 치환 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 구현된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환"이라는 표제 하에 표 1에 제시된다. 이같은 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 표 1에서 "예시적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기술되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

[0180] &lt;표 1&gt;

원래의 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe;노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala;노르류신	Leu

[0181]

[0182] 항체의 생물학적 성질에 있어서의 실질적인 변화는 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상과 같은, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조; (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지하는 것에 대한 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 수행된다. 아미노산은 측쇄 성질에서의 유사성에 따라 하기와 같이 분류될 수 있다 (A. L. Lehninger, Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

[0183] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0184] (2) 무전하 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0185] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0186] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0187] 별법으로, 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기 군으로 분류된다:

[0188] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0189] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0190] (3) 산성: Asp, Glu;

[0191] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0192] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및

[0193] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0194] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환함으로써 이루어질 것이다.

[0195] 항체의 적당한 형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스테인 잔기가, 일반적으로 세린으로, 또한 치환되어

분자의 산화적 안정성이 개선되고 비정상적인 가교결합이 방지될 수 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)이 항체에 부가되어 이의 안정성이 개선될 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

- [0196] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체에는 어버이 항체의 1개 이상의 초가변 영역 잔기가 치환되는 것이 수반된다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선택된 생성 변이체(들)는 이들이 유래되는 어버이 항체에 비해 생물학적 성질이 개선될 것이다. 이같은 치환 변이체를 생성시키는 간편한 방법은 과자 디스플레이를 이용한 친화성 성숙이다. 간략하게, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성시킨다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각 입자 내에 폐키정된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 섬유상 과자 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 이어서, 과자-디스플레이된 변이체를 본원에 기술된 바와 같이 이의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형에 대한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이 유발법을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정구조를 분석하여 항체와 항원 사이의 접촉 위치를 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보물이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체 폐널을 본원에 기술된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 분석법에서 탁월한 성질을 갖는 항체를 추가적인 개발용으로 선택할 수 있다.
- [0197] 항체의 아미노산 변이체의 또다른 유형은 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.
- [0198] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (식중 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신 또한 사용될 수 있다.
- [0199] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 항체가 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 이루어진다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [0200] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙형 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 2003/0157108 A1 (Presta, L)에 기술되어 있다. CD20 항체 조성에 대한 US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 또한 참조. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO03/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 제6,602,684호 (Umana et al.)에 참조되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내의 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO97/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO98/58964 (Raju, S.) 및 WO99/22764 (Raju, S.) 참조.
- [0201] 본원에서의 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 없는 Fc 영역을 포함한다. 이같은 변이체는 ADCC 기능이 개선된다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 더욱 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 숫자매김)에서의 치환을 추가로 포함할 수 있다. "푸코스제거된(defucosylated)" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 관련된 문헌의 예로는 미국 특허 출원 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); WO 00/61739A1; WO01/29246A1; US2003/0115614A1; US2002/0164328A1; US2004/0093621A1; US2004/0132140A1; US2004/0110704A1; US2004/0110282A1; US2004/0109865A1; WO03/085119A1; WO03/084570A1; WO2005/035778; WO2005/035586 (푸코스화의 RNA 억제 (RNAi)가 기술됨); [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)]이 포함된다. 푸코스제거된 항체를 생산하는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 ([Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜

스페라제 유전자 *FUT8*이 녹아웃된 CHO 세포 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))가 포함된다.

- [0202] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 베전의 카세트 돌연변이유발이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0203] 이팩터 기능과 관련하여, 예를 들어, 항체의 항원-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 증강되도록, 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성을 할 수 있다. 별법으로 또는 추가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입함으로써, 이러한 영역 내에 사슬간 디술피드 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이렇게 생성된 동종 이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포형 세포독성 (ADCC)를 가질 수 있다. [Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)] 참조. [Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같은 이 종이관능성 가교-링커를 사용하여 항종양 활성이 증강된 동종이량체 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작함으로써 보체 용해 및 ADCC 능력을 증강시킬 수 있다. [Stevenson et al., Ant i-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)] 참조.
- [0204] W000/42072 (Presta, L.)에는 인간 이팩터 세포의 존재 하에 ADCC 기능이 증강된 항체가 기술되어 있고, 이 항체는 Fc 영역 내에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, ADCC가 개선된 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에서의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 한개, 2개 또는 3개의 이러한 위치에서의 치환을 포함하는 또는 이러한 치환으로 구성되는 인간 IgG1 Fc 영역이다.
- [0205] C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 변경된 항체는 W099/51642, 미국 특허 6,194,551B1, 미국 특허 6,242,195B1, 미국 특허 6,528,624B1 및 미국 특허 6,538,124 (Idusogie et al.)에 기술되어 있다. 항체는 이의 Fc 영역의 하나 이상의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334에서의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0206] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어, 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 항체 (특히, 항체 단편) 내로 "샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 혼입시킬 수 있다. 본원에 사용된 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 것을 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다. Fc 영역에서의 치환을 갖고 혈청 반감기가 증가된 항체가 W000/42072 (Presta, L.)에 또한 기술되어 있다.
- [0207] 3개 이상 (바람직하게는 4개)의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 구현된다 (미국 특허 출원 US2002/0004587 A1 (Miller et al.)).
- [0208] **V. 제약 제형**
- [0209] 본 발명에 따라 사용된 항체의 치료용 제형은 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 보관용으로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 베퍼; 아스코르브산 및 메티오닌이 포함되는 산화방지제; 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀, 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만)의 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린이 포함되는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터 이온; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제가 포함된다.
- [0210] 예시적인 항-CD20 항체 제형은 WO 98/56418에 기술되어 있다. 이러한 공개 공보에는 40 mg/ml 리툭시맙, 25 mM 아세테이트, 150 mM 트레할로스, 0.9 % 벤질 알콜, 0.02 % 폴리소르베이트 20 (pH 5.0)을 포함하는 액체

다중용량 제형이 기술되어 있고, 이의 최소 저장 기간은 2-8 °C에서 2년이다. 흥미로운 또다른 항-CD20 제형은 9.0 mg/ml 염화나트륨, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 2수화물, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 및 주사용 멸균수 (pH 6.5) 내의 10 mg/ml 리툭시맙을 포함한다.

[0211] 피하 투여를 위해 채택된 동결건조 제형은 미국 특허 제6,267,958호 (Andya et al.)에 기술되어 있다. 이같은 동결건조 제형은 높은 단백질 농도로 적절한 희석제로 재구성될 수 있고, 재구성된 제형이 본원에서 치료될 포유동물에게 피하 투여될 수 있다.

[0212] 항체의 동결 건조 형태 또한 구현된다. 예를 들어, US 2002/0136719A1 (Shenoy et al.) 참조.

[0213] 본원에서의 제형은 치료될 특정 적응증에 필요한 경우 2가지 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성을 갖는 것들을 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 세포독성제; 화학요법제; 면역억제제; 사이토카인; 사이토카인 길항제 또는 항체; 성장 인자; 호르몬; 인테그린; 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체 예컨대 Genentech가 시판하는 에팔리주맙/RAPTIVA, 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 Biogen이 판매하는 나탈리주맙/TYSABRI®); 인터페론 클래스 약물 예컨대 IFN-베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 또는 IFN-베타-1b (BETASERON®); 올리고펩티드 예컨대 글라티라마 아세테이트 (COPAXONE®); 세포독성제 예컨대 미톡산트론 (NOVANTRONE®), 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 클로르암부실 또는 아자티오프린; 정맥내 면역글로불린 (감마 글로불린); 럼프구-결핍 약물 (예를 들어, 미톡산트론, 시클로포스파미드, 캠페스, 항-CD4, 클라드리빈); 비-럼프구-결핍 면역억제 약물 (예를 들어, 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 시클로스포린); "스타틴" 클래스의 콜레스테롤-저하 약물; 에스트라디올; 테스토스테론; 호르몬 대체 요법; MS에 대해 2차적인 또는 MS와 관련된 증상 (예를 들어, 경직, 실금, 통증, 피로)을 치료하는 약물; TNF 억제제; 질환-변형 항-류마티스 약물 (DMARD); 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID); 코르티코스테로이드 (예를 들어, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 텍사메타손, 또는 글루코르티코이드); 레보티록신; 시클로스포린 A; 소마토스타틴 유사체; 사이토카인 길항제; 항-대사물질; 면역억제제; 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체, 예컨대 에팔리주맙 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 나탈리주맙); 또는 또다른 B-세포 표면 길항제/항체 등을 제형 내에 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이같은 기타 작용제의 유형 및 유효량은, 예를 들어, 제형 내에 존재하는 항체의 양, 치료될 다발성 경화증의 유형, 및 대상의 임상 파라메터에 따라 좌우된다. 이들은 앞서 사용된 바와 같은 동일한 투여량으로 그리고 투여 경로로 또는 지금까지 사용된 투여량의 약 1 내지 99 %로 일반적으로 사용된다.

[0214] 활성 성분은 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 예를 들어 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀젼 내의 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 또한 포함될 수 있다. 이같은 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0215] 서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투파성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 륨프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다.

[0216] 생체내 투여에 사용될 제형은 반드시 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.

## VI. 제조품

[0218] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기술된 다발성 경화증의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 바람직하게는, 제조품은 (a) B-세포 표면 마커에 결합하는 항체 (예를 들어, CD20 항체) 및 제약상 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기; 및 (b) 다발성 경화증을 앓고 있는 대상에게 조성물을 투여하여 약 0.5 내지 4 g의 초기 항체 노출에 이어서 약 0.5 내지 4 g의 2차 항체 노출을 제공하고, 2차 노출은 초기 노출로부터 약 16 내지 60 주까지 제공하지 않기 위한 사용설명서; 또는 PPMS를 앓고 있는 대상에게 조성물을 투여하기 위한 사용설명서가 있는 포장 삽입물을 포함한다.

[0219] 제조품은 용기, 및 용기 상에 있는 또는 용기와 조합된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적절한 용기로는,

예를 들어, 병, 바이알(vial), 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 재료 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 다발성 경화증의 치료에 효과적인 조성물을 담고 있거나 함유하고, 멀균 접근 포트(port)를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 1가지 이상의 작용제는 항체이다. 표지 또는 포장 삽입물은 제공될 항체 및 임의의 기타 약물의 용량 및 간격에 관한 구체적인 지시와 함께 조성물이 다발성 경화증을 앓고 있는 대상에서 다발성 경화증을 치료하는데 사용된다는 것을 가리킨다. 제조품은 제약상 허용가능한 희석제 베퍼, 예컨대 정균처리된 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 기타 베퍼, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여, 상업용 및 사용자의 관점에서 바람직한 기타 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0220] 임의로, 본원에서의 제조품은 치료용 항체 이외의 작용제를 포함하고 이같은 작용제로 포유동물을 치료하는 것에 대한 사용설명서를 추가로 포함하는 용기를 추가로 포함할 수 있고, 이같은 작용제는 바람직하게는 화학요법제 또는 면역억제제, 인터페론 클래스 약물 예컨대 IFN-베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 또는 IFN-베타-1b (BETASERON®); 올리고펩티드 예컨대 글라티라며 아세테이트 (COPAXONE®); 세포독성제 예컨대 미톡산트론 (NOVANTRONE®), 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 클로로암부실, 또는 아자티오프린; 정맥내 면역글로불린 (감마 글로불린); 림프구-결핍 약물 (예를 들어, 미톡산트론, 시클로포스파미드, 캠페스, 항-CD4, 또는 클라드리빈); 비-림프구-결핍 면역억제 약물 (예를 들어, 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 시클로스포린); "스타틴" 클래스의 콜레스테롤-저하 약물; 에스트라디올; 호르몬 대체 요법; MS에 대해 2차적인 또는 MS와 관련된 증상 (예를 들어, 경직, 실금, 통증, 피로)을 치료하는 약물; TNF 억제제; 질환-변형 항-류마티스 약물 (DMARD); 비-스테로이드성 항-염증 약물 (NSAID); 코르티코스테로이드 (예를 들어, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 텍사메타손, 또는 글루코르티코이드); 레보티록신; 시클로스포린 A; 소마토스타틴 유사체; 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 길항제; 항-대사물질; 면역억제제; 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들어, LFA-1 항체, 예컨대 에팔리주맙 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 나탈리주맙); 또는 또다른 B-세포 표면 마커 항체 등이다.

[0221] 본 발명의 추가적인 상세사항이 하기의 비체한적 실시예에 의해 설명된다. 명세서의 모든 인용문의 기재내용은 거명에 의해 본원에 명백하게 포함된다.

[0222] <실시예>

[0223] 실시예 1

[0224] 1차 진행성 다발성 경화증 (PPMS)의 치료

[0225] 실시예 1에서는 [McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)]에 정의된 바와 같은 PPMS로 진단된 대상을 CD20 항체로 치료한다.

[0226] Genentech가 시판하는 리툭시맙을 9.0 mg/ml 염화나트륨, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 이수화물, 및 주사용 멀균수 (pH 6.5) 내의 멀균 제품으로서 IV 투여용으로 제형한다.

[0227] 1차 과정의 치료는 1일 및 15일 각각에 투여된 1 g 정맥내 (IV) 리툭시맙의 용량으로 구성될 것이다. 대상에게 아세트아미노펜 (1 g) 및 디페닐히드라민 HCl (50 mg), 또는 등가물을 각각의 주입 개시 30-60분 전에 입으로 투여한다.

[0228] 후속 과정의 치료는 24주 (169일), 48주 (337일), 및 72주 (505일)에 시작되어 투여될 것이다. 후속 과정의 치료의 2차 주입은 1차 주입 후 14 ± 1일이다.

[0229] 첫번째 재발을 경험한 대상은 IV 또는 경구 코르티코스테로이드로 구조 치료를 받을 수 있다. MS 재발에 적절한 치료 기간 또는 노출을 초과하지 않는 요법을 사용하여 전신성 코르티코스테로이드를 투여할 수 있다. 재발은 하기의 것 모두로 정의된다:

[0230] • 적어도 24시간 동안 지속되는 신경학적 이상의 급성 출현

[0231] • 열, 감염, 외상, 동시 투약 또는 기타 병인에 기인하지 않는 변화

[0232] • 하기의 FS 척도 중 하나에서의 최소 1점 변화가 포함되는, 맹검(blinded examining) 조사자에 의한 시험에서 객관적인 변화가 있는 이벤트: 추체로, 뇌신경, 소뇌, 감각, 시각, 또는 보행

[0233] 하기 요법의 코르티코스테로이드를 사용할 수 있다: 1 g IV 메틸프레드니솔론을 3일 동안 매일 투여한 후, 60

mg 프레드니손을 5일 동안 매일 투여하고, 그 후 매일 10mg 증분으로 감소시킴. IV 메틸프레드니솔론이 이용 가능하지 않다면, 3일 동안 매일 150mg IV 텍사메타손으로 대체할 수 있다. 1회 과정의 코르티코스테로이드만이 악화에 대해 투여되어야 한다. 그후의 면역학적 연구 및 MRI 스캔은 코르티코스테로이드 요법의 완료 후 적어도 4주 후에 수득하여야 한다. 코르티코스테로이드 흡입기 (경구 및 비강) 또는 관절내 주사를 사용할 수 있다.

[0234] CD20 항체와 임의로 조합되는 추가적인 치료약으로는 IFN-베타, 글라티라며 아세테이트, 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 또는 미톡산트론이 포함된다.

[0235] 첫번째 효능 결과 측정은 만성 질환 진행에 대한 시간이다. 질환 진행은 기준선 확장 장애 상태 척도 (EDSS) (Kurtzke J. Neurology 33(11):1444-52 (1983))가 2.0점 내지 5.5점 사이 (경계 포함)인 경우에는 기준선 EDSS로부터  $\geq 1.0$ 점의 증가로, 기준선 EDSS가  $\geq 5.5$ 점 초과 (경계 포함)인 경우에는  $\geq 0.5$ 점의 증가로 정의되고, 이러한 변화는 또다른 병인 (예를 들어, 열, 동시에 발생된 병, MS 재발 또는 악화, 또는 동시에 투약)에 기인하지 않는다. 질환 진행의 확정은 초기 진행 후 적어도 12주 (84일)인 규칙적으로 예정된 방문에서 일어날 수 있다.

[0236] 두번째 효능 결과 측정은 하기의 것들을 포함한다:

- 뇌 MRI 스캔에서의 T2 병변의 전체 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화

[0238] - 뇌 MRI 스캔에서의 뇌 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화

[0239] 임의로, 하기의 것들 중 하나 이상의 개선:

- 다발성 경화증 기능성 복합 척도 (MSFCS: Multiple Sclerosis Functional Composite Scale)

[0241] - EDSS

[0242] - EDSS를 사용하여 결정되는 96주에서의 만성 질환 진행 대상의 비율

[0243] - 9-홀 페그 테스트(9-Hole Peg Test) (MSFCS의 하위척도)에 의해 결정되는 상지(上肢) 기능

[0244] - 타임드 25-풋 워크 (MSFCS의 하위척도)에 의해 결정되는 이동(ambulation)

[0245] - 페이스드 오디토리 시리얼 애디션 테스트(Paced Auditory Serial Addition Test) (오직 3초; MSFCS의 하위척도)에 의해 결정되는 인식

[0246] - MRI 스캔 상에서의 뇌 T2 병변의 전체 부피 (48주 및 122주)

[0247] - MRI 스캔 상에서의 뇌 T1 병변의 전체 부피

[0248] - MRI 스캔 상에서의 경추 척수의 단면적

[0249] - MRI 스캔 상에서의 뇌 부피 (48주 및 122주)

[0250] 본원에 기술된 바와 같이 리툭시맙으로 치료된 대상은 상기 결과 기준 중 임의의 하나 이상의 것에 따른 PPMS의 정후, 증상 또는 기타 지표에서의 개선을 나타낸다.

## 실시예 2

### 재발-완화성 다발성 경화증의 치료

[0253] 실시예 2에서는 [McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)]에 정의된 바와 같은 RRMS 대상들을 CD20 항체로 치료하고, 이때 항체 노출은 약 6개월 떨어진다.

[0254] Genentech가 시판하는 리툭시맙을 9.0 mg/ml 염화나트륨, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 이수화물, 및 주사용 멸균수 (pH 6.5) 내의 멸균 제품으로서 IV 투여용으로 제형화한다.

[0255] 1차 과정의 치료는 1일 및 15일 각각에 투여된 1 g 정맥내 (IV) 리툭시맙의 용량으로 구성될 것이다. 대상에게 아세트아미노펜 (1 g) 및 디페닐히드라민 HCl (50 mg), 또는 등가물을 각각의 주입 개시 30-60분 전에 입으로 투여한다.

[0256] 후속 과정의 치료는 24주 (169일), 48주 (337일), 및 72주 (505일)에 시작되어 투여될 것이다. 후속 과정의 치료의 2차 주입은 1차 주입 후 14 ± 1일이다.

- [0257] 바람직하게는, 리툭시맙은 RRMS를 치료하기 위해 투여되는 유일한 작용제이다. 그러나, 대상에게 코르티코스테로이드, IFN-베타, 글라티라며 아세테이트, 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 또는 미톡산트론을 임의로 IV 또는 경구 투여할 수 있다.
- [0258] 첫번째 재발을 경험한 대상은 IV 또는 경구 코르티코스테로이드로 구조 치료를 받을 수 있다. MS 재발에 적절한 치료 기간 또는 노출을 초과하지 않는 요법을 사용하여 전신성 코르티코스테로이드를 투여할 수 있다. 실시예 2에서의 재발은 하기의 것으로 정의된다:
- [0259] 적어도 30일 동안 비교적 안정적이거나 개선 중인 신경학적 상태에 있었던 대상에서 48시간 넘게 지속되는 MS와 일치하는 새로운 또는 재발된 신경학적 증상의 출현. 신경학적 증상에서의 변화는 EDSS에서 절반 단계 이상, 또는 적절한 기능성 시스템 점수(functional system scores (FSS)) 중 하나에서 2점, 또는 2가지 이상의 적절한 FSS에서 1점의 증가와 일치하는 객관적인 신경학적 악화를 동반하여야 한다. 변화는 조사자들을 시험함으로써 증명되어야 하고, 선택된 FS 척도 (즉, 추체로, 보행, 소뇌, 뇌간, 감각, 또는 시각)에 영향을 미쳐야한다. 증상은  $\geq$  24시간 지속되어야 하고, 교란 임상 요인 (예를 들어, 열, 감염, 손상, 동시 약제에 대한 부작용)에 기인하지 않아야 한다. 발작 증상 (예를 들어, 긴장성 경련)의 단일 에피소드는 재발이 아니지만, 적어도 24시간에 걸친 발작 증상의 다중 발생의 새로운 발병은 새로운, 상응하는 객관적 소견이 동반된다면 재발일 수 있다. 임상 시험, 피로, 기분 변화, 또는 방광 또는 배변 절박성 또는 실금에서의 변화가 없는 감각 증상은 재발을 확정하기에 충분하지 않을 것이다.
- [0260] 첫번째 효능 결과 측정은 가돌리늄-증강 병변의 MRI 종점, 또는 만성 질환 진행에 대한 시간 (기준선 확장 장애 상태 척도 (EDSS)로부터  $\geq$  1.0점의 증가로 정의됨; [Kurtzke J. Neurology 33(11):1444-52 (1983)])이다. 첫번째 효능 종점은 12주, 16주, 20주, 및 24주에 뇌의 일련의 MRI 스캔에서 관찰된 가돌리늄-증강 T1 병변의 전체 숫자일 수 있다.
- [0261] 두번째 효능 결과 측정에는 재발 빈도; 뇌 MRI 스캔에서의 T2 병변의 전체 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화 (예를 들어, 24주 및 36주까지의 스크리닝으로부터 뇌의 MRA 스캔에서의 T2 병변의 전체 부피에서의 변화); 뇌 MRI 스캔에서의 뇌 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화; 다발성 경화증 기능성 복합 척도 (MSFCS) 및 이의 하위척도; 9-홀 페그 테스트 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 상지 기능; 타임드 25-풀 워크 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 이동; 페이스트 오디토리 시리얼 애디션 테스트 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 인식; 다발성 경화증 삶의 질-54(Multiple Sclerosis Quality of Life-54 (MSQOL-54)) 설문; MRI 스캔 상에서의 뇌 T1 병변의 전체 부피 (예를 들어, 20주, 28주, 및 36주에 뇌의 일련의 MRA 스캔에서 관찰된 가돌리늄-증강 T1 병변의 전체 숫자); MRI 스캔 상에서의 경추 척수의 단면적; 24주까지 (즉 0주와 24주 사이에) 및 36주까지 (즉 0주와 36주 사이에) 재발한 대상의 비율; 24주 및 36주의 조합된 유일 활성 측정 (Combined Unique Activity Measure).
- [0262] 상기 기술된 바와 같이 리툭시맙으로 치료된 환자는 상기 결과 측정 중 임의의 하나 이상의 것에서 개선을 나타낸다.
- [0263] **실시예 3**
- [0264] **재발-완화성 다발성 경화증의 치료**
- [0265] 실시예 3에서는 [McDonald et al. Ann Neurol 50:121-7 (2001)]에 정의된 바와 같은 RRMS 대상을 CD20 항체로 치료한다. 실시예 3에서, 항체 노출은 약 1년 떨어진다.
- [0266] Genentech가 시판하는 리툭시맙을 9.0 mg/ml 염화나트륨, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 이수화물, 및 주사용 멸균수 (pH 6.5) 내의 멸균 제품으로서 IV 투여용으로 제형화한다.
- [0267] 1차 과정의 치료는 1일 및 15일 각각에 투여된 1 g 정맥내 (IV) 리툭시맙의 용량으로 구성될 것이다. 대상에게 아세트아미노펜 (1 g) 및 디페닐히드라민 HCl (50 mg), 또는 등가물을 각각의 주입 개시 30-60분 전에 입으로 투여한다.
- [0268] 후속 과정의 치료는 48주 및 96주에 시작되어 투여될 것이다. 후속 과정의 치료의 2차 주입은 1차 주입 후 14 ± 1일이다.
- [0269] 바람직하게는, 리툭시맙은 RRMS를 치료하기 위해 투여되는 유일한 작용제이다. 그러나, 대상에게 코르티코스테로이드, IFN-베타, 글라티라며 아세테이트, 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 또는 미톡산트론을 임의로 IV

또는 경구 투여할 수 있다.

- [0270] 첫번째 재발을 경험한 대상은 IV 또는 경구 코르티코스테로이드로 구조 치료를 받을 수 있다. MS 재발에 적절한 치료 기간 또는 노출을 초과하지 않는 요법을 사용하여 전신성 코르티코스테로이드를 투여할 수 있다. 실시예 2에서의 재발은 하기의 것으로 정의된다:
- [0271] 적어도 30일 동안 비교적 안정적이거나 개선 중인 신경학적 상태에 있었던 대상에서 48시간 넘게 지속되는 MS와 일치하는 새로운 또는 재발된 신경학적 증상의 출현. 신경학적 증상에서의 변화는 EDSS에서 절반 단계 이상, 또는 적절한 기능성 시스템 점수 (FSS) 중 하나에서 2점, 또는 2가지 이상의 적절한 FSS에서 1점의 증가와 일치하는 객관적인 신경학적 악화를 동반하여야 한다. 변화는 조사자들을 시험함으로써 증명되어야 하고, 선택된 FS 척도 (즉, 추체로, 보행, 소뇌, 뇌간, 감각, 또는 시각)에 영향을 미쳐야 한다. 증상은  $\geq 24$ 시간 지속되어야 하고, 교란 임상 요인 (예를 들어, 열, 감염, 손상, 동시 약제에 대한 부작용)에 기인하지 않아야 한다. 발작 증상 (예를 들어, 긴장성 경련)의 단일 애피소드는 재발이 아니지만, 적어도 24시간에 걸친 발작 증상의 다중 발생의 새로운 발병은 새로운, 상응하는 객관적 소견이 동반된다면 재발일 수 있다. 임상 시험, 피로, 기분 변화, 또는 방광 또는 배변 절박성 또는 실금에서의 변화가 없는 감각 증상은 재발을 확정하기에 충분하지 않을 것이다.
- [0272] 첫번째 효능 결과 측정은 가돌리늄-증강 병변의 MRI 종점, 또는 만성 질환 진행에 대한 시간 (기준선 확장 장애 상태 척도 (EDSS)로부터  $\geq 1.0$ 점의 증가로 정의됨; [Kurtzke J. Neurology 33(11):1444-52 (1983)])이다. 첫번째 효능 종점은 12주, 16주, 20주, 및 24주에 뇌의 일련의 MRI 스캔에서 관찰된 가돌리늄-증강 T1 병변의 전체 숫자일 수 있다.
- [0273] 두번째 효능 결과 측정에는 재발 빈도; 뇌 MRI 스캔에서의 T2 병변의 전체 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화 (예를 들어, 24주 및 36주까지의 스크리닝으로부터 뇌의 MRA 스캔에서의 T2 병변의 전체 부피에서의 변화); 뇌 MRI 스캔에서의 뇌 부피에서의 96주에 대한 기준선으로부터의 변화; 다발성 경화증 기능성 복합 척도 (MSFCS) 및 이의 하위척도; 9-홀 페그 테스트 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 상지 기능; 타임드 25-풋 워크 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 이동; 페이스트 오디토리 시리얼 애디션 테스트 (MSFCS의 하위척도)에 의해 측정되는 인식; 다발성 경화증 삶의 질-54 (MSQOL-54) 설문; MRI 스캔 상에서의 뇌 T1 병변의 전체 부피 (예를 들어, 20주, 28주, 및 36주에 뇌의 일련의 MRA 스캔에서 관찰된 가돌리늄-증강 T1 병변의 전체 숫자); MRI 스캔 상에서의 경추 척수의 단면적; 24주까지 (즉 0주와 24주 사이에) 및 36주까지 (즉 0주와 36주 사이에) 재발한 대상의 비율; 24주 및 36주의 조합된 유일 활성 측정.
- [0274] 상기 기술된 바와 같이 리툭시맙으로 치료된 환자는 상기 결과 측정 중 임의의 하나 이상의 것에서 개선을 나타낸다.
- [0275] **실시예 4**
- [0276] **인간화 2H7 변이체**
- [0277] 실시예 4에서는 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 인간화 2H7 항체 변이체들이 기술된다. 인간화 2H7 항체는 하기의 CDR 서열들 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함한다:
- [0278] CDR L1 서열 RASSSVSYXH(식중 X는 M 또는 L이다)(서열 18), 예를 들어 서열 4 (도 1A),
- [0279] 서열 5 (도 1A)의 CDR L2 서열
- [0280] CDR L3 서열 QQWXXFNPPT(식중 X는 S 또는 A이다)(서열 19), 예를 들어 서열 6 (도 1A),
- [0281] 서열 10 (도 1B)의 CDR H1 서열,
- [0282] AIYPGNGXTSYNQKFKG(식중 X는 D 또는 A이다)(서열 20)의 CDR H2 서열, 예를 들어 서열 11 (도 1B), 및
- [0283] VVYYSSXYWYFDV(식중 위치 6의 X는 N, A, Y, W 또는 D이고, 및 위치 7의 X는 S 또는 R이다)(서열 21)의 CDR H3 서열, 예를 들어 서열 12 (도 1B).
- [0284] 상기 CDR 서열들은 일반적으로 인간 가변 경쇄 및 중쇄 프레임워크 서열, 예컨대 실질적으로 인간 경쇄 카파 아군 I ( $V_{\kappa}6I$ )의 인간 컨센서스 FR 잔기 및 실질적으로 인간 중쇄 아군 III ( $V_{\kappa}III$ )의 인간 컨센서스 FR 잔기 내에 존재한다. WO 2004/056312 (Lowman et al.)를 또한 참조.
- [0285] 가변 중쇄 영역이 인간 IgG 사슬 불변 영역에 연결될 수 있고, 이 영역은, 예를 들어, 천연 서열 및 변이체 불

변 영역을 포함하는, IgG1 또는 IgG3일 수 있다.

- [0286] 바람직한 실시양태에서, 이같은 항체는 서열 8의 가변 중쇄 도메인 서열을 포함하고 (v16, 도 1B에 제시됨), 또한 서열 2의 가변 경쇄 도메인을 임의로 포함하며 (v16, 도 1A에 제시됨), 이는 가변 중쇄 도메인에서의 예를 들어 D56A, N100A 또는 N100Y 및/또는 S100aR과 같은 위치 56, 100, 및/또는 100a에서의 하나 이상의 아미노산 치환(들), 및 가변 경쇄 도메인에서의 예를 들어 M32L 및/또는 S92A와 같은 위치 32 및/또는 92에서의 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 임의로 포함한다. 바람직하게는, 항체는 서열 13 또는 16의 경쇄 아미노산 서열, 및 서열 14, 15, 17, 22 또는 25의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 무손상 항체이다.
- [0287] 바람직한 인간화 2H7 항체는 오크레리주맙(ocrelizumab) (Genentech)이다.
- [0288] 본원에서의 항체는, 아미노산 치환이 위치 298, 333, 및 334에 존재하는 것, 바람직하게는 S298A, E333A, 및 K334A와 같이, Fc 영역에서 ADCC 활성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다 (중쇄 잔기의 Eu 번호매김 사용). 미국 특허 6,737,056B1 (Presta)을 또한 참조.
- [0289] 임의의 이러한 항체들은 FcRn 결합 또는 혈청 반감기를 개선시키는 하나 이상의 치환, 예를 들어 중쇄 위치 434에서의 치환, 예컨대 N434W를 Fc 영역 내에 포함할 수 있다. 미국 특허 6,737,056B1 (Presta)를 또한 참조.
- [0290] 임의의 이러한 항체들은 CDC 활성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 Fc 영역 내에 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어, 위치 326에서의 치환, 바람직하게는 K326A 또는 K326W를 포함한다. 미국 특허 6,528,624B1 (Idusogie et al.)을 또한 참조.
- [0291] 일부 바람직한 인간화 2H7 변이체들은 서열 2의 가변 경쇄 도메인 및 서열 8의 가변 중쇄 도메인을 포함하는 것들 (Fc 영역에서의 치환 (존재한다면)이 있거나 없는 것들이 포함), 및 서열 8 내의 변경 N100A; 또는 D56A 및 N100A; 또는 D56A, N100Y, 및 S100aR이 있는 가변 중쇄 도메인 및 서열 2 내의 변경 M32L; 또는 S92A; 또는 M32L 및 S92A이 있는 가변 경쇄 도메인을 포함하는 것들이다.
- [0292] 2H7.v16의 가변 중쇄 도메인 내의 M34는 항체 안정성의 잠재적인 공급원인 것으로 확인되었고, 치환에 대한 또 다른 잠재적 후보물이다.
- [0293] 본 발명의 일부 다양한 바람직한 실시양태의 요약에서, 2H7.v16을 기초로 하는 변이체의 가변 영역은 하기 표에서 제시된 아미노산 치환의 위치를 제외하고는 v16의 아미노산 서열을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 2H7 변이체는 v16과 동일한 경쇄를 가질 것이다.

예시적 인간화 2H7 항체 변이체

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

[0294]

[0295] 한 바람직한 인간화 2H7은 하기의 2H7.v16 가변 경쇄 도메인 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

[0297] 및 2H7.v16 가변 중쇄 도메인 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNQDTSY  
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLVTV  
SS (SEQ ID NO:8).

[0299] 을 포함한다.

[0300] 인간화 2H7.v16 항체가 무손상 항체인 경우, 이는 하기의 경쇄 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKH  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

[0302] 및 서열 14 또는 하기의 중쇄 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNQDTSY  
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:22).

[0304] 을 포함할 수 있다.

[0305] 또 다른 바람직한 인간화 2H7 항체는 하기의 2H7.v511 가변 경쇄 도메인 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGV  
SRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:23)

[0307] 및 하기의 2H7.v511 가변 중쇄 도메인 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRWSYFDVWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO. 24).

[0309] 을 포함한다.

[0310] 인간화 2H7.v511 항체가 무손상 항체인 경우, 이는 하기의 경쇄 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT  
ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKH  
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:16)

[0312] 및 서열 17 또는 하기의 중쇄 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEVGAIYPGNATSY  
 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRYWYFDVVGQGTLVT  
 VSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTTQYICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
 FLFPPPKDPLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAPIAATISKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO. 25).

[0313]

[0314] 을 포함할 수 있다.

## 도면

### 도면1a

가변 경쇄 도메인의 서열 정렬				가변 중쇄 도메인의 서열 정렬			
2H7	FR1	10 20 30 40	CDR1	2H7	FR1	10 20 30 40	CDR1
hu2H7.v16	QJYLSQSPAILSLASPOEAKVNTIC [RASSSVS-YMH] WYQKRP	*** * * * * *		hu2H7.v16	QAYLQOSSAELVLRPGASVXMSCKAS [GYTFTSYNNH] WVKQD	*** * * * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC [RASQSIISYVLA] WYQKRP	* * * *		hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNNH] WVRQA	* * * *	
2H7	FR2	50 60 70 80	CDR2	2H7	FR2	50 a 60 70 80	CDR2
hu2H7.v16	GSSPKPWIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTYSLTLISRVEA	** * * * *		hu2H7.v16	PRQGLEWIG [AIYPGNQDTSYNNQKFKG] KATLTVDKSSSTAYM	** * * * *	
hum KI	GRAKPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	* * * *		hum III	PGKGLEMWG [AIYPGNQDTSYNNQKFKG] RFTISVDKSKNTLYL	* * * * *	
2H7	CDR3	90 100	FR4	2H7	CDR3	abc 90 100abcde 110	FR4
hu2H7.v16	EDRATYYC [QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR	* * *		hu2H7.v16	QLSLTSEDSAYYFCAR [VYYVENSYWWYFDV] WGTGTTVTVSS	* * * *	
hum KI	EDRATYYC [QQWSFNPPT] FGQQTKEVBIKR	**** *		hum III	QKNSLRAEDTAVYYCAR [VYYVENSYWWYFDV] WGGTTLTVSS	***** *** *	

## 도면1b

## 가변 중쇄 도메인의 서열 정렬

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

## 도면2

## 인간화 2H7.v16 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
 SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

## 도면3

## 인간화 2H7.v16 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWYRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK  
 FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTK  
 GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

## 도면4

## 인간화 2H7.v31 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK  
 FKGRFTISVDKSKNLTYLQMNLSRAEDTAVYYCARVYYSSNSYWFDWGQGTLTVSSASTK  
 GPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

## 도면5

## 경쇄 정렬

hu2H7 .v16	1	32
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	*****
hu2H7 .v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	*****
52		
hu2H7 .v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	*****
hu2H7 .v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	*****
102		
hu2H7 .v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD	*****
hu2H7 .v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD	*****
152		
hu2H7 .v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
hu2H7 .v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
202 214		
hu2H7 .v16	SSPVTKSFNRGEC	*****
hu2H7 .v511	SSPVTKSFNRGEC	*****

## 도면6

## 증례 정렬

1  
 hu2H7.v16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW  
  
 37 52a 82abc  
 hu2H7.v16 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL  
  
 83 100abcde 113  
 hu2H7.v16 RAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVVGQGTLVTVSS  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 RAEDTAVYYCARVYYYSYRYWYFDVVGQGTLVTVSS  
  
 118  
 hu2H7.v16 ASTKGPSVFPLAPS  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 ASTKGPSVFPLAPS  
  
 132  
 hu2H7.v16 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
  
 182  
 hu2H7.v16 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA  
  
 232  
 hu2H7.v16 PELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 PELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
  
 282  
 hu2H7.v16 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
  
 332  
 hu2H7.v16 IEKTISKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 \* \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 IAATISKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
  
 382  
 hu2H7.v16 ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA  
  
 432 447  
 hu2H7.v16 LHNHYTQKSLSLSPGK  
 \*\*\*\*\*  
 hu2H7.v511 LHNHYTQKSLSLSPGK

## 서 열 목록

- <110> GENENTECH, INC.  
 FROHNA, PAUL A.  
  
 <120> METHOD FOR TREATING MULTIPLE SCLEROSIS  
  
 <130> P2134R1 PCT  
  
 <140> PCT/US2005/019641  
  
 <141> 2005-06-02  
  
 <150> US 60/576,993  
  
 <151> 2004-06-04  
  
 <160> 25

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 3  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence is synthesized.  
 <400> 3

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

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

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

5 9 14

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser

5 9

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr

5 9

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His

5 9 14

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 12

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 5 9 14

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

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 13

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

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

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

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285

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

355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 15

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320  
  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115

120

125

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

130

135

140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145

150

155

160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165

170

175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

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

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 452

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 17

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> UNSURE

<222> (9)

<223> Xaa is M or L

<400> 18

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His

5 9 14

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<220><221> UNSURE

<222> (4)

<223> Xaa is S or A

&lt;400&gt; 19

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr

1 5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;220&gt;&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (8)

&lt;223&gt; Xaa is D or A

&lt;400&gt; 20

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

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;220&gt;&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (6)

&lt;223&gt; Xaa is N, A, Y, W or D

&lt;220&gt;&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (7)

&lt;223&gt; Xaa is S or R

&lt;400&gt; 21

Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

5 9 14

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

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

225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
245	250	255	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
260	265	270	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
290	295	300	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
325	330	335	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
340	345	350	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
355	360	365	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
370	375	380	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro			
385	390	395	400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
405	410	415	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
420	425	430	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
435	440	445	
Ser Pro Gly			
450			
<210>	23		
<211>	107		
<212>	PRT		

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu  
20 25 30His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
35 40 45Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr  
85 90 95Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
165	170	175	
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
180	185	190	
Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
195	200	205	
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
210	215	220	
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
245	250	255	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
260	265	270	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr			
290	295	300	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro			
325	330	335	
Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
340	345	350	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
355	360	365	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
370	375	380	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
385	390	395	400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Pro Gly

450