



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년01월14일
(11) 등록번호 10-1351122
(24) 등록일자 2014년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) C12N 5/20 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7021252
(22) 출원일자(국제) 2004년05월07일
심사청구일자 2009년04월29일
(85) 번역문제출일자 2005년11월08일
(65) 공개번호 10-2006-0022238
(43) 공개일자 2006년03월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/014326
(87) 국제공개번호 WO 2005/000901
국제공개일자 2005년01월06일
(30) 우선권주장
60/469,451 2003년05월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
J. Lab. Clin. Med. Vol. 134, Pages 445-450
(1999.11.)
전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자
듀크 유니버시티
미합 노쓰 캐롤라이나 27708-0083 더럼 박스
90083 리서치 드라이브 노쓰 빌딩 230
(72) 발명자
테더, 토마스 에프.
미국 27705 노쓰 캐롤라이나주 더럼 와일드 메도
우 드라이브 3000
우찌다, 준지
일본 611-0021 교토 우지시 우지또모가와 122-21
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 장수길

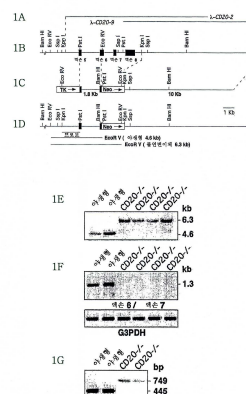
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 CD 20-특이적 항체 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 및 그의 항원-결합 단편, 및 이를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 예를 들어 B 세포를 고갈시키거나 B 세포 장애를 치료하는데 있어서의 상기 모노클로날 항체, 항원-결합 단편 및 제약 조성물의 사용 방법을 제공한다. 또한, 상기 모노클로날 항체를 생산하는 세포, 핵산 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

하마구찌, 야스히토

미국 27713 노쓰 캐롤라이나주 더럼 포춘스 리지
드라이브 5500

포, 죠나단 씨.

미국 27712 노쓰 캐롤라이나주 더럼 셸번 코트 15

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열 58의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1 영역,
서열 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 영역,
서열 76의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 영역,
서열 85의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1 영역,
서열 95의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 영역, 및
서열 102의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 영역
을 포함하거나, 또는

(b) 서열 58의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1 영역,
서열 67의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 영역,
서열 77의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 영역,
서열 86의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1 영역,
서열 95의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 영역, 및
서열 103의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 영역

을 포함하고, B 세포에 대한 결합 밀도가 모노클로날 항체 1F5의 결합 밀도에 비해 3배 이상 높은, CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 $F(ab')_2$, Fab', Fab 또는 Fv 단편인 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 순수한(naked) 항체인 모노클로날 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간화 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편인 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 인간 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 하이브리도마 PTA-5943에 의해 생산되는 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 6

하이브리도마 세포주 PTA-5943 및 PTA-5944로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포주.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

명세서

[0001] 연방 정부의 지원에 관한 언급

[0002] 본 발명은 국립 보건원/국립 암 연구소에게 허여된 특허 CA81776, CA96547, AI56363 및 CA54464하에 연방 정부의 지원으로 이루어진 것이다. 미국 정부는 본 발명에 일정 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원의 정보

[0004] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 2003년 5월 9일자로 출원된 미국 가출원 제60/469,451호를 우선권으로 청구하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

기술분야

[0005] 본 발명은 CD20에 대한 모노클로날 항체 및 이의 제조 방법과 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0006] B 림프구는 체액성 면역에 기원을 두고 있으며, 조혈 악성종양의 상당 부분을 대표하고 자가면역에 기여한다. 따라서, B 세포 및 이들의 악성 대응체에 의해 발현되는 세포 표면 분자는 면역요법에 있어서 중요한 표적이다. CD20은 MS4A 유전자 족 중에서 B 세포-특이적인 구성원으로서, 미성숙 B 세포와 성숙 B 세포 및 이들의 악성 대응체의 표면에 발현된다 (문헌 [Tedder and Engel (1994) Immunol. Today 15:450-454]).

[0007] 마우스 세포주 및 조직에서 행한 CD20 전사체의 제한된 분석은, 마우스 CD20 역시 B 세포-특이적임을 시사한다 (문헌 [Tedder, et al. (1988) J. Immunol. 141:4388]). 인간 CD20 cDNA와 마우스 CD20 cDNA는 둘다 막을 4회 횡단할 만큼 충분한 길이의 소수성 영역을 보유하는 막-매립(membrane-embedded) 단백질을 코딩한다 (문헌 [Tedder, et al. (1988) J. Immunol. 141:4388], [Tedder, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:208], [Einfeld, et al. (1988) EMBO J. 7:711], [Stamenkovic and Seed (1988) J. Exp. Med. 167:1975]). 마우스 CD20 및 인간 CD20은 아미노산 서열이 잘 보존되어 있으며 (73%), 특히 막횡단 도메인 및 아미노-말단과 카르복실-말단의 긴 세포질 도메인이 잘 보존되어 있다 (문헌 [Tedder, et al. (1988) J. Immunol. 141:4388]). 상기 세포질 도메인은 인산화를 위한 다중 컨센서스(consensus) 서열을 가지며 세린 및 트레오닌이 풍부하다. 인간 CD20은 글리코실화되지 않으며, 3가지 이소형태(isoform) (33-, 35- 및 37,000 Mr)는 단일 단백질이 상이한 세린 및 트레오닌 잔기에서 차별적으로 인산화되어 생성된 것이다 (문헌 [Tedder, et al. (1988) Molec. Immunol. 25:1321], [Tedder and Schlossman (1988) J. Biol. Chem. 263:10009], [Valentine, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8085]).

[0008] CD20은 인간 B 세포 활성화, 증식 및 Ca^{2+} 수송의 조절에 있어서 일정 역할을 수행한다 (문헌 [Tedder, et al. (1985) J. Immunol. 135:973], [Bubien, et al. (1993) J. Cell Biol. 121:1121]). CD20의 항체 라이게이션은 CD20 인산화를 증진시키고 (문헌 [Tedder and Schlossman (1988) J. Biol. Chem. 263:10009]), c-myc 및 B-myb 종양유전자의 발현을 유도하고 (문헌 [Smeland, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:6255], [Golay, et al. (1992) J. Immunol. 149:300]), 세포 단백질의 세린/트레오닌 및 티로신 인산화를 유도하고 (문헌 [Deans, et al. (1993) J. Immunol. 151:4494]), CD18, CD58 및 MHC 클래스 II 분자의 발현을 증가시키며 (문헌 [White, et al. (1991) J. Immunol. 146:846], [Clark and Shu (1987) J. Immunol. 138:720]), B 세포 부착을 유도하는 단백질 티로신 키나제를 활성화시키는 (문헌 [Kansas and Tedder (1991) J. Immunol. 147:4094]) 막횡단 신호를 생성할 수 있다. CD20 라이게이션은 막횡단 Ca^{2+} 수송을 촉진시키지만 (문헌 [Bubien, et al.(1993) J. Cell Biol. 121:1121]), 과도한 가교 후가 아니라면 (문헌 [Deans, et al. (1993)

J. Immunol. 151:4494]) 일반적으로 세포내 칼슘 ($[Ca^{2+}]_i$)³ 수준을 증가시키지는 않는다 (문헌 [Bubien, et al. (1993) J. Cell Biol. 121:1121], [Tedder, et al. (1986) Eur. J. Immunol. 16:881], [Golay, et al. (1985) J. Immunol. 135:3795]). CD20과의 항체 결합은 마이토젠(mitogen) 자극 후에 B 세포가 세포 주기의 G₁기에서 S/G₂ + M기로 진행하는 것을 억제하고, 마이토젠-유도된 B 세포 분화 및 항체 분비를 억제한다 (문헌 [Tedder, et al. (1985) J. Immunol. 135:973], [Tedder, et al. (1986) Eur. J. Immunol. 16], [Golay, et al. (1985) J. Immunol. 135:3795], [Golay and Crawford (1987) Immunology 62:279]). 과도한 CD20 가교는 아폽토시스(apoptosis)에도 영향을 미칠 수 있다 (문헌 [Holder, et al. (1995) Eur. J. Immunol. 25:3160], [Shan, et al. (1998) Blood 91:1644]). 이러한 다양한 관찰결과는 CD20이 세포 주기 진행 동안에 활성화되는 막 수송자 또는 Ca^{2+} 이온 채널을 형성하는 올리고머 복합체의 성분이라는 발견에 의해 부분적으로 설명될 수 있다 (문헌 [Bubien, et al. (1993) J. Cell Biol. 121:1121], [Kanzaki, et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:13099], [Kanzaki, et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:14733], [Kanzaki, et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:4964]). 이러한 사실에도 불구하고, CD20-결핍 (CD20^{-/-}) 마우스 계통에서 B 세포의 발생 및 기능은 정상적이라고 보고되어 있다 (문헌 [O'Keefe, et al. (1998) Immunogenetics 48:125]).

[0009]

대다수의 인간 B 세포-계통의 악성종양은 CD20을 발현한다 (문헌 [Anderson, et al. (1984) Blood 63:1424]. CD20에 대한 키메라 모노클로날 항체 또는 방사능표지된 모노클로날 항체-기체의 요법은 비호지킨 림프종에 이용되어 왔다 (문헌 [Press, et al. (2001) Hematology:221-240], [Kaminski, et al. (1993) N. Engl. J. Med. 329:459-465], [Weiner (1999) Semin. Oncol. 26:43-51], [Onrust, et al. (1999) Drugs 58:79-88], [McLaughlin, et al. (1998) Oncology 12:1763-1769]). 임상 연구에서는, 항-CD20 모노클로날 항체 요법이 류마티스관절염, 특발성 혈소판감소성 자반병 및 용혈성 빈혈 뿐만 아니라 기타 면역-매개된 질환의 징후까지도 개선시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Silverman and Weisman (2002) Arthritis Rheum. 48:1484-1492], [Edwards and Cambridge (2001) Rheumatology 40:1-7]).

[0010]

항-CD20 모노클로날 항체에 의한 생체내 치료 효능을 설명하는데에는 경쟁 가설이 이용된다. 한 모델에서, CD20은 고유 면역계의 활성화 또는 이펙터(effector) 메카니즘의 개시를 통해 일어나는 모노클로날 항체-매개된 B 세포 고갈에 대한 막-매립 표적으로 기능한다 (문헌 [Reff, et al. (1994) Blood 83:435-445], [Maloney, et al. (1997) Blood 90:2188-2195], [Maloney, et al. (1997) J. Clin. Oncol. 15:3266-3274]).

[0011]

키메라 인간 IgG1 항-인간 CD20 모노클로날 항체인 리툽시맵(Rituximab)은 전통적인 경로의 보체 (C) 활성화 및 새로 단리된 림프종 세포와 B 세포주의 C-의존적 세포독성을 유도하는데 있어서 매우 효과적이다 (문헌 [Reff, et al. (1994) Blood 83:435-445], [Golay, et al. (2001) Blood 98:3383-3389], [Cragg, et al. (2003) Blood 101:1045-1052], [Di Gaetano, et al. (2003) J. Immunol. 171:1581-1587], [Bellosillo, et al. (2001) Blood 98:2771-2777]). 리툽시맵은 또한 환자 (문헌 [van der Kolk, et al. (2001) Br. J. Hematol. 115:807-811])와 영장류 (문헌 [Kennedy, et al. (2003) Blood 101:1071-1079]) 모두에서 C를 생체내 활성화시킨다. 추가로, CD59 등을 비롯한 C 조절 단백질의 종양 세포 발현은 항-CD20 요법에 대한 내성과 관련이 있다 (문헌 [Golay, et al. (2001) Blood 98:3383-3389], [Trean, et al. (2001) J. Immunotherapy 24:263-271]). 많은 사람들은, 리툽시맵 항체가 인간 림프종 세포를 시험관내 및 생체내 고갈시키기 위해서 이용하는 주요 경로가 C-의존적 세포독성이라고 여기고 있지만 (문헌 [Golay, et al. (2001) Blood 98:3383-3389], [Cragg, et al. (2003) Blood 101:1045-1052], [Di Gaetano, et al. (2003) J. Immunol. 171:1581-1587], [Golay, et al. (2000) Blood 95:3900-3908], [Di Gaetano, et al. (2001) Br. J. Hematol. 114:800-809], [Weiner (2003) Blood 101:788]), 다른 사람들은 C-매개된 용해에 대한 종양 세포의 감수성 및 C 억제제인 CD46, CD55 및 CD59가 종양 세포상에서 발현되는 것으로 리툽시맵 요법의 결과가 예견되는 것은 아님을 알아냈다 (문헌 [Weng and Levy (2001) Blood 98:1352-1357]). 임상적으로 사용되는 것과는 다른 이소형(isotype)의 키메라 항-CD20 모노클로날 항체가 비-인간 영장류에서 정상 B 세포를 고갈시키지 않고 (문헌 [Anderson, et al. (1997) Biochem. Soc. Transac. 25:705-708]), 항-CD20 모노클로날 항체의 항-종양 효과가 부분적으로는 IgG에 대한 Fc 수용체 (FcγR)를 통한 면역 활성화에 따라 달라지기 때문에 (문헌 [Clynes, et al. (2000) Nature Med. 6:443-446]), 다른 항체-의존적 효과가 또한 중요하다고 여겨진다. 대안적으로, 항-CD20 모노클로날 항체 처리는, 막횡단 Ca^{2+} 수송 및 B 세포 기능을 변경시켜서 세포 주기의 진행을 저해하고 (문헌 [Tedder and Engel (1994) Immunol. Today 15:450-454]), B 세포 아폽토시스를 유도할 수 있다 (문헌 [Shan, et al. (1998) Blood 91:1644-1652], [Demidem, et al. (1997) Cancer Biother. Radiopharm. 12:177-186]).

- [0012] 면역요법을 받고 있는 인간에서는 기계적인 연구를 행하기가 복잡하기 때문에 이러한 생체내 가설을 차별화하기란 어려운 일이다 (문헌 [Edwards and Cambridge (2001) Rheumatology 40:1-7]). 또한, 인간에서의 연구는 B 세포를 < 2% 함유하는 골수 밖 혈액에서의 변화에 주로 집중되어 있다. 따라서, 말초 림프양 조직에서 발견되는 대다수의 B 세포에 대한 항-CD20 요법의 효과를 정확하게 규명하기가 어렵다.
- [0013] 당업계에는 특히 B 세포 악성종양 및 자가면역 질환 등과 같은 B 세포 장애에 있어서 B 세포 기능을 변경시키기 위한 개선된 시약 및 방법이 요구되고 있다. 또한, CD20에 대한 통상의 모노클로날 항체와는 상이한 면역반응 특성을 갖는 신규한 항-CD20 모노클로날 항체 역시 요구되고 있다.
- [0014] 발명의 요약
- [0015] 본 발명은, 부분적으로는 CD20과 반응하며 바람직한 특성을 갖는 신규한 모노클로날 항체의 생성 및 확인을 기초로 한다.
- [0016] 따라서, 일 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 (mAb) 또는 그의 항원-결합 단편으로서, B 세포에 대한 결합 밀도가 B 세포 및(또는) 이들의 악성 대응체에 대한 1종 이상의 통상의 mAb, 예를 들어 mAb 1F5의 결합 밀도보다 2배 이상 더 높은 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0017] 또다른 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, B 세포 (및 (또는) 이들의 악성 대응체)상의 CD20과 결합함으로써 B 세포상의 이들의 결합 부위를 상향조절시키는 것인 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0018] 추가의 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3, HB20-4, HB20-25 및 MB20-11로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb와 동일한 항원성 결정자에 결합하는 것인 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 mAb는 HB20-25 및 MB20-11로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 상기 항원-결합 단편은 HB20-25 및 MB20-11의 항원-결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0019] 또다른 측면에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3, HB20-4, HB20-25 및 MB20-11로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 중쇄 CDR3 영역 또는 HB20-3, HB20-4, HB20-25 또는 MB20-11의 상기 중쇄 CDR3 영역과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 중쇄 CDR3 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0020] 다른 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3, HB20-4 및 HB20-25로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 경쇄 CDR3 영역 또는 HB20-3, HB20-4 또는 HB20-25의 상기 경쇄 CDR3 영역과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 경쇄 CDR3 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0021] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3, HB20-4 및 HB20-25로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 CDR3 영역 또는 HB20-3, HB20-4 또는 HB20-25의 상기 CDR3 영역과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 CDR3 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0022] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3, HB20-4 및 HB20-25로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 또는 HB20-3, HB20-4 또는 HB20-25의 상기 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 각각과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0023] 또다른 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서,
- [0024] (a) 서열 3 (HB20-3), 서열 5 (HB20-4), 서열 9 (HB20-25) 또는 서열 21 (MB20-11)의 중쇄 가변 영역 또는 서열 3, 서열 5, 서열 9 또는 서열 21의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편;
- [0025] (b) 서열 31 (HB20-3), 서열 33 (HB20-4) 또는 서열 37 (HB20-25)의 경쇄 가변 영역 또는 서열 31, 서열 33 또는 서열 37의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편; 및

- [0026] (c) 상기 (a) 및 (b)에 따른 중쇄 및 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편
- [0027] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0028] 또다른 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서,
- [0029] (a) 서열 3 (HB20-3)의 중쇄 가변 영역 또는 서열 3의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 서열 31 (HB20-3)의 경쇄 가변 영역 또는 서열 31의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편;
- [0030] (b) 서열 5 (HB20-4)의 중쇄 가변 영역 또는 서열 5의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 서열 33 (HB20-4)의 경쇄 가변 영역 또는 서열 33의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편; 및
- [0031] (c) 서열 9 (HB20-25)의 중쇄 가변 영역 또는 서열 9의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 서열 37 (HB20-25)의 경쇄 가변 영역 또는 서열 37의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 유사성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편
- [0032] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0033] 다른 특정 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3 (서열 3), HB20-4 (서열 5), HB20-25 (서열 9) 및 MB20-11 (서열 21)로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 중쇄 가변 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0034] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편으로서, HB20-3 (서열 31), HB20-4 (서열 33) 및 HB20-25 (서열 37)로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb로부터의 경쇄 가변 영역을 포함하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0035] 추가의 측면으로서, 본 발명은 마우스 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편을 포함하는 제약 조성물도 제공된다.
- [0037] 일 실시양태로서, 본 발명은 HB20-1, HB20-3, HB20-4 및 HB20-25로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb와 동일한 항원성 결정자에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편을 생산하는 세포주를 제공한다.
- [0039] 추가의 측면으로서, 본 발명은 B 세포 및(또는) 이들의 악성 대응체 고갈 유효량의 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명의 제약 조성물을 포유동물 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물 대상체에서의 B 세포 고갈 방법을 제공한다.
- [0040] 추가의 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하고 순환 B 세포 및(또는) 이들의 악성 대응체를 75% 이상 고갈시키는 치료-유효 투여량 범위가 125 mg/m^2 이하인 치료 유효량의 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 B 세포 장애가 있는 포유동물 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, B 세포 장애의 치료 방법을 제공한다.
- [0041] 추가의 측면으로서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명의 제약 조성물을 B 세포 장애가 있는 포유동물 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, B 세포 장애의 치료 방법을 제공한다.
- [0042] 전술한 방법의 특정 실시양태에서, B 세포 장애는 B 세포 악성종양 또는 자가면역 질환이다.
- [0043] 추가의 측면으로서, 본 발명은 B 세포 장애가 있는 포유동물 대상체에게 치료 유효량의 (i) 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명의 제약 조성물, 및 (ii) 단핵구 또는 대식세포 기능을 증진시키는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, B 세포 장애의 치료 방법을 제공한다.
- [0044] 또다른 측면으로서, 본 발명은
- [0045] (a) $\text{CD20}^{-/-}$ 포유동물을 항체 반응을 유발하는데 충분한 조건하에서 CD20 또는 그의 항원학적 유효 단편으로 면역화하는 단계;
- [0046] (b) 상기 포유동물로부터 항체-생산 세포를 수거하는 단계;
- [0047] (c) 상기 항체-생산 세포를 배양된 불멸화 세포와 융합시켜, 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를

형성하는 단계;

(d) 상기 하이브리도마 세포를 모노클로날 항체를 생산하는데 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및

(e) 상기 배양물로부터 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 회수하는 단계

를 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 mAb의 생산 방법을 제공한다.

또다른 측면으로서, 본 발명은

(a) CD20^{-/-} 포유동물을 항체 반응을 유발하는데 충분한 조건하에서 CD20 또는 그의 항원학적 유효 단편으로 면역화하는 단계;

(b) 상기 포유동물로부터 CD20에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 세포를 수거하는 단계;

(c) 상기 항체-생산 세포로부터 이뮤노글로불린 코딩 유전자를 단리하는 단계;

(d) 상기 이뮤노글로불린 코딩 유전자를 세포 내로 도입하여, 형질전환된 세포를 생성하는 단계;

(e) 상기 형질전환된 세포를 이뮤노글로불린 유전자의 전사와 번역 및 모노클로날 항체의 생산에 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및

(f) 상기 배양물로부터 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 회수하는 단계

를 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 mAb의 생산 방법을 제공한다.

본 발명은 B 세포 (및(또는) 이들의 악성 대응체)의 고갈 및(또는) B 세포 장애의 치료에 있어서 본 발명의 핵산, 벡터, mAb 또는 항원-결합 단편 또는 본 발명의 제약 조성물의 용도를 추가로 제공한다.

다른 측면으로서, 본 발명은 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 단리된 핵산을 추가로 제공한다. 추가로, 본 발명은 상기 단리된 핵산을 포함하는 벡터 및 세포를 제공한다.

본 발명의 이러한 측면 및 다른 측면은 하기하는 본 발명의 기재부에 더욱 상세하게 개시할 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 부분적으로는 통상의 항-CD20 mAb (예를 들어 1F5 또는 2B8)와 비교할 때 결합 성질 및 기타 특성이 독특한, 인간 CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 (mAb)의 패널 생산을 기초로 한다. 특히, 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편은 통상의 항-CD20 항체와 분자 수준에서 구별될 수 있으며, 예를 들어 경쇄 및(또는) 중쇄 가변 영역 또는 가변 영역의 특별한 절편, 예를 들어 상보성 결정 영역 ("CDR")의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 기초로 하여 구별될 수 있다.

특정 실시양태에서, 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편은 통상의 mAb보다 더 높은 밀도로 B 세포에 결합할 수 있으며, 이러한 성질은 B 세포 고갈 방법, 치료 또는 진단 방법 또는 실험용 시약 (예를 들어 B 세포의 확인용 시약 또는 B 세포의 정제용 시약)으로서 사용하는데 유리하다.

또한, 본 발명은 마우스 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 및 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

추가로, 본 발명은 CD20^{-/-} 포유동물 (예를 들어 마우스)로부터 단리된 항체-생산 세포 (예를 들어 B 세포)로부터 생성된 항-CD20 mAb를 제공한다.

이하에서는, 본 발명의 바람직한 실시양태를 나타낸 첨부하는 도면을 언급하면서 본 발명에 관하여 기재할 것이다. 본 발명은 여러가지 형태로 구현될 수 있으며, 본 발명을 본원에 개시한 실시양태로 한정되는 것으로 여겨서는 안된다. 오히려, 이러한 실시양태를 제공함으로써 본 개시내용이 충실하고 완전해질 것이며, 본 발명의 범위가 당업자에게 제대로 전달될 것이다. 예를 들어, 일 실시양태와 관련하여 예시한 특징이 다른 실시양태에 적용될 수도 있으며, 특정한 실시양태와 관련하여 예시한 특징이 그 실시양태에서 빠질 수도 있다. 추가로, 본 개시내용에 비추어 볼 때 당업자에게는 본 발명에서 벗어나지 않는 범위 내에서 본원에서 제안한 실시양태에 대한 수많은 변형과 추가가 명백할 것이다.

달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용한 모든 기술적 용어 및 학술적 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자에게 통상적으로 이해되고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 본 발명의 기재에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명을 한정하려는 것이 아니다.

- [0091] 본 발명 및 청구의 범위 기재에서 사용된 바와 같이, 단수 형태의 표현 ("a", "an" 및 "the")은 문맥상 다른 의미임이 명백하지 않는 한은 복수 형태까지도 포함하는 것이다.
- [0092] 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원서, 특허 문헌 및 기타 참조문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.
- [0093] 달리 지시된 것을 제외하면, 표준 방법을 이용하여 본 발명에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 생성, 핵산 서열의 조작, 형질전환된 세포의 생성 등이 가능하다. 이러한 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어 문헌 [SAMBROOK et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989)], [F.M., AUSUBEL et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York)]을 참조한다.
- [0094] 항-CD20 mAb, 항원-결합 단편 및 세포주
- [0095] 일 측면으로서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 mAb 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD20에 특이적으로 결합하는 mAb" 및 "항-CD20 mAb" 및 유사 표현은 서로 바꿔 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 mAb 또는 항원-결합 단편은 인간 CD20 및(또는) 마우스 CD20에 특이적으로 결합한다. 상기 mAb 또는 항원-결합 단편은 CD20 단백질의 임의의 영역에 결합할 수 있지만, 대표적인 실시양태에서는 CD20의 세포외 영역에 결합한다.
- [0096] 다양한 문법 형태로 사용되는 용어 "항체" 또는 "항체 분자"는, 본원에서 사용된 바와 같이 이뮤노글로불린 분자 (예를 들어 IgG, IgE, IgA, IgM, IgD) 및(또는) 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부위, 즉 항체 부착 부위 또는 파라토프를 함유하며 항원을 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. "항체 부착 부위" 또는 "항체 결합 부위"는 항원에 특이적으로 결합하는 중쇄 및 경쇄의 가변 및 초가변 (CDR) 영역으로 구성된 항체 분자의 구조적 일부이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 항체의 특별한 성질은 이뮤노글로불린 이소형과 관련이 있다. 대표적인 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG2a, IgG1 또는 IgG2b 이소형 분자이다. 추가로, 상기 항체 또는 단편은 조류 (예를 들어, 닭, 칠면조, 오리, 거위, 메추라기 등) 및 포유동물 (예를 들어 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 토끼, 소, 염소, 양, 말, 돼지, 개, 고양이 등) 종 등을 비롯한 임의의 기원의 종에서 유래된 것일 수 있다.
- [0097] 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 본원에서 사용된 바와 같이 실질적으로 균일한 항체 집단, 즉 소량으로 존재할 수 있는 천연 발생 돌연변이의 가능성을 제외하고는 그에 포함된 개개의 항체가 동일한 집단에서 수득된 항체를 지칭한다. mAb는 고도로 특이적이며 항원상의 단일 항원성 결정자 (즉, 에피토프)에 대하여 지시된다. 이러한 특성은, 전형적으로 여러 항원성 결정자에 대해 지시된 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 상반된다.
- [0098] 본원에서 용어 "항체" 및 "mAb"는 가장 광범위한 의미로서 사용되며, 구체적으로는 원하는 생물학적 활성을 발휘하는 한은 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 순수한(naked) 항체, 항체 접합체 및 항체 단편을 포함한다. 추가로, 용어 "항체" 및 "mAb"는 무손상 (즉, 완전) 이뮤노글로불린 분자 또는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편 등을 비롯한 파라토프를 함유하는 항체의 항원-결합 단편, 항체 단편들로부터 형성된 디아바디(diabody), 선형 항체, 단일쇄 항체 분자 및 다중특이적 항체 등을 포함한다.
- [0099] 단일쇄 Fv 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 상에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이에 폴리펩티드 링커(linker)를 추가로 포함하는데, 이것으로 인해 sFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있다. sFv에 관해 고찰하기 위해서는, 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 133, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. 단일 쇄 항체의 생산 방법은 당업계에서 기재된 바 있다 (예를 들어 미국 특허 제5,260,203호 참조, 상기 문헌의 개시 내용은 본원에 참고로 도입됨). 단일 쇄 항체를 생산하는 한 예시적 방법에서, 면역화된 동물의 비장에서 단리된 RNA로부터 조합 이뮤노글로불린 파지미드 라이브러리를 제조하고, 내피 조직상에서의 패닝(panning)을 통해 적절한 항체를 발현하는 파지미드를 선별한다. 이러한 접근법이 통상의 하이브리도마 기술에 비해 유리한 점은, 1회 생산시에 대략 10⁴ 배의 항체를 더 생산하여 스크리닝할 수 있으며 단일 쇄에서의 H쇄와 L쇄 조합에 의해 새로운 특이성을 생성할 수 있어서 적절한 항체를 찾아낼 가능성을 더 증가시킨다는 점에 있다.
- [0100] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 동일 폴리펩티드 쇄에서 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인이 연결되어 포함된 작은 항체 단편을 지칭한다. 동일 쇄상의 상기 2개 도메인 사이에 쌍이 형성되지는 못할

만큼의 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또다른쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되고 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 디아바디는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, EP 404,097, WO 93/11161 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci 90:6444-6448 (1993)]을 참조한다.

[0101] 표현 "선형 항체"는 본원에서 사용된 바와 같이 항원 결합 부위의 쌍을 형성하는 일련식 Fd 절편 (V_H - C_H1 - V_H - C_H1)의 쌍을 포함하는 항체를 지칭한다. 선형 항체는 이중특이적이거나 단일특이적일 수 있으며, 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-1062 (1995)]에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0102] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체를 단백질가수 분해 소화시켜 유래되었다 (예를 들어 문헌 [Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 형질전환된 숙주 세포에서 재조합 핵산 기술을 통해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어, Fab'-SH 단편을 대장균(*E. coli*)으로부터 직접 회수하고 화학적으로 커플링시켜서 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 대안적으로, $F(ab')_2$ 분자의 조립을 촉진시키기 위해서는 루이신 지퍼 GCN4를 사용하여 $F(ab')_2$ 를 형성한다. 또다른 접근법에 따라서, Fv, Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편을 생성하는 다른 기술은 당분야 전문가에게 명백할 것이다.

[0103] 본 발명에 따른 mAb의 예로는 본원에 개시된 바와 같은 HB20-1, HB20-2, HB20-3, HB20-4, HB20-5, HB20-6, HB20-25, MB20-1, MB20-2, MB20-3, MB20-6, MB20-7, MB20-8, MB20-10, MB20-11, MB20-13, MB20-14, MB20-16 및 MB20-18 등이 있다. HB20-1, HB20-2, HB20-3, HB20-4, HB20-5 및 HB20-6은 예전에는 각각 HB13a, HB13b, HB13c, HB13d, HB13e 및 HB13f라고 지칭되었던 것들이다.

[0104] 본 발명은 중쇄, 경쇄, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및(또는) CDR1, CDR2 및(또는) CDR3 영역 (하기에 더욱 상세히 기재됨)이, 본원에 구체적으로 기재되고 CD20에 특이적으로 결합하며 임의로는 본원에 구체적으로 기재된 항체 및 항체 단편의 1종 이상의 다른 기능적 성질 (예를 들어, 결합 밀도, B 세포 고갈의 효능)을 발휘하는 항체의 상응하는쇄 또는 영역과 비교하여 실질적으로 유사한 핵산 서열 및(또는) 아미노산 서열을 갖는, 본원에 구체적으로 개시된 mAb 및 항원-결합 단편의 기능적 등가물을 추가로 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편은 본원에 구체적으로 기재된 mAb 및 항원-결합 단편과 동일한 항원성 결정자 (즉, 에피토프)에 결합한다.

[0105] 항체가 본원에 개시된 mAb의 특이성을 갖는지 여부를 과도한 시행착오 없이 에피토프 맵핑을 통해 결정하는 것은 당업자에게 통상적인 일이다. 예를 들어, 핵산 서열 및(또는) 아미노산 서열은 해당 항체의 하나 이상의 중쇄 및(또는) 경쇄 CDR 영역(들) 또는 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역(들)로부터 결정될 수 있다. 이들 영역에 동일하거나 또는 기능적으로 동등한 아미노산 잔기 서열을 갖는 항체 분자들은 결합 특이성이 동일하거나 유사하다. 가변 영역 및 CDR 영역의 유사성을 평가하고 비교하여 기능적 동등성을 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0106] 모노클로날 항체가 본원에 기재된 항체와 동일한 특이성을 보유하는지 여부를 결정하는 또다른 방법은, 아미노산 서열을 기초로 하는 컴퓨터 모델링을 통해 예측되는 항체 파라토프 3차원 구조를 비교하는 것이다. 전형적으로, 에피토프-항체 파라토프 상호작용에는 다음과 같은 4가지 힘이 관여한다: 반 데르 발스 힘 (이중극자-이중극자 상호작용), 수소 결합, 소수성 상호작용 및 이온 (쿨롱) 결합. 비-공유 결합은 항체-항원 복합체를 안정화시키고 이것을 함께 유지시킨다. 상기 상호작용은 양 분자의 3D 구조로 결정된다. 따라서, 항체 파라토프, 에피토프 및(또는) 에피토프-항체 파라토프 복합체의 3D 구조 예측을 통해 다른 항체와의 면역특이성 비교가 가능하다.

[0107] 대안적으로 또는 추가로, 항체가 랜덤하게 또는 특정한 유전적 제작에 의해 결합하는 항원의 단편화를 기초로 하는 기술을 이용하고 상기 항체를 사용하여 수득된 단편의 반응성을 결정함으로써 에피토프 맵핑을 수행할 수 있다. 또한, 단편화를 PCR 기술 등과 같이 핵산 수준에서 수행한 후에 방사능 아미노산의 존재하에서 시험관내 전사시키고 단백질로 번역시킬 수도 있다. 더욱 상세한 사항에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999, pp.390-392]을 참조한다.

[0108] 추가의 에피토프 맵핑 방법에 따라, 단백질 항원의 작은 선형 절편 각각에 상응하며 고체 상에 배열된 중첩 펩티드 세트를 합성한다. 이어서, 펩티드 패널을 시험 항체로 프로빙하고, 효소-표지된 2차 항체를 사용하여 결

합된 항체를 검출한다 [Harlow and Lane, 상기 문헌, pp.393-396].

[0109] 당업계에 공지된 추가의 에피토프 맵핑 방법은, 랜덤 합성 또는 파지 제시 펩티드 라이브러리로부터의 항체 선별이다. 예를 들어, 파지 제시 라이브러리는 펩티드-코딩 올리고뉴클레오타이드의 복합 혼합물을 f1형 ssDNA 파지의 소량의 외피 단백질 유전자의 아미노 말단에 클로닝하여 제작할 수 있다. 이러한 파지 제시 라이브러리는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs) 등이 시판하고 있다. 라이브러리를 스톡(stock)으로 증폭시킬 수 있으며, 이후에는 각 독립적인 클론의 다중 카피를 대표할 만큼 충분한 분취액을 취하여 관심 항체와 혼합한다. 항체-결합된 파지를 "바이오패닝(biopanning)"이라 불리는 절차로 수집하고, 미결합 파지는 제거한다. 결합된 파지를 용출시켜서 이것으로 박테리아를 감염시키고, 선택된 스톡을 증폭시킨다. 최종 선택된 스톡의 개개의 플라스크를 성장시켜서 특이적 항체 반응성을 ELISA 등으로 확인하고, 삽입물 부위 주변의 DNA를 서열분석한다. 항체가 결합하는 펩티드를 코딩하는 서열의 분석은 항체의 특이성을 규정한다. 더욱 상세한 사항에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Smith and Scott, Methods Enzymol. 217:228-257 (1993)] 및 [Harlow and Lane, 상기 문헌, pp.397-398]을 참조한다.

[0110] 특정 mAb가 본원에 기재된 mAb와 동일한 특이성을 갖는지 여부를 결정하는 또다른 방법은, 신뢰성이 떨어지긴 하지만, 시험할 mAb가 본원에 기재된 mAb의 표적 분자 (예를 들어 CD20)와의 결합을 저해하는지 여부를 확인하는 것이다. 표적 분자와의 결합에 대한 표준 경쟁 검정법에서 mAb 결합의 감소로 나타나는 것처럼 시험할 mAb가 본원에 기재된 mAb와 경쟁하는 경우에는, 상기 2종의 mAb가 동일하거나 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합하는 것일 가능성이 있다. 그러나, 이것이 최종적인 시험은 아니다. 시험되는 항체가 본원에 개시된 항체와 표적 분자의 결합을 감소시킬 수 있다고 하더라도, 시험되는 mAb 및 본원에 개시된 mAb가 결합하는 실제 에피토프는 상이한 것일 수 있다. 예를 들어, 시험 mAb와 그의 항원성 결정자와의 결합이 본원에 기재된 mAb 항체의 항원성 결정자를 가린다면, 본원에 기재된 mAb 항체와 그의 항원성 결정자의 결합이 시험 mAb에 의한 것과 동일한 에피토프와의 결합으로 인해 저해되는 것이 아니라 단순히 시험 mAb의 물리적 벌크(bulk)로 인해 저해되는 것일 수 있다. 따라서, 특이성을 확인하는데에는 경쟁 방법과 병행하여 더욱 정확한 절차 (예를 들어, 가변 영역의 아미노산 서열분석 및 3D 모델링)가 종종 이용된다.

[0111] mAb가 본원에 기재된 mAb의 특이성을 보유하는지 여부를 결정하는 또다른 방법은, 본원에 개시된 mAb를 표적 분자 (예를 들어, CD20)와 함께 예비인큐베이션한 후에 시험할 mAb를 첨가하여 이 시험할 mAb가 그의 표적과 결합하는 능력이 억제되는지 여부를 결정하는 것이다. 시험할 mAb가 억제된다면, 그의 에피토프 특이성은 본원에 개시된 mAb와 동일하거나 또는 기능적으로 동등할 가능성이 있다. 그러나, 이러한 절차는 앞서 논의한 경쟁 연구에서와 동일한 한계가 있어서, 동일한 특이성을 반드시 확정하는 것은 아니다.

[0112] 본 발명의 특정 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 단편은 CD20에 특이적으로 결합하며, 이때 상기 mAb 또는 항원-결합 단편이 CD20 및(또는) B 세포에 결합하는 밀도는 통상의 항-CD20 mAb (예를 들어, 2H7, B9E9, 1H4, 2B8, 1F5 및(또는) Leu-16 항체)가 CD20 및(또는) B 세포와 결합하는 밀도의 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 2배, 3배, 4배 또는 심지어는 5배 또는 그 이상이다. 또한, 본 발명의 mAb는 CD20을 보다 낮은 밀도로 발현하는 악성 B 세포를 고갈시키는데 있어서 더 높은 치료 효과를 가질 수 있다. 당업자는 이러한 통상의 항체를 입수할 수 있다 (예를 들어, 문헌 ([Shan, et al. (1999) J. Immunol. 162:6589-6595], [Schutz, et al., (2000) Cancer Res. 60:6663-6669] 및 [Haisma, et al. (1988) Blood 92:184-190], [Stashenko, et al. (1980) J. Immunol. 125:1678]) 참조). 본 발명의 어떠한 특정 이론에도 제한되는 것은 아니지만, 항체 결합 밀도는 항체에 의해 결합되는 에피토프의 접근가능성 또는 이용성에 기여할 수 있다. 따라서, 이러한 실시양태에 따라 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 상기한 1종 이상의 통상적 항체에 비해 세포 표면에 대한 접근가능성이 높은 에피토프에 대해 지시된다고 여겨진다. 본 발명의 이러한 실시양태에 따른 항체 및 항원-결합 단편은 이들이 통상의 항체보다 더 낮은 투여량에서 B 세포 고갈을 유도할 수 있기 때문에 치료용으로 유리하다. 당업자는 통상의 항체에 비교할 때의 결합 밀도 항상 정도가 표적, 예를 들어 사용된 세포주에 따라 달라질 수 있다는 것을 알 것이다. 예시적인 일 실시양태에서, mAb 또는 항원-결합 단편은 B 세포 상의 결합 부위 (즉, 에피토프의 접근가능성)를 상향조절하여, B 세포 및(또는) 이들의 악성 대응체에 대한 mAb 또는 항원-결합 단편의 결합 밀도를 더 증가시킨다.

[0113] 세포에 대한 항체 결합 밀도를 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Sato et al., J. Immunology 165:6635-6643 (2000)] (CD19의 세포 표면 밀도 평가 방법을 개시함) 참조). 다른 표준 방법으로는 스캐차드(Scatchard) 분석법 등이 있다. 예를 들어, 항체 또는 단편을 단리하고 방사능표지하여 방사능표지된 항체의 비(比)활성을 측정할 수 있다. 이어서, 상기 항체를 CD20을 발현하는 표적 세포와 접촉시킨다. 세포와 결합된 방사능을 측정할 수 있으며, 비활성을 기초로 하여 세포에 결합된 항체 또는 항체 단편의 양을 측

정할 수 있다.

- [0114] 대안적으로, 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 분석을 이용할 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 항체 단편은 CD20을 발현하는 표적 세포에 결합한다. 그 후, 항체에 결합하는 제2 시약, 예를 들어 형광색소 표지된 항-이뮤노글로불린 항체를 첨가한다. 그 후, 형광색소 염색을 측정하여, 세포에 결합한 항체 또는 항체 단편의 밀도를 측정하는데 사용할 수 있다.
- [0115] 또다른 적합한 방법으로서, 항체 또는 항체 단편을 형광단과 같은 검출가능한 표지로 직접 표지하여 표적 세포에 결합시킬 수 있다. 단백질에 대한 표지의 비율을 측정하여, 기지량의 표지가 결합되어 있는 표준 비드와 비교한다. 상기 세포에 결합된 표지의 양과 기지의 표준을 비교하여, 세포에 결합된 항체의 양을 계산하는데 이용할 수 있다.
- [0116] 본 발명의 다른 실시양태에서, 기능적 등가 항체 또는 단편은 B 세포를 고갈시키는데 및(또는) B 세포 장애를 치료하는데 있어서 본원에 기재된 항체 또는 단편과 동일하거나 유사한 효능을 갖는다. 본 발명의 이러한 측면은 하기에 보다 상세히 기재된다. 설명을 위해, 대표적인 실시양태에서, 기능적 등가 항체 또는 단편은 약 5, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 120 또는 180 일 이상 동안 약 125 mg/m², 75 mg/m², 37.5 mg/m², 10 mg/m², 3.75 mg/m², 1 mg/m², 0.75 mg/m², 0.375 mg/m², 0.1 mg/m², 0.05 mg/m², 0.001 mg/m², 0.0005 mg/m² 이하의 투여량에서 약 25%, 35%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 순환 및(또는) 조직 B 세포 고갈률을 달성한다. 다른 특정한 투여량, 고갈률 및 고갈 기간은 하기에 보다 상세히 기재된다.
- [0117] 본 발명의 대표적인 실시양태에서, 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재된 바와 같이 mAb의 중쇄 또는 경쇄를 포함한다. 다른 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재된 바와 같이 mAb로부터의 중쇄 가변 영역 및(또는) 경쇄 가변 영역을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 바와 같이 mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 개시된 바와 같이 mAb의 중쇄 V 및(또는) D 및(또는) J 영역 및(또는) 경쇄 V 및(또는) J 영역을 포함한다. 또다른 대표적인 실시양태에서, mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재된 바와 같이 mAb의 중쇄 CDR1 및(또는) CDR2 및(또는) CDR3 영역 및(또는) 경쇄 CDR1 및(또는) CDR2 및(또는) CDR3 영역을 포함한다. 이 실시양태에 따라, mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재된 바와 같이 mAb로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 (중쇄 및 경쇄)를 포함할 수 있다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 항-인간 CD20 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD20에 특이적으로 결합하고, 아미노산 서열 FYXYXXX¹YGAX²XXY (X는 임의의 아미노산일 수 있고, X¹은 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 Y 또는 S이고, X²는 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 M 또는 L이고, F는 페닐알라닌이고, Y는 티로신이고, G는 글리신이고, A는 알라닌이고, M은 메티오닌이고, L은 루이신이고, S는 세린임)을 포함하는 중쇄 CDR3 영역을 갖는다. CDR은 도 15 및 18에 도시된 바와 같이 정의된다.
- [0119] 특정 실시양태에서, 항-인간 CD20 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 아미노산 서열 NXXXX (X는 임의의 아미노산일 수 있고, N은 아스파라긴임)를 포함하는 중쇄 CDR1 영역을 추가로 포함한다.
- [0120] 또다른 실시양태에서, 항-인간 항-CD20 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 아미노산 서열 XHFWXX³XWX (X는 임의의 아미노산 서열일 수 있고, H는 히스티딘이고, F는 페닐알라닌이고, W는 트립토판이고, X³은 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 T 또는 I이고, T는 트레오닌이고, I는 이소루이신임)를 포함하는 경쇄 CDR3 영역을 추가로 포함한다.
- [0121] 또한, 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편은 상기 명시한 아미노산 서열 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄, 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역, V, D, 및(또는) J 영역 또는 CDR)과의 아미노산 서열 유사성이 실질적인 서열 유사성인, 예를 들어 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 이상인 것을 포괄한다. 대안적으로, 이들 영역을 코딩하는 핵산은 본원에 기재된 항체의 상응하는 영역의 뉴클레오타이드 서열과의 뉴클레오타이드 서열 유사성이 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 이상이다.
- [0122] 당업자라면 본 발명의 범위 내에서 본원에 개시된 아미노산 및 핵산 서열에 어떠한 변형이 이루어질 수 있음을 알 것이다. 예를 들어, 상기 서열은 클로닝 또는 증폭 절차, 또는 핵산 또는 단백질 분자의 다른 실험실 조작의 결과로서 변형되어, CD20 및(또는) B 세포에 대한 친화성 및(또는) 결합 밀도를 증진시키고(거나) Fc 수용체와의 상호작용을 증진시킬 수 있다.
- [0123] 특정 실시양태에서, mAb 또는 항원-결합 단편은 (a) 본원에 구체적으로 개시된 mAb의 중쇄 가변 영역 또는 본원

에 구체적으로 개시된 mAb의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 실질적인 아미노산 서열 유사성 (상기 기재됨)을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄를 포함하거나; (b) 본원에 개시된 mAb의 경쇄 가변 영역 또는 본원에 구체적으로 개시된 mAb의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 실질적인 아미노산 서열 유사성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하거나; (c) 상기 (a) 및 (b)에 따른 중쇄 및 경쇄를 포함하는 mAb 또는 항원-결합 단편이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편은 본원에 구체적으로 개시된 mAb의 중쇄 가변 영역 또는 그와 실질적인 아미노산 서열 유사성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄, 및 추가로 본원에 개시된 동일한 mAb로부터의 경쇄 가변 영역 또는 그와 실질적인 아미노산 서열 유사성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0124] 당업계에서 공지된 바와 같이, 수많은 상이한 프로그램을 이용하여 핵산 또는 폴리펩티드가 공지된 서열에 대해 서열 동일성 또는 유사성을 갖는지 여부를 확인할 수 있다. 서열 동일성 및(또는) 유사성은 당업계에서 공지된 표준 기술, 예를 들어 비제한적인 예로서 문헌 [Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981)]의 국부 서열 동일성 알고리즘, 문헌 [Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443 (1970)]의 서열 동일성 정렬 알고리즘, 문헌 [Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988)]의 유사성 조사 방법, 이들 알고리즘의 컴퓨터 처리 실행 (위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재하는 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 팩키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA), 문헌 [Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984)]에 기재된 베스트 피트(Best Fit) 서열 프로그램을 이용하여, 바람직하게는 디폴트값 설정을 이용하거나 정밀검사에 의해 측정할 수 있다.

[0125] 유용한 알고리즘의 한 예로 PILEUP가 있다. PILEUP는 점진적인 쌍별 정렬(pairwise alignment)을 이용하여 관련 서열군으로부터 다중 서열 정렬을 생성한다. 이는 또한 상기 정렬을 생성하는데 사용되는 군집 관계를 보여주는 계도를 작성할 수 있다. PILEUP는 문헌 [Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35, 351-360 (1987)]의 점진적인 정렬 방법을 간소화하여 사용하며, 이 방법은 문헌 [Higgins & Sharp, CABIOS 5, 151-153 (1989)]에 기재된 것과 유사하다.

[0126] 유용한 알고리즘의 또다른 예로는 문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990)] 및 [Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787 (1993)]에 기재된 BLAST 알고리즘이 있다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 문헌 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460-480 (1996)]으로부터 얻을 수 있는 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 바람직하게는 디폴트값으로 설정되어 있는 여러 조사 매개변수를 사용한다. 상기 매개변수는 동력학적 값이며, 특정 서열의 조성, 및 해당 서열을 조사하는 특정 데이터베이스의 조성에 따라 프로그램 자체적으로 설정되지만, 민감도를 증가시키기 위해 상기 값을 조정할 수 있다.

[0127] 추가의 유용한 알고리즘은 문헌 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402]에서 보고된 겐을 포함하는 BLAST (gapped BLAST)이다.

[0128] 아미노산 서열 동일성의 백분율 값은 정렬된 영역에서 일치하는 동일한 잔기의 수를 "보다 긴" 서열의 잔기의 총수로 나눔으로써 결정될 수 있다. "보다 긴" 서열은 정렬된 영역에서 가장 실제적인 잔기를 갖는 것이다 (정렬 점수를 최대화하기 위해 WU-Blast-2에 의해 도입된 겐은 무시한다).

[0129] 상기 정렬은 정렬하고자 하는 서열에 겐을 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 본원에 구체적으로 개시된 폴리펩티드보다 더 많거나 적은 아미노산을 함유하는 서열의 경우, 일 실시양태에서 서열 동일성 백분율은 아미노산의 총수에 대한 동일한 아미노산의 수를 기준으로 하여 결정된다는 것을 이해한다. 따라서, 예를 들어 일 실시양태에서 본원에 구체적으로 개시된 서열보다 짧은 서열의 서열 동일성은 보다 짧은 서열에서의 아미노산의 수를 이용하여 결정할 것이다. 서열 동일성 백분율의 계산에서, 상대적인 중량은 삽입, 결실, 치환 등과 같은 다양한 서열 변형을 표현하도록 지정되지 않는다.

[0130] 일 실시양태에서, 일치하는 것만 양으로 (+1) 점수 매기고, 겐을 비롯한 모든 형태의 서열 변형은 "0"의 값으로 지정하는데, 이는 서열 유사성 계산에 대해 하기 기재하는 바와 같이 가중된 등급 또는 파라미터에 대한 필요를 없애준다. 서열 동일성 백분율은 예를 들어 정렬된 영역에서 일치하는 동일한 잔기의 수를 "보다 짧은" 서열의 잔기의 총수로 나누고, 100을 곱함으로써 계산될 수 있다. "보다 긴" 서열은 정렬된 영역에서 가장 실제적인 잔기를 갖는 것이다.

[0131] 다른 실시양태에서, mAb, 항원-결합 단편, 또는 본원에 구체적으로 기재된 mAb 또는 상응하는 항원-결합 단편 또는 특정 영역에 "실질적인 서열 유사성"을 갖는 그의 특정 영역은 당업자에게 공지된 표준 조건하에 본원에

구체적으로 기재된 핵산의 상응하는 절편으로 가수분해하고, 본원에 정의된 기능적 등가 mAb 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산에 의해 코딩된다.

- [0132] 설명을 위해, 이러한 핵산 서열의 혼성화는 본원에 구체적으로 개시된 서열에 대해 낮은 엄격한 조건, 중간 정도의 엄격한 조건 또는 매우 엄격한 조건 (각각 예를 들어, 37℃에서 5x 덴하트(Denhardt) 용액, 0.5% SDS 및 1x SSPE와 함께 35 내지 40% 포름아미드를 사용하는 세척 엄격성으로 표현되는 조건; 42℃에서 5x 덴하트 용액, 0.5% SDS 및 1x SSPE와 함께 40 내지 45% 포름아미드를 사용하는 세척 엄격성으로 표현되는 조건; 및 (또는) 42℃에서 5x 덴하트 용액, 0.5% SDS 및 1x SSPE와 함께 50% 포름아미드를 사용하는 세척 엄격성으로 표현되는 조건)하에서 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)] 참조).
- [0133] 당업자라면 유전 암호의 축중(degeneracy)으로 인해 본 발명의 mAb 및 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산이 변형될 수 있음을 잘 알 것이다. 동일한 폴리펩티드에 대해 상이한 핵산 서열의 코딩을 가능하게 하는 유전 암호의 축중은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0134] 핵산 서열의 추가의 변형은 비번역 서열, 예를 들어 인트론 서열, 및 5' 및 3' 비번역 서열의 존재 (또는 부재)에 의해 일어날 수 있다.
- [0135] 본 발명에 이르러 본 발명자들은 목적하는 특징을 갖는 항-CD20 mAb의 패널을 제조하여 특성 분석하였으며, 당업자에게는 유사한 또는 개선된 항체 및 단편을 생산하는 것이 익숙할 것이다. 예를 들어, 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역 (또는 그의 일부분, 예를 들어 하나 이상의 CDR)의 서열은 목적하는 특징을 갖는 다른 항체의 확인을 위한 출발점으로서 사용될 수 있다. 한 접근법으로서, 본원에 개시된 서열의 변이체를 포함하는 파지 라이브러리를 생성할 수 있다. 파지 라이브러리는 임의의 목적하는 특징, 예를 들어 CD20 반응성, 결합 밀도, B 세포 고갈의 효능, B 세포 장애의 치료 효능 등을 기준으로 선택될 수 있다.
- [0136] 또한, 본원에 구체적으로 개시된 mAb 및 그의 항원-결합 단편의 아미노산 및 핵산 서열을 변형시키기 위해, 당업계에 공지된 임의의 특징, 예를 들어 아미노산 측쇄 치환기의 상대적인 유사성 또는 차이점, 예를 들어 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기준으로 하여 아미노산을 치환시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 보존적 치환은 아미노산 서열에서 일어난다. 본원에 사용된 "보존적 아미노산 치환"에서는 자연적으로 일어날 치환 확률이 우연히 일어날 치환 확률보다 약 10 배가 넘는다 (예를 들어, 문헌 [Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 1971, pages 95-96 and Figures 9-10]에 기재된 산정 방법에 의해 정의됨).
- [0137] 아미노산을 치환시키는데 있어서, 아미노산의 소수성 지수가 고려될 수 있다. 단백질에 대해 생물학적 상호작용 기능을 제공하는데 있어서 아미노산 소수성 지수의 중요성은 일반적으로 당업계에 이해되어 있다 (문헌 [Kyte and Doolittle, (1982) J. Mol. Biol. 157:105], 그 전문이 본원에 참고로 도입됨). 아미노산의 상대적인 소수성 특징은 생성된 단백질의 2차 구조에 기여하고, 이는 다시 단백질과 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 규정한다.
- [0138] 각각의 아미노산은 그의 소수성 및 전하 특징을 기준으로 하여 소수성 지수가 지정되며 (카이트(Kyte) 및 두리틀(Doolittle)의 상기 문헌), 다음과 같다: 이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 리신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).
- [0139] 아미노산의 치환이 친수성을 기준으로 하여 이루어질 수 있다는 것 또한 당업계에 이해되어 있다. 미국 특허 제4,554,101호 (그 전문이 본원에 참고로 도입됨)에서는 단백질의 최고 국부 평균 친수성이 인접 아미노산의 친수성에 의해 지배되어 단백질의 생물학적 특성과 연관된다는 것을 제안하고 있다.
- [0140] 미국 특허 제4,554,101호에 상세히 기재된 바와 같이, 아미노산 잔기에 다음과 같은 친수성 값이 지정되었다: 아르기닌 (+3.0); 리신(3.0); 아스파르테이트 (+3.01); 글루타메이트 (+3.01); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.51); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 이소루이신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).
- [0141] 다른 실시양태에서, 본 발명의 기능적 등가 mAb 및 항원 결합 단편은 14, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 치환, 결실 및(또는) 삽입을 갖는 본원에 개시된 mAb 또는 항원-결합 단편으로부터의 하나 이상의 특정 영역 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄, 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역 또는 그의 일부분)을 포함하는 것

을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편은 CDR1, CDR2 및(또는) CDR3 영역을 포함하며, 각각의 CDR 영역은 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 치환, 결실 및(또는) 삽입을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, CDR1, CDR2 및(또는) CDR3 영역은 각각 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 보존적 아미노산 치환을 포함한다.

[0142] 항체 또는 단편은 하나 이상의 항원 특이성을 추가로 가질 수 있으며, 예를 들어 이중특이적 항체일 수 있다. 이중특이적 항체는 예를 들어 또다른 CD20 에피토프에 추가로 결합할 수 있다. 또한, 이중특이적 항체는 CD19, CD22, CD52, CD3, CD28 또는 HLA-DR10 (Lym-1)과 같은 다른 항원에 대해, CD16, CD64 및 CD89와 같은 Fc 수용체에 대해, T 세포 수용체 (예를 들어, T 세포 수용체 복합체의 제타 쇄)에 대해, 또는 수용체, 예를 들어 사이토킨, 호르몬 또는 성장 인자 수용체와 같은 다른 세포 표면 분자에 대해 결합 특이성을 가질 수 있다.

[0143] 항체 및 그의 단편은 또한 "키메라" 항체일 수 있다. 키메라 항체 및 항원-결합 단편은 2가지 이상의 상이한 종 (예를 들어, 마우스 및 인간)으로부터의 일부분을 포함한다. 키메라 항체는 인간 불변 도메인 유전자 절편으로 스플라이싱된 목적하는 특이성을 갖는 마우스 가변 영역에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조). 이러한 방식으로, 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체는 인간에 대한 임상적 적용에 더욱 적합하도록 변형될 수 있다.

[0144] 본 발명의 mAb는 또한 비-인간 (예를 들어, 마우스) mAb의 "인간화" 형태 또는 "CDR 그래프팅" 형태일 수 있으며, 특히 상기 형태가 인간에서는 마우스 항체만큼 빨리 순환 제거되지 않고, 일반적으로 인간 대상체에 투여될 때 불리한 면역 반응을 유발하지 않기 때문에, 이는 무린 mAb보다는 인간에 대해 치료제로서의 이점을 제공할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 기원으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 "임포트(import)" 잔기라 일컬어지며, 전형적으로 "임포트" 가변성 도메인으로부터 취해진다. 인간화 항체의 생산 방법은 일반적으로 당업계에 널리 공지되어 있고, 본원에 개시된 mAb에 용이하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 그의 동료들에 의한 방법에 따라 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]). 특정 실시양태에서, 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체의 인간화 형태는 수용자 항체의 초가변 (CDR) 영역 잔기가 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 목적하는 특이성, 친화성 및 결합능을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역 잔기로 교체된 인간 항체 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 잔기 또한 상응하는 비-인간 잔기로 교체될 수 있다 (소위 "복귀돌연변이"). 이러한 복귀돌연변이의 위치는 서열 및 구조 분석에 의해, 또는 컴퓨터 모델을 이용한 가변 영역의 3차원 구조의 분석에 의해 결정될 수 있다. 또한, 파지 제시 라이브러리는 항체 서열 내의 선택된 위치에서 아미노산을 변화시키는데 사용될 수 있다. 인간화 항체의 특징은 또한 인간 프레임워크의 선택에 의해 영향을 받는다. 또한, 인간화 및 키메라화 항체를 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함하도록 변형시켜, 친화성과 같은 항체 특성을 더욱 개선시킬 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 이뮤노글로불린의 CDR 도메인에 상응하는 모든 또는 거의 모든, 적어도 1개, 2개 또는 심지어 3개 모두의 CDR 도메인을 포함할 것이고, 모든 또는 거의 모든 프레임워크 영역 잔기는 인간 이뮤노글로불린 서열의 잔기이다. 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부 분도 포함할 것이다. 더욱 상세한 내용에 대해서는 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; 및 [Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]을 참조한다. 따라서, 본 발명의 일 실시양태가 mAb라면, 이는 항원 (즉, CD20)에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 방해하지 않으면서 인간 이뮤노글로불린의 성분을 도입하도록 그래프팅됨으로써 인간화된다.

[0145] 본 발명의 mAb 또는 항원-결합 단편은 치료제와 같은 다른 제제에 접합되지 않은 순수한 항체 또는 항원-결합 단편일 수 있다. 대안적으로, mAb 또는 항원-결합 단편은 치료제, 예를 들어 세포독성제, 소분자 화합물, 호르몬, 성장 인자, 사이토킨, 효소, RNase, 리보자임 또는 핵산 분자, 예를 들어 코딩 서열, 안티센스 RNA 및 RNAi에 접합될 수 있다 (즉, 면역접합체를 형성한다).

[0146] 예시적인 세포독성제로는 단백질 독소, 예를 들어 리신, 디프테리아 독소, 스태필로코칼(*Staphylococcal*) 내독소, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소, 아브린 또는 다른 리보솜 불활성화 단백질을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 단백질은 화학적 가교제를 이용하여 화학적으로, 또는 단백질 독소의 전부 또는 일부분을 코딩하는 융합 단백질을 구조화하는 재조합 핵산 기술에 의해 항체 또는 항체 단편에 연결될 수 있다. 다른 예시적인 세포독성제로는 고에너지 방사성동위원소, 예를 들어 ⁹⁰Y, ¹³¹I 또는 ¹¹¹In이 있다. 추가의 세포독성제로는

세포독성 및 세포증식 억제성 약물, 예를 들어 메토타렉세이트, 클로람부실, 아드리아마이신, 다우노루비신 및 빈크리스틴이 있다.

- [0147] 대안적으로, mAb 또는 항원-결합 단편은 검출가능하게 표지될 수 있다. 예시적인 검출가능한 표지로는 방사선 표지, 중금속, 발색단, 형광단 및 효소 (효소 반응의 최종 생성물이 검출가능함)이 있다. 검출가능하게 표지된 항체 및 항원-결합 단편은 예를 들어 진단 방법 및 실험실 방법에 이용될 수 있다.
- [0148] 항-CD20 mAb는 당업계에서 공지된 임의의 표준 방법, 예를 들어 하이브리도마 방법 (문헌 [Koehler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975)]; 및 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, (Academic Press, 1986)]), 또는 미국 특허 제4,816,567호 및 문헌 [Wood et al., Nature 314:446-9 (1985)]에 기재된 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다.
- [0149] 모노클로날 항체는 전형적으로 동일한 항체 합체 부위를 갖는 항체 분자의 균일한 집단을 제공하는 단일 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포의 클로닝에 의해 생산된다. 하이브리도마 세포는 항체-생산 세포와 골수종 또는 다른 자가-영속(self-perpetuating) 세포주를 융합함으로써 형성된다. 이러한 항체 생산 방법은 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975)]에 기재되어 있으며, 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 추가의 방법은 문헌 [Zola, Monoclonal Antibodies: a Manual of Technique, CRC Press, Inc. (1987)]에 기재되어 있다. 이렇게 생성된 하이브리도마 상정액은 CD20에 결합하고(하거나) 본원에 기재된 바와 같이 다른 목적하는 특징을 갖는 항체 분자의 존재에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0150] 일반적으로, 항-CD20 mAb를 생산하는 하이브리도마를 제조하기 위해, 골수종 또는 다른 자가-영속 세포주를 CD20에 대해 과면역화된 포유동물의 비장, 림프절 또는 다른 항체 생산 세포로부터 얻은 림프구와 융합한다 (예를 들어, 문헌 [Kearney et al., J. Immunol., 123:1548-50 (1979)] 참조).
- [0151] 일 실시양태에서, 하이브리도마의 제조에 사용된 골수종 세포주는 림프구와 동일한 종으로부터 얻는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 마우스 골수종은 아메리칸 타입 킬러 콜렉션 (미국 버지니아주 마나사스 소재)로부터 입수가 가능한 NS-1 골수종 세포주이다.
- [0152] 비장세포는 전형적으로 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 1500를 이용하여 골수종 세포와 융합된다. 융합된 하이브리드는 HAT에 대한 그들의 민감성에 의해 선택된다. 개시된 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마는 본원에 기재된 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 및 형광-활성화 세포 분별법 (FACS)에 의해 확인된다.
- [0153] 항체 생산 세포는 동종 교배 마우스 종, 예를 들어 C57BL/6 종으로부터 입수할 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 생산 세포는 CD20^{-/-} 포유동물, 예를 들어 CD20^{-/-} 마우스로부터 입수할 수 있다. 대표적인 일 실시양태에서, CD20^{-/-} 마우스는 원래 129 종의 마우스로부터 유래된다. CD20^{-/-} 포유동물은 당업자에게 공지되고 본원에 기재된 기술을 이용하여 제조할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hogan et al. (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.] 참조).
- [0154] 본 발명의 항-CD20 mAb는 전체가 인간 항체일 수 있다. 전체 인간 항체를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 트랜스제닉 동물 및 파지 제시(phage display) 기술을 포함한다.
- [0155] 면역화시 내생 이뮤노글로불린 생성의 부재하에 인간 항체의 레퍼토리를 제조할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 제조하는 것 또한 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 접합 영역 (J_H) 유전자의 동형접합 결실에 의해 내생 항체 생산이 완전히 억제된다는 것이 보고되었다. 이러한 생식선 돌연변이 마우스에서 인간 생식선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 전달하면, 항원 투여시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,2551-255 (1993)] 및 [Jakobovits et al., Nature 362,255-258 (1993)]을 참조한다.
- [0156] 문헌 [Mendez et al. (Nature Genetics 15:146-156 (1997))]에서는 상기 기술을 더욱 개선시켰고, 항원 투여시에 고친화성 전체 인간 항체를 생산하는 "제노마우스(Xenomouse) II"로 지칭되는 트랜스제닉 마우스 라인을 생성하였다. 이는 상기 기재된 바와 같이 메가베이스 인간 중쇄 및 경쇄 좌위를 내생 J_H 절편이 결실된 마우스로 생식선 통합함으로써 달성되었다. 제노마우스 II는 대략 66 V_H 유전자, 완전한 D_H 및 J_H 영역 및 세가지 상이한 불변 영역 (μ, δ 및 χ)을 함유하는 1,020 kb의 인간 중쇄 좌위를 갖고, 또한 32 V_K 유전자, J_K 절편 및 C_K 유전자를 함유하는 800 kb의 인간 κ 좌위를 갖는다. 이들 마우스에서 생산되는 항체는 유전자 재배열, 어셈블리 및 레퍼토리를 비롯하여 모든 면에서 인간에서 보이는 것과 밀접하게 닮았다. 인간 항체는 무린 좌위에

서 유전자 재배열을 방지하는 내생 J_H 절편의 결실로 인해 내생 항체에 비해 우세하게 발현된다.

- [0157] mAb의 다른 제조 방법 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sastry, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:5728-5732 (1989)] 및 [Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)]에 기재된 면역학적 레퍼토리오로부터 mAb의 단리 방법을 참조한다.
- [0158] 대안적으로, 파지 제시 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348, 552-553 (1990)])을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터 얻은 이뮤노글로불린 가변성 (V) 도메인 유전자 레퍼토리오로부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자가 M13 또는 fd와 같은 섬유상 박테리오파지의 주 또는 부 코트 단백질 유전자로 프레임내 클로닝되고, 파지 입자의 표면상에서 기능적 항체 단편으로서 제시된다. 섬유상 입자가 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 복사체를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기준으로 한 선택 결과, 그러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자가 또한 선택된다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성 중 일부를 모방한다. 파지 제시는 다양한 형식으로 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993)]).
- [0159] 여러 기원의 V-유전자 절편이 파지 제시에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V-유전자의 작은 랜덤 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V-유전자의 레퍼토리를 구조화할 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체는 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)] 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리될 수 있다. 자연 면역 반응에서, 항체 유전자는 높은 비율의 돌연변이 (체세포 과다돌연변이)를 축적한다. 도입된 일부 변화는 높은 친화성을 부여할 것이고, 높은 친화성 표면 이뮤노글로불린을 표시하는 B 세포가 항원의 후속적인 투여 동안 우세하게 복제되고 분화된다. 이러한 자연적인 과정은 "연쇄 셔플링(chain shuffling)"으로 공지된 기술을 이용하여 모방할 수 있다 (문헌 [Marks et al., Bio/Technol. 10, 779-783]). 이 방법에서, 파지 제시로부터 얻은 "일차적인" 인간 항체의 친화성은 중쇄 및 경쇄 V-영역 유전자를 면역화되지 않은 공여자로부터 얻은 V-도메인 유전자 천연 발생 변이체의 레퍼토리 (레퍼토리)로 순차적으로 교체함으로써 개선시킬 수 있다. 이 기술은 nM 범위에서 친화성을 갖는 항체 및 항체 단편의 생산을 가능하게 한다. 매우 큰 파지 항체 레퍼토리의 제조를 위한 전략은 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21, 2265-2266 (1993)]에 기재되어 있다.
- [0160] 모노클로날 항체의 생산에 대한 추가의 정보에 대해서는 문헌 [Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 3rd Edition, Academic Press, Inc., London, San Diego, 1996], [Liddell and Weeks: Antibody Technology: A Comprehensive Overview, Bios Scientific Publishers: Oxford, UK, 1995], [Breitling and Dubel: Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, New York, 1999], 및 [Phage Display: A Laboratory Manual, Barbas et al., editors, Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001]을 참조한다.
- [0161] 본 발명자들은 독특한 특징 (예를 들어, CDR 영역, 결합 밀도 등)을 갖는 신규 항체를 $CD20^{-/-}$ 포유동물로부터 생산할 수 있음을 예상치 못하게도 발견하였다. 따라서, 대표적인 일 실시양태에서, 본 발명은 (a) $CD20^{-/-}$ 포유동물 (예를 들어, 마우스)을 항체 반응을 유발하는데 충분한 조건하에서 $CD20$ 또는 그의 항원학적 유효 단편으로 면역화하는 단계; (b) 상기 포유동물로부터 항체 생산 세포 (예를 들어, B 세포)를 수거하는 단계; (c) 상기 항체 생산 세포를 배양물 중의 불멸화 세포 (예를 들어, 골수종 세포)와 융합하여 모노클로날 항체 생산 하이브리도마 세포를 형성하는 단계; (d) 상기 하이브리도마 세포를 모노클로날 항체의 생산에 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및 (e) 상기 배양물로부터 $CD20$ 에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 회수하는 단계를 포함하는, $CD20$ 에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 임의로 항- $CD20$ mAb를 생산하는 하이브리도마 세포주를 단리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0162] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) $CD20^{-/-}$ 포유동물을 항체 반응을 유발하는데 충분한 조건하에서 $CD20$ 또는 그의 항원학적 유효 단편으로 면역화하는 단계; (b) 상기 포유동물로부터 $CD20$ 에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 세포를 수거하는 단계; (c) 상기 항체-생산 세포로부터 이뮤노글로불린 코딩 유전자를 단리하는 단계; (d) 상기 이뮤노글로불린 코딩 유전자를 상이한 세포 내로 도입하여 형질전환된 세포를 생성하는 단계; (e) 상기 형질전환된 세포를 이뮤노글로불린 유전자의 전사 및 번역 및 모노클로날 항체의 생산에 충분한 조건하에서 배양하는 단계; 및 (e) 상기 배양물로부터 $CD20$ 에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 회수하는 단계를 포

합하는, CD20에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 유전자 둘다 항체 생산 세포로부터 또는 상이한 항체 생산 세포들로부터 단리되어, 형질전환된 세포(들)에 도입된다. 형질전환된 세포는 임의의 적합한 세포, 예를 들어 포유동물 세포 또는 세포주, 예를 들어 CHO 또는 BHK 세포일 수 있다.

[0163] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같이 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마 세포, 하이브리도마 세포주 및 하이브리도마 세포 배양물을 제공한다. 본 발명의 하이브리도마 세포주의 예로는 하이브리도마 HB20-1, HB20-2, HB20-3, HB20-4, HB20-5, HB20-6, HB20-25, MB20-1, MB20-2, MB20-3, MB20-6, MB20-7, MB20-8, MB20-10, MB20-11, MB20-13, MB20-14, MB20-16 및 MB20-18이 있다.

[0164] 하이브리도마 세포주 HB20-3, HB20-4, HB20-25, MB20-1, MB20-11 및 MB20-18은 2004년 5월 5일자로 부다페스트 조약에 따라 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재)에 기탁되어, 각각 ATCC 수탁 번호 PTA-5943 (HB20-3), PTA-5944 (HB20-4), PTA-5945 (HB20-25), PTA-5946 (MB20-1), PTA-5947 (MB20-11) 및 PTA-5948 (MB20-18)을 부여받았다.

[0165] 본 발명은 또한 본 발명의 mAb, 항원-결합 단편, 항체 중쇄 및(또는) 항체 경쇄, 또는 그의 일부분 (예를 들어, 가변 영역, CDR 영역)을 코딩하는 핵산을 제공한다. 핵산은 DNA, RNA 또는 이들의 키메라일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며, 전체적으로 또는 부분적으로 합성 또는 천연 발생일 수 있다. 핵산은 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 또한, 핵산은 임의의 기원의 중, 예를 들어 포유동물 중, 예를 들어 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 토끼, 소, 염소, 양, 말, 돼지, 고양이 등으로부터 얻을 수 있다.

[0166] 특정 실시양태에서, 핵산은 단리된 핵산이다. 본원에 사용된 "단리된" 핵산은 천연 발생 유기체의 적어도 다른 일부 성분, 예를 들어 세포 구조 성분 또는 다른 폴리펩티드, 또는 해당 핵산과 통상적으로 함께 발견되는 핵산으로부터 분리되거나, 그러한 것들이 실질적으로 없는 핵산을 의미한다.

[0167] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터, 예를 들어 발현 벡터 및 유전자 전달 벡터를 제공한다. 적합한 벡터로는 박테리아 발현 벡터, 진균 발현 벡터, 포유동물 벡터, 효모 발현 벡터 및 식물 발현 벡터가 있다. 예시적인 벡터로는 박테리아 인공 염색체, 코스미드, 효모 인공 염색체, 파지, 플라스미드, 지질 벡터 및 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 바쿨로바이러스 등)이 있다.

[0168] 발현 벡터는 원핵 또는 진핵 세포에서 폴리펩티드의 발현을 위해 고안될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 박테리아 세포, 예를 들어 이. 콜라이(*E. coli*), 효모 세포, 곤충 세포 (예를 들어, 바쿨로바이러스 발현계) 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 일부 적합한 숙주 세포는 문헌 [Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 더 논의되어 있다. 효모 에스. 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서의 발현을 위한 벡터의 예로는 pYepSecI (문헌 [Baldari et al., (1987) EMBO J. 6:229-234]), pMFa (문헌 [Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943]), pJRY88 (문헌 [Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123]) 및 pYES2 (캘리포니아주 샌디에고 소재의 인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corporaton)이 있다. 배양된 곤충 세포 (예를 들어, Sf 9 세포)에서 단백질을 생산하기 위한 핵산 발현에 유용한 바쿨로바이러스 벡터로는 pAc 시리즈 (문헌 [Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165]) 및 pVL 시리즈 (문헌 [Lucklow, V.A., and Summers, M.d. (1989) Virology 170:31-39])가 있다.

[0169] 포유동물 발현 벡터의 예로는 pCDM8 (문헌 [Seed, (1987) Nature 329:840]) 및 pMT2PC (문헌 [Kaufman et al. (1987), EMBO J. 6:187-195])이 있다.

[0170] 벡터는 일반적으로 본 발명의 핵산과 작동가능하게 회합된 발현 제어 요소 (예를 들어, 프로모터)를 포함한다. 목적하는 수준 및 조직-특이적 발현에 따라 다양한 발현 제어 요소가 사용될 수 있음을 잘 알 것이다. 또한, 프로모터는 구조성 또는 유도성 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터 또는 호르몬 유도성 프로모터)일 수 있다. 발현 제어 요소는 숙주 세포의 것이거나 외래성일 수 있고, 천연 또는 합성 서열일 수 있다. 프로모터는 일반적으로 해당 표적 세포(들)에서 기능하도록 선택된다. 핵산은 또한 다른 적절한 발현 제어 서열, 예를 들어 전사/번역 조절 신호 및 폴리아데닐화 신호와 회합될 수 있다. 바이러스 조절 요소는 대개 포유동물 세포에서 이용된다. 예를 들어, 포유동물 발현 벡터에서 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시토메갈로바이러스 및 시미안 바이러스(Simian Virus) 40으로부터 유래한다.

[0171] 더욱이, 특이적 개시 신호는 일반적으로 삽입된 단백질 코딩 서열의 효과적인 번역을 위해 필요로 된다. ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함할 수 있는 이들 번역 제어 서열은 천연 및 합성의 다양한 기원으로부터 얻을 수

있다.

[0172] 본 발명은 또한 본 발명의 단리된 핵산 및 벡터를 포함하는 숙주 세포 (예를 들어, 효모, 박테리아, 포유동물, 곤충, 식물 또는 진균 세포)를 제공한다. 상기 세포는 본 발명의 핵산 또는 벡터에 의해 일시적으로 또는 안정하게 형질전환될 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산은 숙주 세포의 게놈에 안정하게 도입된다. 또한, 세포는 배양될 수 있거나 (즉, 단리될 수 있거나), 살아있는 유기체 내에 있는 세포일 수 있다.

[0173] 사용 방법

[0174] 본 발명의 항체, 항원-결합 단편, 핵산 및 제약 조성물은 수많은 연구, 진단 및(또는) 치료 용도에 이용될 수 있다. 설명을 위해, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 B 세포 특이적 마커인 CD20에 특이적으로 결합한다. 따라서, 이들 시약은 B 세포 확인 방법, CD20 기능 연구 방법 뿐만 아니라, CD20 또는 B 세포의 면역친화성 정제 방법에 사용된다. B 세포의 단리 방법은 실험실 연구, 치료 또는 진단 방법에 이용될 수 있다. 예를 들어, 조직 또는 세포를 B 세포 악성종양을 갖는 대상체로부터 제거하여, B 세포를 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편으로부터 정제해 내고, B 세포 고갈된 조직 또는 세포를 대상체에게 재도입할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체, 항원-결합 단편 및 조성물은 진단을 위한 목적으로, 예를 들어 림프종을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 치료제와 접합된 항체 또는 항원-결합 단편을 이용하여 분자의 B 세포 특이적 전달을 제공한다 (상기 기재됨). 또한, 본 발명은 B 세포 고갈의 치료 방법, 예를 들어 B 세포 악성종양 및 자가면역 질환과 같은 B 세포 장애의 치료법을 제공한다.

[0175] 한 특정 실시양태에서, 본 발명은 B 세포 고갈 유효량의 본 발명의 mAb, 항원-결합 단편 또는 제약 조성물을 포유동물 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 동물 대상체 (예를 들어, 포유동물 대상체)에서의 B 세포 고갈 방법을 제공한다. "B 세포 고갈 유효량"이란, 약 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 이상의 B 세포 감소율 (즉, 고갈률)을 달성하는데 유효한 양을 의미한다. 일부 실시양태에서는, 검출가능한 B 세포가 전혀 또는 실질적으로 전혀 없게 될 것이다. B 세포의 검출 및 B 세포 고갈의 측정 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 실시예 9 내지 12, 14 및 17 참조). 대표적인 실시양태에서, 약 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 이상의 고갈률은 말초 순환 및(또는) 조직 (예를 들어, 비장, 림프절) B 세포에서 달성된다. 당업자라면, 임상적 적용을 위해 말초 순환 B 세포를 측정/모니터링하며, 이는 조직에서의 B 세포 고갈률을 평가하는 방법보다 일반적으로 덜 침윤적이라는 것을 이해할 것이다.

[0176] 본 발명은 또한 치료-유효량의 본 발명의 하나 이상 모노클로날 항체, 항원-결합 단편 또는 제약 제제를 B 세포 장애를 갖는 동물 (예를 들어, 포유동물) 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, B 세포 장애의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, B 세포 장애는 B 세포 악성종양 또는 자가면역 질환이다.

[0177] 용어 "B 세포 악성종양" 및 이의 문법적인 변형어는 골수 또는 림프절과 같은 림프구 조직에서 전형적으로 발생하는 B 세포의 악성종양 또는 신생물을 지칭하도록 가장 넓은 의미로 사용되지만, 갑상선, 위장관, 침샘 및 결합 조직과 같은 비-림프구 조직에서도 발생할 수 있다. 본 발명의 치료 방법은 구체적으로 CD20-양성 B 세포 악성종양과 관련이 있으며, 예를 들어 비제한적인 예로서 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종 (NHL), 버킷(Burkitt) 림프종, 다중 골수종, 만성 림프성 백혈병, 모상 세포 백혈병, 왈덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증 및 전 림프구성 백혈병의 B-세포 서브타입이 있다. B-세포 서브타입 비-호지킨 림프종은 악성 B 세포 림프구에 의해 유발되는 큰 균의 림프종 (29가지 유형이 넘음)을 포괄하기 위해 사용되는 용어이며, 저등급/여포성 NHL, 소림프구 (SL) NHL, 중등급/여포성 NHL, 중등급 확산 NHL, 고등급 면역모세포성 NHL, 고등급 림프모세포성 NHL, 고등급 소형 비분할 세포 NHL 및 벌키 질환 NHL을 비롯하여 이에 제한되지 않는 공지된 유형의 림프종의 큰 서브타입을 나타낸다.

[0178] 자가면역 장애는 부분적으로 자가-내성이 붕괴되어, 발병 조직에서 자기 항체의 생산 및 이뮤노글로불린의 축적과 같은 자기 자신에 대한 후속적인 면역 반응을 유도하는 것에 의해 유발된다. 자기 항체는 상보적이고 Fc-수용체 매개된 조직 염증 및 파괴를 촉진하는 면역 복합체를 형성한다. 대부분의 자가면역 질환은 정상 신체 조직에 대해 반응성인 항체를 생산함으로써 발생하거나, 그러한 항체에 의해 악화된다. B 림프구는 자기 항체의 근원이기 때문에, 이러한 유형의 면역-매개된 질환의 치료를 위한 합당한 표적이 된다. B 림프구는 또한 항원을 제공할 수 있고, 이펙터 T 림프구의 발생을 조절한다.

[0179] 80가지 이상의 자가면역 질환이 확인되었다. 자가면역 질환, 그의 병인 및 치료법은 미국 건강 연구소의 자가면역 질환 조정 위원회에 의해 출판된 자가면역 질환 연구 계획에서 심도있게 논의되어 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 대표적인 자가면역 질환으로는 면역 복합체 장애, 예를 들어 사구체 신염, 굿스패처

(Goodspature) 증후군, 괴사성 맥관염, 림프절염, 결절성 동맥주위염 및 전신성 홍반성 루푸스가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 예시적인 자가면역 질환으로는 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 건선, 궤양성 대장염, 전신성 경화증, 피부근염/다발성근염, 항-인지질 항체 증후군, 공피증, 심상성 천포창, ANCA-관련 맥관염 (예를 들어, 웨그너(Wegener) 육아종증, 현미경적 다발성혈관염), 포도막염, 쇠그렌(Sjogren) 증후군, 크론(Crohn)병, 라이터(Reiter) 증후군, 강직성 척추염, 라임(Lyme) 관절염, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토(Hashimoto) 갑상선염 및 심근증을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 항체 생산과 관련된 다른 질환으로는 다발성 경화증, 아토피성 피부염, 혈소판 감소성 자반증, 무과립구증, 자가면역 용혈성 빈혈증, 임신중 태아 A-B-O 혈액군과 같은 외래 항원에 대한 면역 반응, 근무력증, 제I형 당뇨병, 그레이브스(Graves)병 및 알러지 반응이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0180] 본 발명의 방법은 B 세포 또는 항체가 연관된 임의의 다른 장애 또는 증상, 예를 들어 이식 거부반응의 치료에 이용될 수 있다.

[0181] "치료 유효량"은 대상체의 증상을 다소 개선 또는 경감시키거나, 증상의 재발 또는 반복을 예방 또는 지연시키는데 충분한 항-CD20 항체 또는 항원-결합 단편의 양이다.

[0182] 대상체는 B-세포 악성종양 또는 특정 자가면역 질환의 임상적 표지를 추적하기 위해 당업계에 공지된 표준 기술에 의해 모니터링될 수 있다. 예를 들어, B-세포 악성종양의 경우, 항-CD20 항체를 이용하여 종양 퇴화 (예를 들어, 충실성 종양의 경우 종양 크기), 순환 B-세포 또는 생검 조직의 표현형을 모니터링할 수 있다.

[0183] 당업자라면 투여량은 수많은 인자, 예를 들어 대상체의 연령, 성별, 종 및 상태, 목적하는 고갈률, 치료하고자 하는 질환 및(또는) 사용될 특정한 항체 또는 항원-결합 단편을 고려하여 선택될 수 있으며, 당업자에 의해 결정될 수 있음을 잘 알 것이다. 예를 들어, 비-호지킨 림프종 환자 또는 자가면역 질환 환자는 본원에 기재된 항-CD20 항체를 약 0.0005 내지 약 1500 mg/m²/주, 구체적으로 약 0.001 내지 약 150 mg/m²/주, 더욱 구체적으로 약 0.25 내지 약 75 mg/m²/주, 더욱 구체적으로 약 2.5 내지 약 50 mg/m²/주 투약받을 수 있다.

[0184] 본 발명의 실시양태에서, 항체 및 항원-결합 단편은 통상적인 항-CD20 항체에 비해 보다 큰 밀도로 B 세포에 결합하며, 따라서 B 세포 (상기 정의됨)의 더욱 효과적인 고갈률 (즉, 보다 낮은 투여량)을 나타낸다. 대안적으로 또는 추가로, 더욱 효과적인 고갈률은 항체와 반응하는 특정 에피토프에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, (임의로, 제약 조성물의 일부분으로서 제약학적으로 허용되는 담체 중의) 항체 또는 항원-결합 단편의 투여량은 약 0.0005, 0.001, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 37.5, 50 또는 100 mg/m² 이상 및(또는) 약 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.1, 0.075 또는 0.01 mg/m² 미만이다. 다른 예시적인 실시양태에서, 투여량은 약 0.0005 내지 약 200 mg/m², 약 0.001 내지 150 mg/m², 약 0.075 내지 125 mg/m², 약 0.375 내지 100 mg/m², 약 2.5 내지 75 mg/m², 약 10 내지 75 mg/m² 및 약 20 내지 50 mg/m²이다.

[0185] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 본 발명의 mAb, 항원-결합 단편 및(또는) 조성물은 약 375 mg/m²보다 낮은 투여량, 약 37.5 mg/m²보다 낮은 투여량, 약 0.375 mg/m²보다 낮은 투여량 및(또는) 약 0.075 mg/m² 내지 약 125 mg/m²의 투여량으로 투여될 수 있다.

[0186] 명시한 투여량은 약 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 또는 180 일 이상의 기간 동안 (상기 기재한) B 세포 고갈률을 나타낼 수 있다.

[0187] 본 발명의 대표적인 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편 약 125 mg/m² 이하의 투여량은 약 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 또는 120 일 이상의 기간 동안 (상기 기재한) B 세포 고갈률을 나타낸다. 또다른 대표적인 실시양태, 약 37.5 mg/m² 이하의 투여량은 약 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 또는 120 일 이상의 기간 동안 B 세포 고갈을 나타낸다. 또다른 실시양태에서, 약 0.375 mg/m² 이하의 투여량은 약 7, 14, 21, 30, 45 또는 60 일 이상의 기간 동안 B 세포 고갈을 나타낸다. 또다른 실시양태에서, 약 0.075 mg/m² 이하의 투여량은 약 7, 14, 21, 30, 45 또는 60 일 이상의 기간 동안 B 세포 고갈을 나타낸다. 또다른 실시양태에서, 약 0.01 mg/m², 0.005 mg/m² 또는 심지어 0.001 mg/m² 이하의 투여량은 약 3, 5, 7, 10, 14, 21 또는 30 일 이상의 기간 동안 B 세포 고갈을 나타낸다. 이들 실시양태에 따르면, 상기 투여량은 임의의 적합한 경로 (하기 기재됨)를 통해 투여될 수 있고, 임의로 피하 경로를 통해 투여된다.

[0188] 또다른 측면으로서, 본 발명은 B 세포 고갈 및(또는) B 세포 장애의 치료가 일반적으로 사용가능한 방법에 사용하는 것보다 적은 투여량의 항체 또는 항체 단편에서 달성될 수 있다는 사실을 제공한다. 따라서, 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD20에 특이적으로 결합하는 유효량의 mAb 또는 그의 항원-결합 단편을 동물 대상체 (예를

들어, 포유동물 대상체)에 투여하는 것을 포함하는 B 세포 고갈 및(또는) B 세포 장애 치료 방법을 제공하며, 여기서 약 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.001, 0.0005 mg/m² 이하의 투여량으로 적어도 약 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 또는 180일 이상 동안 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 이상의 B 세포 (순환 및 (또는) 조직 B 세포)의 고갈률이 얻어진다. 대표적인 실시양태에서, 약 125 mg/m² 또는 75 mg/m² 이하의 투여량으로 약 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120, 150 또는 180 이상 동안 약 50%, 75%, 85% 또는 90% 이상의 B 세포 고갈률이 얻어진다. 다른 실시양태에서, 약 50, 37.5 또는 10 mg/m² 투여량으로 약 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120 또는 180일 이상 동안 약 50%, 75% 85% 또는 90% 이상의 B 세포 고갈률이 얻어진다. 다른 실시양태에서, 약 0.375 또는 0.1 mg/m²의 투여량으로 약 7, 14, 21, 30, 60, 75 또는 90일 이상 동안 약 50%, 75%, 85% 또는 90% 이상의 B 세포 고갈률이 얻어진다. 추가 실시양태에서, 약 0.075, 0.01, 0.001, 또는 0.0005 mg/m²의 투여량으로 약 7, 14, 21, 30 또는 60일 이상 동안 약 50%, 75%, 85% 또는 90% 이상의 B 세포 고갈률이 얻어진다. 이들 실시양태에 따라, 투여량을 임의의 적합한 경로 (하기 기재하는 바와 같음)에 의해 투여할 수 있지만, 임의로 피하 경로에 의해 투여한다.

[0189] 이 실시양태에 따라, 항체 또는 항원-결합 단편은 본원에 기재한 바와 같이 항체 또는 항원-결합 단편 (기능적으로 동등한 항체 및 항원-결합 단편을 포함)이다. 다른 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 통상적 항체 (상기 기재한 바와 같음)에 비해 더 높은 밀도로 CD20 또는 B 세포에 결합한다.

[0190] 본 발명의 항체, 항원-결합 단편 및 제약 조성물은 다른 치료제 또는 방식과 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, B-세포 악성종양의 경우에, 이러한 방식 또는 치료법에는 화학요법, 방사선면역치료법(RIT), 화학요법 및 외부 방사선 (병용요법, CMT), 또는 병용 방사선면역치료법(CMRIT) 단독으로 또는 조합 등이 포함된다. 따라서, 본 발명의 항-CD20 항체 및 항체 단편은 비-호지킨 림프종을 치료하기 위한 가장 통상적인 화학요법 처방인 CHOP(시클로포스파미드-히드록시도소루비신-온코빈(빈크리스틴)-프레드니솔론)와 조합할 수 있다. 또한, 항-CD20 항체는 본원에서 항-CD19, 항-CD22 (예를 들어, 미국 특허 제5,484,892호, 미국 출원번호 제 10/371,797호의 미국 특허 공개번호 제2004/0001828호, 미국 가출원번호 제60/420,472호 및 미국 출원번호 제 10/372,481호의 미국 특허 공개번호 제2003/0202975호에 기재된 바와 같음, 이들 각각은 그 전문이 CD22 항원 및 항-CD22 항체의 그들 교시에 대해 본원에 참고로 도입됨), 및 다른 항-CD20 항체, 예를 들어 리투산(Rituxan) (등록상표) (C2B8; 리투시맵; IDEC 파마슈티칼즈(IDEC Pharmaceuticals))을 포함하는 다른 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

[0191] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 mAb 및(또는) 그의 항원-결합 단편 및 추가로 1종 이상의 추가 항체 및(또는) 그의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물 대상체에서의 B 세포 고갈 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 추가 항체는 항-CD22, 항-CD19 항체 또는 상기 항체 모두일 수 있다. 추가 항체 또는 그의 항체 및(또는) 항원-결합 단편(들)을 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편의 투여에 관련된 임의의 순서로 투여할 수 있다. 예를 들어, 추가 항체 또는 항체 및(또는) 항원-결합 단편(들)은 본 발명의 항체 및(또는) 항원-결합 단편의 투여 전, 동시 및(또는) 후에 대상체에게 투여할 수 있다. 추가 항체 또는 항체 및(또는) 항원 단편(들)은 본 발명의 항체 및(또는) 항원-결합 단편과 동일한 제약 조성물, 및(또는) 상이한 제약 조성물에 존재할 수 있다. 본 발명의 항체 및(또는) 항원-결합 단편의 투여량 및 투여 방식 및 추가 항체 또는 항체 및(또는) 항원-결합 단편(들)의 투여량은 본원에 제공되고, 당업계에 잘 공지된 바와 같은 투여량 및 투여 방식의 임의의 교시에 따라 동일하거나 또는 상이할 수 있다.

[0192] 한 특정 실시양태에서, 대상체에 본 발명의 항체 외에 단핵구 또는 대식세포 기능을 증진시키는 (예를 들어, 적어도 약 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 9% 이상) 화합물을 투여한다. 이러한 화합물은 당업계에 공지되어 있고, 이에 는 사이토킨, 예를 들어 인터루킨 (예를 들어, IL-12), 및 인터페론 (예를 들어, 알파 또는 감마 인터페론)이 포함되며 이에 제한되지 않는다. 단핵구 또는 대식세포 기능 또는 증강성을 증진시키는 화합물은 항체 또는 항원-결합 단편과 동일한 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 개별적으로 투여하는 경우에, 항체/단편 및 화합물은 동시에 (서로 수시간 내에), 치료법의 동일한 과정 동안, 또는 순차적으로 (즉, 환자에 먼저 항체/단편 처리 과정을 수행하고, 이어서 대식세포/단핵구 기능을 증진시키는 화합물의 과정을 수행하거나 또는 역으로 수행함) 투여할 수 있다.

[0193] 본 발명의 이 실시양태는 본 발명의 항체 및 항체 단편 또는 당업계에 공지된 기타 항체와 함께 실행될 수 있고, 항-CD20 모노클로날 항체 치료법 (예를 들어, 항체, 예를 들어 C2B8의 존재를 사용하는 치료법)에 내성인

대상체, 화학요법과 동시에 또는 이전에 처리된 대상체, B 세포 장애가 재발된 대상체, 면역저하된 대상체, 또는 달리 대식세포 또는 단핵구 기능에 손상이 있는 대상체에 특히 적합하다. 본 발명자들은 단핵구에 의해 우선적으로 매개된 항체-의존 세포독성 (ADCC)이 B 세포 고갈에서 이미 인지된 것보다 중요한 역할을 수행한다는 것을 발견하였다. 항-CD20 치료법에 내성이거나 또는 B 세포 장애가 재발된 환자의 유병율은 적어도 부분적으로 대식세포 또는 단핵구 기능의 손상에 기인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 항-CD20 항체 및 항원-결합 단편의 투여 방법과 함께 사용되는 ADCC 및(또는) 대식세포 및(또는) 단핵구 기능 증진 방법을 제공한다.

[0194] 본 발명에 따른 대상체는 인간 대상체일 수 있지만, 본 발명은 또한 비-인간 포유동물 및 조류를 치료하기 위한 수의학 용도로 실행될 수 있다. 본 발명의 진단 및 치료 방법이 실행될 수 있는 포유동물 대상체의 비-제한적 예에는 마우스, 래트, 기니픽, 돼지, 염소, 양, 비-인간 영장류, 말, 개, 고양이, 소, 토끼 및 인간이 포함된다. 조류에는 닭, 칠면조, 메추라기, 거위 및 오리가 포함된다.

[0195] 본 발명의 항체 조성물은 흡입 (예를 들어, 에어로졸을 포함), 협측 (예를 들어, 설하), 국소적 (즉, 기도 표면을 포함한 피부 및 점막 표면 모두), 경막내, 관절내, 흉막내, 뇌내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 경구, 림프계내, 근육내, 피내, 피하, 경피, 비내, 직장 또는 질 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 투여 방식을 사용하여 투여할 수 있고, 연동 수단에 의해 또는 저장 형태로 전달할 수 있지만, 임의의 주어진 경우에서의 가장 적합한 경로는 당업계에 잘 공지된 바와 같이 종, 연령, 성별 및 대상체의 전체 상태, 치료될 상태의 특성 및 중증도 및(또는) 투여될 특정 조성물의 특성 (즉, 투여량, 제형)과 같은 인자에 따라 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, 투여 경로는 소정 기간에 걸쳐, 1주 1회 또는 2회로 일시 또는 연속 주입을 통해서 이루어진다. 다른 특정 실시양태에서, 투여 경로는 피하 주사에 의해 임의로 1주 1회 또는 2회로 이루어진다.

[0196] 투여에 적합한 방식은 치료될 대상체 및 상태로 변할 수 있지만, 초기 투여 후에 차후 주사 또는 다른 투여에 의해 1회 이상의 간격에서 반복된 투여로 대표된다. 간격은 투여간에 수시간 정도로 짧거나, 또는 1주 이상 정도로 길 수 있다. 대안적으로, 연속 정맥내 주입은 혈액에서 유효한 농도를 유지하기 위해 사용할 수 있다.

[0197] 본원에 개시된 항체는 시험관내 과정에 사용할 수도 있다. 항체는 B 림프구 발생의 특이적 단계 동안 B 림프구에서 발현되는 CD20에 선택적으로 결합한다. 이와 같이, 본 발명의 항체는 세포의 혼합된 샘플, 예를 들어 전혈로부터 B 림프구를 특이적으로 고갈시키기 위해 사용할 수 있다. 부유 또는 고갈된 B 림프구 분획은 다른 세포 유형에 의한 간섭 또는 상호작용의 위험 없이 실험적으로 필요하기 때문에 사용될 수 있다. 시험관내 혼합된 세포 집단으로부터 B 림프구를 분리하기 위해 본원에 개시된 항체를 사용하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 비-제한적 예로서, FACS, 패닝 및 자기 분리 기술은 본원에 개시된 항체를 사용하여 B 림프구를 혼합된 세포 집단으로부터 분리할 수 있다.

[0198] 본원에 개시된 항체는 B 림프구의 발생상 하위집단을 서로 구별하기 위해 사용할 수도 있다. CD20은 프로-B 림프구 상에서 발현되지 않는다. 일부 발현은 프리-B 림프구에서 발견할 수 있다. 미성숙, T₁ 및 T₂ 과도기 B 림프구는 더 높은 양의 CD20을 발현한다. 성숙 B 림프구는 더 낮은 수준의 CD20을 발현한다. 이 정보는 상기 논의한 기술 또는 당업자에게 공지된 다른 것과 조합하여 B 림프구의 연구 집단에 해당하는 발생 단계가 무엇인지를 결정하기 위해 유용하다.

[0199] 제약 조성물

[0200] 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 제약 조성물을 또한 제공한다. 본 발명의 제약 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체를 활성 성분으로서 그에 용해 또는 분산된, 본원에 기재한 1종 이상의 항체 또는 항체 단편과 함께 함유한다.

[0201] 본원에 사용하는 바와 같이, 조성물, 담체, 희석제 및 시약에 언급되는 용어 "제약학적으로 허용되는"은 물질이 원치않는 생리학상 영향 또는 독성의 생성 없이 동물에 또는 동물 상에 투여할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0202] 제약 조성물의 제제화는 제약 화학 업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, (15th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975), particularly Chapter 87, by Blaug, Seymour)] 참조). 제약 조성물에는 제한 없이 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 무수 흡수 기재, 수중유 또는 유중수 에멀전, 에멀전 카르보왁스 (각종 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반-고형 겔, 및 카르보왁스를 함유한 반-고형 혼합물이 포함된다. 전형적 투여 형태는 비경구 (예를 들어, 정맥내 또는 피하) 경로에 의해 투여하기에 적합한 멸균 등장성 물-기재 용액이다. 제약 제제 중에 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 농도는 매우 다양할 수 있는데, 예를 들어 약 0.01 중량%, 0.1 중량%, 0.5 중량%, 1 중량% 또는 2 중량% 미만 내지 5 중량%, 10 중량%, 20 중량% 또는 50 중량% 이상일 수 있고, 선택된 특정 투여 방식에 따

라 유체 부피, 점성 등에 의해 우선적으로 선택될 것이다.

- [0203] 본 발명의 제약 조성물은 리포솜을 통해 투여될 수도 있다. 리포솜에는 에멀전, 발포체, 미포, 불용성 단층, 액체 결정, 인지질 분산물, 판층 등이 포함된다. 이들 제제에서, 전달될 본 발명의 조성물은 리포솜의 부분으로, 단독으로 또는 목적 표적에 결합된 분자, 예를 들어 항체 또는 다른 치료상 또는 면역원 조성물과 함께 도입된다. 본 발명에 사용하기 위한 리포솜은 일반적으로 중성 및 음성 하전된 인지질 및 스테롤, 예를 들어 콜레스테롤을 포함하는 표준 소포-형성 지질로부터 형성된다. 지질의 선택은 예를 들어 리포솜 크기, 산 불안정성 및 혈류에서의 리포솜의 안정성의 고려에 의해 일반적으로 좌우된다. 각종 방법이 예를 들어 문헌 [Szoka et al. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980)], 미국 특허 제4,235,871호, 동 제4,501,728호, 동 제4,837,028호 및 동 제5,019,369호에 기재된 바와 같이 리포솜을 제조하기에 사용가능하다.
- [0204] 제약 조성물에 용해 또는 분산된 활성 성분을 함유한 제약 조성물의 제조는 당업계에 널리 이해되고 있다. 전형적으로 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조되지만, 액체에서 사용하기 전에 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태도 제조될 수 있다. 제제는 에멀전화될 수도 있다.
- [0205] 활성 성분은 제약학적으로 허용되고, 활성 성분과 상용가능한 부형제를 본원에 기재한 방법에 사용하기에 적합한 양으로 혼합할 수 있다. 적합한 부형제에는 예를 들어 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합이 있다. 또한, 필요에 따라, 조성물은 활성 성분의 유효성을 증진시키는 보조제 물질, 예를 들어 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제 등을 유의하지 않은 양으로 함유할 수 있다.
- [0206] 제약 조성물은 그 중의 성분들의 제약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 제약학적으로 허용되는 염은 무기 산, 예를 들어 염산 또는 인산, 또는 유기 산, 예를 들어 아세트산, 타르타르산, 만델산 등과 형성되는 산 부가 염 (폴리펩티드의 유리 아미노기와 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복실기와 형성된 염은 무기 염기, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물, 및 유기 염기, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수도 있다.
- [0207] 실례가 되는 액체 담체에는 활성 성분 및 물 이외에 물질을 함유하지 않거나, 또는 완충액, 예를 들어 생리학상 pH 값의 인산나트륨, 생리학상 염수 또는 이들 모두, 예를 들어 포스페이트-완충 염수를 함유하는 멸균 수성 용액이 있다. 추가로, 수성 담체는 1종 이상의 완충액 염, 뿐만 아니라 염, 예를 들어 염화나트륨 및 염화칼륨, 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 다른 용질을 함유할 수 있다.
- [0208] 액체 조성물은 물 이외에 및 물을 제외할 만큼 액상을 또한 함유할 수 있다. 이러한 추가 액상의 예에는 글리세린, 식물성유, 예를 들어 면실유, 및 수-유 에멀전이 있다.
- [0209] 본 발명에 기재한 것을 하기 실시예에 더 상세히 설명하는데, 이는 단지 설명하기 위해 본원에 포함되는 것이지만 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.
- [0210] 실시예 1
- [0211] 재료 및 방법
- [0212] CD2^{-/-} 마우스의 생성. 인트론/엑손 경계를 확인하기 위해 Cd20 유전자의 3' 말단을 코딩하는 DNA를 129/Sv 계통 마우스 DNA 파지 라이브러리로부터 단리하고, 맵핑하고, 서열분석하였다 (도 1A 및 도 1B) (문헌 [Tedder, et al. (1989) J. Immunol. 142: 2560]). 유전자-표적화는 pMC1-HSV 유전자의 PstI (엑손 5) 내지 EcoRV (엑손 6, 약 1.8 kb) DNA 단편 하류를 함유한 pBluescript SK-기재 벡터 (p594)를 사용하였다. ~10 kb KpnI DNA 단편을 네오마이신 내성 (Neo^r) 마커의 하류에 삽입하였다 (도 1C). 플라스미드는 특이한 SalI 제한효소절단 부위를 사용하여 선형화하고, 표준 방법 (문헌 [Koller and Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932])에 따라 G418을 사용하여 선택되는 129 계통-유래 ES 세포 내로 형질감염시켰다. 115 Neo-내성 ES 세포 콜로니 6개가 표적 대립유전자를 가졌다 (도 1D). 적절한 표적화는 BamHI (> 12 kb 단편이 6.5 kb 밴드로 감소됨), KpnI (7.2 kb가 5.5 kb됨), 및 SspI (5.6 kb가 7.0 kb됨)로 절단한 DNA를 동일한 프로브를 사용하여 써던 분석함으로써 추가로 확인하였다. ES 세포 콜론 1개의 세포는 7 세대 이상 동안 C57BL/6 마우스를 교배시킨 80-100% 키메라 수컷 자손을 생산하였다. 이형접합성 자손을 교배시켜 동종접합 CD20^{-/-} 및 야생형 자손을 생산하였다 (도 1E). 대부분의 경우에, CD20^{-/-} 마우스 및 (C57BL/6 x 129)_{F1} 마우스의 야생형 자손을 사용하여 얻은 결과는 동일하므로, 결과를 모았다. 비장 및 복강 아집단 분석을 다양한 연령에서의 3 내지 10 자손 쌍을 사용하여 수행함으로써 단지 야생형과 CD20^{-/-} 마우스 간의 비교가 효과적이었다. 마우스를 특이적 병원체 없는

장벽-시설에 수용하고, 2 내지 3 월령에서 사용하였다.

[0213] 녹아웃 마우스. $Fc\gamma RI^{-/-}$ 및 $Fc\gamma RIII^{-/-}$ 마우스는 문헌 [Bruhns, et al. (2003) *Immunity* 18: 573-581]에 기재되어 있다. C57BL/6, $Fc\gamma RII^{-/-}$ (B6.129S-Fcgr2tm1Rav), $Fc\gamma RIII^{-/-}$ (C57BL/6-Fcgr3tm1Sjv), 베이지 (C57BL/6-Lyst^{bg/bg}), 퍼포린^{-/-} (C57BL/6-Pfptm1Sdz), CSF1^{op} (Csfl^{op}), 및 누드 (C57BL/6-Hfh11^{nu}) 마우스를 잭슨 래버러토리(Jackson Laboratory) (미국 메인주 바 하버에 소재함)로부터 얻었다. FcR 공통 γ 쇠 ($FcR\gamma$)-결핍 마우스($FcR\gamma^{-/-}$, B6.129P2-Fcerg1^{tm1})를 타코닉 팜즈(Taconic Farms) (미국 뉴욕주 게르만타운에 소재함)로부터 얻었다. 문헌 [Botto, et al. (1998) *Nat. Genet.* 19: 56-59]에 기재된 C1q^{-/-} 마우스는 마크 왈포트(Mark Walport) (영국 런던 임페리얼 칼리지)의 동의로 가르넷트 켈소에(Garnett Kelsoe) (듀크 유니버시티)에 의해 제공되었다. 문헌 [Zhang, et al. (1999) *Immunity* 10: 323-332]에 기재된 LAT^{-/-} 마우스를 웨이구오 칹(Weiguo Zhang) (듀크 유니버시티)으로부터 얻고, 문헌 [Wessels, et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11490-11494]에 기재된 C3^{-/-} 및 C4^{-/-} 마우스는 마이클 카롤(Michael Carroll) (미국 매사추세츠주 보스턴 소재의 혈액 조사 센터)로부터 얻었다. 대식세포-결핍 마우스는 표준 방법 [Van Rooijen and Sanders (1994) *J. Immunol. Methods* 174:83-93]을 사용하여 -2, 1 및 4일째에 클로드로네이트 캡슐화 리포솜 (0.1 mL/체중 10 g; 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 케미칼 코포레이션(Sigma Chemical Co.))를 꼬리 정맥 주사함으로써 생산하였다. 모든 마우스를 특이적 병원체 없는 장벽 시설에 수용하고, 최초 2 내지 3월령에 사용하였다.

[0214] 면역형광 분석. 단일-세포 백혈구 현탁액은 잘 수립된 방법 (문헌 [Zhou, et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 3884])으로 20 내지 60분 동안 예비결정 최적 농도의 항체 각각을 사용하여 빙상에서 염색하였다. 림프구의 직사광 및 측면광 산란성을 갖는 세포를 FACScan 또는 FACScalibur 유동 세포계측기 (미국 캘리포니아주 산 조세 소재의 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)) 상에서 분석하였다. 배경 염색은 98% 이상의 세포를 제외시키기 위해 위치한 게이트를 갖는 비반응성 대조군 모노클로날 항체 (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 칼타그 래버러토리즈(Caltag Laboratories))를 사용하여 결정하였다. 사용한 항체에는 CD19 모노클로날 항체 (MB19-1) (문헌 [Tedder, et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25: 1321]; [Tedder and Schlossman (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 10009]; [Valentine, et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 8085]; B220 모노클로날 항체 (RA3-6B2) (미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 드낙스 코포레이션(DNAX Corp.)); Thy1.2 (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 칼타그 래버러토리즈); IgM, I-A, CD5, CD11b, CD23 및 CD43과 반응성인 항체 (미국 뉴저지주 프랑클린 레이크스 소재의 비디 파르밍겐(BD Pharmingen)); 및 항-마우스 IgG3, IgM 및 IgD 항체 (미국 알라바마주 버밍엄 소재의 써던 바이오테크놀로지 어소시에이트즈 인크. (Southern Biotechnology Associates Inc.))가 포함된다.

[0215] 항체. HB20-1 내지 HB20-6 모노클로날 항체는 표준 방법 (문헌 [Steeber, et al. (1997) *J. Immunol.* 159: 952-963])에 따라 인간 CD20을 코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 마우스 프리-B 세포주로 면역화된 BALB/c 마우스에서 생산하였다. HB20-25 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체는 이미 기재된 문헌 [Steeber, et al. (1997) 상기 문헌]과 유사한 방법에 따라 인간 CD20을 코딩하는 cDNA로 형질감염시킨 마우스 프리-B 세포주 300.19로 면역화된 C57BI/6 x 129 유전적 배경 상의 CD20^{-/-} 마우스에서 생산하였다. 모든 MB20 모노클로날 항체는 상기 기재한 바와 같은 C57BI/6 x 129 유전적 배경 상의 CD20^{-/-} 마우스에서 생산하였다.

[0216] CD20-특이적 마우스 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마는 NS-1 골수종 세포를 무린 CD20-녹색 형광 단백질 (GFP) 형질감염된 300.19 세포로 면역화된 CD20^{-/-} 마우스로부터의 비장 세포와 융합시킴으로써 생산하였다 (문헌 [Kearney, et al. (1979) *J. Immunol.* 123: 1548]). 항-CD20 모노클로날 항체 MB20-1, -2 및 -14는 IgG1 이소형이고; MB20-6, -11, 및 -16은 IgG2a이고; MB20-7, -8, -10 및 -18은 IgG2b이고; MB20-3 및 -13은 IgG3 모노클로날 항체이었다. GFP와 융합된 마우스 CD20을 발현하는 300.19 프리-B 세포주와 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포는 세포주 각각을 융합된 단백질을 코딩하는 cDNA로 형질감염시킴으로써 생산하였다 (문헌 [Tedder, et al. (1988) *J. Immunol.* 141: 4388]). 형질감염된 세포는 GFP 발현에 기초한 형광-기재 세포 분류에 의해 분리하였다.

[0217] 항-CD20 모노클로날 항체 1F5 (문헌 [Shan, et al. (1999) *J. Immunol.* 162: 6589-6595]), B9E9 (문헌 [Schultz, et al. (2000) *Cancer Res.* 60: 6663-6669]), 및 1H4 (문헌 [Haisma, et al. (1998) *Blood* 92: 184-190])를 제5회 인간 백혈구 분화 항원에 대한 국제 워크숍 및 컨퍼런스 (미국 매사추세츠주 보스턴; 1993년

11월 3일 내지 7일)를 통해 얻었다. 벡크만-코울터(Beckman-Coulter) (미국 플로리다주 마이애미)로부터의 B1 항-CD20 모노클로날 항체 (문헌 [Stashenko, et al. (1980) J. Immunol. 125: 1678])를 정제한 모노클로날 항체 또는 회석한 복수 유체로서 사용하였다.

[0218] 세포내 Ca^{2+} 측정. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 수준에서의 변화는 세포를 염소 F(ab')_2 항-IgM 항체 (5-40 $\mu\text{g/mL}$; 미국 오하이오주 아우로라 소재의 카펠/ICN 파마슈티칼스, 인크.(Cappel/ICN Pharmaceuticals, Inc.)), 항-마우스 CD19 모노클로날 항체 (MB19-1; 40 $\mu\text{g/mL}$), 탐시가르긴 (1 μM ; 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마), 또는 이오노마이신 (2.67 $\mu\text{g/mL}$; 미국 캘리포니아주 라 줄라 소재의 칼바이오켄(CALBIOCHEM) (등록상표) 바이오사이언스, 인크.(Biosciences, Inc.))으로 처리한 후에 표준 방법 (문헌 [Shan, et al. (1998) Blood 91: 1644])에 따라 유동 세포계측법에 의해 모니터링하였다. 일부 경우에, EGTA (최종 5 mM)를 세포 현탁액에 첨가한 후에, 상기 기재한 시약을 첨가하였다.

[0219] B 세포 활성화 검정법. 비장 B 세포는 T 세포를 Thy1.2 항체-코팅 자기 비드 (미국 레이크 석세스 소재의 DYNAL(다이날) (등록상표) 인크.)로 제거함으로써 정제하였다 (> 93% B220⁺). 신호 도입 연구를 위해, B 세포 ($2 \times 10^7/\text{mL}$)를 5% 소 태아 혈청을 함유한 RPMI 1640 배지에서 37 °C에서 5분 동안 인큐베이션한 후에, F(ab')_2 항-마우스 IgM 항체 단편 (40 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하였다. 400 μM EDTA 및 100 μM Na 오르토바나테이트를 함유한 냉각 염수를 첨가한 후에, 세포를 잘 수립된 방법 (문헌 [Bradbury, et al. (1992) J. Immunol. 149: 2841]; [Fujimoto, et al. (1999) J. Immunol. 162: 7088])으로 세정제-용해하였다. CD20 구조 연구를 위해, B 세포를 EZ-LINK (등록상표) 술포-NHS-비오틴 (0.5 mg/mL; 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스(Pierce))로 표면-비오틴화하고, 이어서 세정제-용해하였다. 세포 용해물은 IgG1 모노클로날 항체(1 μg) 및 단백질 G-세파로스(G-SEPHAROSE) (등록상표) (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 아머삼 바이오사이언스(Amersham Biosciences))의 50% 현탁액 50 μL 를 2 μg 의 모노클로날 항체 및 단백질 G-세파로스 (등록상표)로 면역침전시킨 단백질과 함께 사용하여 예비청결화하였다. 비드는 고- 및 저-염 RIPA 완충액으로 2회, 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 2회, 샘플 완충액 (10% 2-머캅토에탄올과 함께 또는 없이)에서 비등시키고, 전기영동하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 전체 세포 용해물의 블롯은 MB20-1 모노클로날 항체, 퍼옥시다제-접합 4G10 항체 (미국 뉴욕주 레이크 플라시드 소재의 업스테이트 바이오테크놀로지(Upstate Biotechnology)) 또는 항-포스포-CD19 (Y513), -PLC γ (Y783), -Syk(Y525/Y526), -BTK (Y223), -Src 패밀리카나제 항체 (미국 매사추세츠주 베버리 소재의 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)), 또는 항-활성 MAPK 항체(미국 위스콘신주 매드슨 소재의 프로메가(PROMEGA) (등록상표))로 프로빙하였다. 막을 스트립핑하고, 토끼 폴리클로날 항-SHP-1 항체 (업스테이트 바이오테크놀로지), 또는 항-Lyn (lyn-44), 항-Fyn (Fyn3) 및 항-ERK2 (C-14) 항체 (미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재의 산타 크루즈 바이오테크놀로지, 인크.(Santa Cruz Biotechnology, Inc.))로 다시 프로빙하였다. 비오틴화 단백질 또는 항체는 증진된 화학발광 키트(ECL (등록상표); 미국 일리노이주 록랜드 소재의 피어스)인 스트렙타비딘-접합 양고추냉이 퍼옥시다제 (미국 알라바마주 버밍엄 소재의 써던 바이오테크놀로지 어소시에이츠 인크.)를 사용하여 탐지하였다.

[0220] CD20 인산화를 연구하기 위해, 1차 B 세포 ($10^7/\text{mL}$)를 지질다당류 (LPS) (이. 콜라이 혈청형 0111: B4, 10 $\mu\text{g/mL}$, 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마)와 48시간 동안 배양하였다. 1차 B 세포 및 세포주를 이어서 포스페이트-무함유 배지에서 1시간 동안 배양하고, 200 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{32}P] 오르토포스페이트(미국 매사추세츠주 보스턴 소재의 퍼킨엘머(PerkinElmer))를 함유한 배지에서 90분 동안 배양하고, 세척하고, 용해하고, 면역침전시키고, 표준 방법 (문헌 [Kansas and Tedder (1991) J. Immunol. 147: 4094]; [Leveille, et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29: 65])에 따라 자가방사선술과 함께 수행하며 SDS-PAGE에 의해 분리하였다.

[0221] 기능적 분석. 비장 B 세포 증식은 [^3H] 티미딘 도입의 표준 방법 (문헌 [Engel, et al. (1995) Immunity 3: 39])에 따라 측정하였다. 8주령 마우스를 2,4-디니트로페놀-접합 키홀 림펫 헤모시아닌 (100 μg , DNP-KLH; 미국 캘리포니아주 라 줄라 소재의 칼바이오켄 (등록상표)-노바비오켄(Novabiochem))으로 면역화시키거나, 또는 잘 공지된 방법 (문헌 [Jacob, et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 1165])에 따른 백반에서 침전된 닭 감마글로불린 (50 μg , NP $_{18}$ -CGG)에 접합된 (4-히드록시-3-니트로페닐 아세틸)로 2회 면역화시켰다. 혈청 DNP- 및 NP-특이적 항체 수준은 표준 방법 (문헌 [Takahashi, et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 885])을 사용하여 평가한 항체 반응의 상대적 친화성/결합성을 사용하는 ELISA (문헌 [Engel, et al. (1995) Immunity 3: 39]; [Takahashi, et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 885])에 의해 측정하였다.

- [0222] 면역치료법. PBS 200 μ l 중의 멸균 항-마우스 CD20 및 이소형 대조군 모노클로날 항체 (0.5 내지 250 μ g)를 측면 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 모든 실험은 달리 나타내지 않는 한 250 μ g의 모노클로날 항체를 사용하였다. 혈액 및 비장을 처리 1시간 및 2, 4, 7, 28, 48, 50, 52, 54, 56 또는 58일 후에 수집하였다. 혈액 백혈구 수를 적혈구 용해 후에 혈구계로 정량하며, B220⁺ B 세포 빈도수는 유동 세포계측법 분석을 사용하는 면역형광 염색에 의해 측정하였다. 인간 및 마우스에서의 항체 투여량 (표 7)은 온콜로지 툴 도스 캘큘레이터(Oncology Tool Dose Calculator) (www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm)를 사용하여 비교하였다.
- [0223] C 분석. WT 마우스 비장 B 세포는 Thy-1.2 모노클로날 항체-코팅 자기 비드(미국 레이크 석세스 소재 다이날 (등록상표))를 사용하는 T 세포 제거에 의해 정제하였다 (> 93% B220⁺). 시험관내 C-매개된 B 세포 사멸의 정량화를 표준 방법 (문헌 [Gazzano-Santoro, et al. (1997) J. Immunol. Methods 202: 163-171])에 따라 수행하였다. 비장 B 세포를 각각의 항-CD20 모노클로날 항체 (0.5 μ g/mL) 및 토끼 새끼 C (50배 희석함; 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 GIBCO-BRL)와 2시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. PBS를 4시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하며 각 튜브에 첨가한 후에, 세포를 세척하고, 요오드화프로피듐(PI) 및 항-B220 모노클로날 항체로 염색하며, 요오드화프로피듐 배제를 유동 세포계측법 분석으로 측정하였다.
- [0224] 중쇄 및 경쇄 유전자 사용. 세포질 RNA는 RNEASY (등록상표) 미니 키트(Mini Kit)(미국 캘리포니아주 카츠워스 소재의 퀴아젠(QIAGEN) (등록상표))를 사용하여 1 내지 10 x 10⁵ 하이브리도마 세포로부터 추출하였다. 제1-가닥 cDNA는 올리고-dT 프라이머(dT₁₈) 및 수퍼스크립트(SUPERSCRIPT) (등록상표) 키트 (미국 메릴랜드주 가이테르스버그 소재의 기브코 BRL(Gibco BRL))를 사용하여 세포질 RNA로부터 합성하였다. cDNA 용액 1 μ l를 V_H 유전자의 PCR 증폭용 주형으로서 사용하였다. PCR 반응을 10 mM 트리스-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)), 50 pmol의 각 프라이머, 및 5 U의 Taq DNA 중합효소 (미국 유타주 카이슬빌 소재의 ISC 바이오익스프레스(ISC Bioexpress))로 이루어진 100- μ l 부피의 반응 혼합물에서 수행하였다. 30회 사이클(1분 동안 94 °C, 1분 동안 58 °C, 1분 동안 72 °C; 써모사이클러(Thermocycler), 퍼킨 엘머) 동안 증폭하였다. V_H 유전자는 당업계에 잘 공지된 뒤섞인 (promiscuous) 센스 5' V_H 프라이머 (MsVHE; 5'GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G3'; 서열 110)[Kantor, et al. (1996) J. Immunol. 158: 1175-1186] 및 C _{μ} 코딩 영역 (프라이머 C _{μ} -in; 5'GAG GGG GAA GAC ATT TGG GAA GGA CTG3'; 서열 111), C _{γ} 영역 (프라이머 C _{γ} 1; 5'GAG TTC CAG GTC ACT GTC ACT GGC3'; 서열 112) 또는 C _{α} 영역 (프라이머 C _{α} ; 5'GTG AAT TCA GGC GGC CGC TAA3'; 서열 113)에 상보적인 안티센스 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 경쇄 cDNA는 센스 V_k 프라이머 (표 1) 및 C_k 안티센스 프라이머 (5'ACT GGA TGG TGG GAA GAT G3'; 서열 114)를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 생성물은 퀴아퀵(QIAQUICK) (등록상표) 겔 정제 키트 (QIAGEN)를 사용하여 아가로스 겔로부터 정제하고, 초기 PCR 증폭을 위해 암플리택(AMPLITAQ) (등록상표) DNA 중합효소 및 동일한 프라이머로 퍼킨 엘머 다이 터미네이터 시퀀싱 시스템(Perkin Elmer Dye Terminator Sequencing system)을 사용하여 증폭한 후에 ABI 377 PRISM (등록상표) DNA 서열분석기를 사용하여 양 방향으로 직접 서열분석하였다. 모든 V_H 및 경쇄 영역을 센스 및 안티센스 DNA 가닥 모두에 대해 완전히 서열분석하였다 (도 14 및 도 17).

표 1

항체	Ig 이소형	V _H 채	D _H 채	J _H 채	HC 동일성
1F5	γ2a	1S121*01	L16	J2	
B9E9	γ2a	1S121*01	Q52	J1	
1H4	γ1/γ2a/γ2b	1S121*01	L16	J1	
2H7	γ2b	1S121*01	SP2	J1	
2B8	γ1	1S121*01	L16	J1	
Leu-16 [†]	γ1				
HB20-1(=2=6)	M	1S121*01	L16	2	
HB20-3	G2b	1S121*01	L16	4	
HB20-4	G2b	1S121*01	L16	4	
HB20-5	M	1S121*01	L16	2	
HB20-25	G2a	1S121*01	L16	4	
MB20-1	G1	5S11*02	Q52	4	1=13
MB20-2	G1	1S59*01	Q52	3	
MB20-3	G3				
MB20-6	G2a				
MB20-7	G2b	1S59*01	Q52	3	
MB20-8	G2b	1S59*01	Q52	3	#
MB20-10	G2b	1S59*01	Q52	3	# ₁
MB20-11	G2a	1S59*01		4	
MB20-13	G3	5S11*02	Q52	4	1=13
MB20-14	G1	1S59*01	Q52	3	
MB20-16	G2a	1S59*01	SP2	2	
MB20-18	G2b	1S59*01	Q52	3	

[0225]

항체	V _L 채	D _L 채	J _L 채	LC 동일성	족(HL)
1F5	4-72*01	5*01			AA
B9E9	4-72*01	5*01			AA
1H4	4-72*01	5*01			AA
2H7	4-72*01	5*01			BA
2B8	4-72*01	1*02			AA
Leu-16 [†]		1*02			AA
HB20-1(=2=6)	6-15*01	4*01		VK7	AE
HB20-3	12-41*02	1*01		VK8	CC
HB20-4	12-41*02	1*01		VK8	CC
HB20-5	6-15*01	4*01		VK7	DE
HB20-25	12-46*01	1*01		VK8	CC
MB20-1	8-27*01	4*01		VK7	GG
MB20-2	4-91*01	5*01	2=14	VK5	EB
MB20-3	4-91*01	5*01		VK5	-B
MB20-6					
MB20-7	4-91*01	5*01		VK5	EB
MB20-8	4-91*01	5*01	#	VK5	EB
MB20-10	4-91*01	5*01	#	VK5	EB
MB20-11				VK5	F-
MB20-13	4-91*01	5*01		VK5	GB
MB20-14	4-91*01	5*01	2=14	VK5	EB
MB20-16					F-
MB20-18	6-32*01	5*01		VK7	EF

[0226]

[0227] [†]Leu-16은 L27로도 공지되어 있다.

[0228] # 8 및 10은 아미노산 서열이 동일하고, 중쇄에서 1개의 염기쌍 및 경쇄에서 3개의 염기쌍만 상이하다.

[0229] 항-인간 및 항-마우스 CD20 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 영역에 대한 CDR 서열을 하기 표 2 및 표 3에 각각 열거한다.

표 2

항체	CDR1	CDR2	CDR3
HB20-1,2,6	SYNMH 서열:57	AIYPGNGDTSYNQKFKG 서열:65	WDYYGSSYVGFFDY 서열:75
HB20-03	NYNMH 서열:58	AIYPENGDTSYNQKFKG 서열:66	FYYYGSYYGAMDY 서열:76
HB20-04	NYNMH 서열:58	AIYPENGDTSYNQRFKG 서열:67	FYYYGSYYGALDY 서열:77
HB20-05	SYNMH 서열:57	AIYPGNGDTSYNQKFKG 서열:65	WDYYGSSYVGFLT 서열:78
HB20-25	NYNLH 서열:59	AIYPGNGETSYNQKFKG 서열:68	FYYYGSSYGAMDY 서열:79
MB20-1,13	DYGMA 서열:60	FISNLAYSIIYADTVTG 서열:69	TGYALFDY 서열:80
MB20-02	DYIYK 서열:61	DINPNNGDTIYNQKFKG 서열:70	ERFAY 서열:81
MB20-07	DYYMK 서열:62	DINPNNGDTTYNQKFEG 서열:71	ERFAY 서열:81
MB20-8,10	DYYMK 서열:62	DINPNNGDIYNQKFEG 서열:72	ERFAY 서열:81
MB20-11	DYNMH 서열:63	YIAPYNGGTTYNQKFKG 서열:73	ALDY 서열:82
MB20-14	DYIYK 서열:61	DINPNNGDTIYNQKFKG 서열:70	ERFAY 서열:81
MB20-16	DYNLH 서열:64	YINPNNGGATYNQKFTG 서열:74	IYDGY 서열:83
MB20-18	DYYMK 서열:62	DINPNNGDIYNQKFEG 서열:72	ERFAY 서열:81

[0230]

표 3

항체	CDR1	CDR2	CDR3
HB20-1,2,6	KASQNVGTNVA 서열:84	SASYRNS 서열:94	QQYNSSPFT 서열:101
HB20-03	RASGNIHNYLA 서열:85	NAKTLAD 서열:95	QHFWSPTWT 서열:102
HB20-04	RASGSIHNYLA 서열:86	NAKTLAD 서열:95	QHFWSIPWT 서열:103
HB20-05	KASQNVGTNVA 서열:84	SASYRYS 서열:96	QQYNSSPFT 서열:101
HB20-25	RASENIYSNLA 서열:87	AATNLAD 서열:97	QHFWSIPWT 서열:104
MB20-01	KSSQSVLYSSKRKNYLA 서열:88	WASTRES 서열:98	HQYLSSFT 서열:105
MB20-2,14	SVSSSIRSNYLH 서열:89	RTSNLAS 서열:99	QQGSSIPT 서열:106
MB20-03	SASSSISNYLH 서열:90	RTSNLAS 서열:99	QQGSSIPT 서열:106
MB20-07	SVSSSIRSNYLH 서열:89	RTSNLAS 서열:99	QQGSSLPLT 서열:107
MB20-8,10	SVSSNIRSNYLH 서열:91	RTSNLAS 서열:99	QQGSSIPT 서열:106
MB20-13	SASSSITSNYLH 서열:92	RTSNLAS 서열:99	QQGSSKTLT 서열:108
MB20-18	KASQTVTNDLA 서열:93	YASNRYT 서열:100	QQDYSSPLT 서열:109

[0231]

[0232] 항체 서열 정렬. 항-CD20 모노클로날 항체를 생산하는 공지된 하이브리도마로부터의 중쇄 및 경쇄 서열은 1F5 (문헌 [Shan, et al. (1999) J. Immunol. 162: 6589-6595]), B9E9 (문헌 [Schultz, et al. (2000) Cancer Res. 60: 6663-6669]), 2H7 (미국 특허 제6,120,767호), 2B8 (미국 특허 제5,843,439호), 1H4 (문헌 [Haisma, et al. (1998) Blood 92: 184-190]), Leu-16 (문헌 [Wu, et al. (2001) Protein Eng. 14: 1025-1033])이었다.

[0233] 통계적 분석. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 나타났다. 스튜던트 t-테스트는 집단 평균 간의 유의차를 측정하기 위해 사용하였다.

[0234] 실시예 2

[0235] CD20^{-/-} 마우스의 생성

[0236] 표적 벡터는 CD20의 제2 세포외 루프, 제4 막횡단 도메인, 및 대형 카르복실-말단 세포질 도메인의 엑손 코딩 부분을 네오마이신 내성 유전자와 교체하였다 (도 1A 내지 1D). Cd20 유전자 붕괴에 대한 마우스 동종접합은 표적화된 ES 세포를 사용하여 생산한 시조 마우스의 이형접합성 자손을 교배시킴으로써 기대된 멘델 빈도수에서 얻었다. 동종접합 자손으로부터의 게놈 DNA의 썬던 블롯 및 PCR 분석은 추가로 적절한 Cd20 유전자 표적화 및 엑손 6-8의 게놈 결실을 확인하였다 (도 1E 및 도 1F). 야생형 CD20 mRNA는 CD20^{-/-} 마우스에 부재이고, 이를

CD20^{-/-} 마우스의 비장세포로부터 생산한 cDNA의 PCR 증폭에 의해 확인하였다 (도 1G). 융합된 CD20-Neo^r 유전자 전사물을 CD20^{-/-} 마우스에서 저수준에서 PCR에 의해 탐지하였고, 이는 Neo^r 유전자 프로모터 서열에 의해 코딩된 88 아미노산 펩티드와 융합된 아미노산 157에서 말단절단된 변종 CD20 펩티드로 번역되었다. CD20^{-/-} 마우스에서의 세포-표면 CD20 단백질 발현의 부재는 CD20-GFP cDNA으로 형질감염된 300.19 및 CHO 세포와 반응성이지만, 형질감염되지 않은 세포와는 비반응성인 12개의 마우스 항-마우스 CD20 모노클로날 항체의 패널을 사용하여 확인하였다 (도 1H). 이들 모노클로날 항체는 야생형 마우스로부터의 CD19⁺ 비장세포에 의해 발현된 세포-표면 CD20 에피토프와는 반응성이지만, CD20^{-/-} 마우스로부터의 것과는 반응성이 아니었다 (도 1I). 따라서, 표적화된 Cd20 유전자 돌연변이는 세포-표면 CD20 발현이 폐기되었다.

[0237] 실시예 3

[0238] CD20^{-/-} 마우스에서의 B 세포 발생

[0239] CD20^{-/-} 마우스 뿐만 아니라 그의 야생형 자손을 9년에 걸쳐 관찰하면서 성장시키고, 번식시켰고, 임의의 명백한 해부학상 또는 형태학상 비정상, 또는 생후 1년 동안 감염에 대한 감수성을 나타내지 않았다. CD20^{-/-} 마우스는 IgM⁻ B220^{lo} 프로/프리-B세포, IgM⁺ B220^{lo} 미성숙 B 세포 및 IgM⁺ B220^{hi} 성숙 B 세포의 정상 빈도수 (도 1J, 표 4) 및 AA4.1⁺ 또는 그의 골수에서 열 안정성 항원 (HSA)^{hi} B220^{lo} 미성숙/과도기 B 세포의 정상수를 가졌다. 혈액, 비장 및 림프절 IgM⁺ B220⁺ B 세포의 수는 CD20^{-/-} 마우스와 그의 야생형 자손 간에 유의하게 상이하지 않았다 (하기 표 4).

표 4

조직	표현형	B 림프구 (%)		B 세포수 (x10 ⁶) ^b		CD20 ⁺ 마우스에서의 IgM수준
		야생형	CD20 ⁺	야생형	CD20 ⁺	야생형 (%)
골수	IgM ⁺ B220 ^{lo}	14 ± 2	11 ± 1			62 ± 3**
	IgM ⁺ B220 ^{hi}	13 ± 1	17 ± 2			93 ± 7
	IgM ⁺ B220 ⁺	63 ± 1	67 ± 2	3.0 ± 0.3	3.7 ± 0.4	69 ± 11*
비장	IgM ⁺ B220 ⁺	46 ± 4	50 ± 4	50 ± 8	66 ± 6	78 ± 6**
	IgM ^{hi} B220 ^{lo}	4 ± 2	1 ± 1*	2.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3*	
	CD21 ^{lo} HSA ^{hi}	17 ± 1	22 ± 2*	7.4 ± 0.8	11.2 ± 1.4	
	CD21 ^{hi} HSA ^{int}	14 ± 2	9 ± 1*	6.1 ± 1.2	4.5 ± 0.4	
	CD1d ^{hi} CD21 ⁺	5 ± 1	4 ± 1	2.6 ± 0.6	1.8 ± 0.3	
림프절 ^d	IgM ⁺ B220 ⁺	21 ± 4	20 ± 1	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.3	88 ± 10
복막	IgM ⁺ B220 ⁺	73 ± 3	63 ± 5	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.2	84 ± 6
	CD5 ⁺ B220 ^{lo}	45 ± 3	16 ± 5**	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.1**	
	CD11b ⁺ CD5 ⁺ B220 ^{lo}	12 ± 1	12 ± 1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	
	CD5 ⁺ B220 ^{hi}	28 ± 1	55 ± 3**	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2*	

[0240]

[0241] ^a 값은 3 내지 10마리의 야생형 및 CD20^{-/-} 2월령 자손으로부터 지시된 세포 표면 마커를 발현하는 림프구의 평균(± SEM) 수 또는 백분율 (측면광 및 직사광 산란성에 기초함)을 나타낸다.

[0242] ^b B 세포수는 각 조직으로부터 수거한 세포의 총수에 기초하여 계산하였다.

[0243] ^c 값은 세포수/mL를 나타낸다.

- [0244] ^d 서혜부 림프절 쌍에 대한 값.
- [0245] * 샘플 평균은 야생형 자손으로부터 유의하게 상이하였다. $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.
- [0246] B 세포 IgM 발현은 야생형자손의 미성숙 및 성숙 B 세포에 상대적으로 $CD20^{-/-}$ 마우스에서 유의하게 더 낮았다 (표 4, 도 1J). 또한, $CD20^{-/-}$ 자손의 비장에서의 $IgM^{hi} B220^{lo}$ B 세포의 수에 약 50% 감소가 있었다. $IgM^{hi} B220^{lo}$ B 세포의 감소된 수는 대부분의 B 세포에 의한 감소된 IgM 발현을 반영할 수 있지만, $CD1d^{hi} CD21^{+}$ 표현형을 갖는 세포수가 $CD20^{-/-}$ 와 야생형 자손 간에 유의하게 상이하지 않기 때문에 비장 변연대 B 세포에서의 손실에 기인하지는 않았다 (표 4). 마찬가지로, 골수로부터의 최근 이주된 세포를 나타내는 과도기 T1 ($CD21^{lo} HSA^{hi}$) 및 T2 ($CD21^{hi} HSA^{int}$) B 세포의 수는 감소되지 않았다 (표 4). 반대로, T1 세포의 빈도 및 수는 일반적으로 $CD20^{-/-}$ 마우스에서 더 크고, $CD20^{-/-}$ 마우스의 골수에서 관찰된 성숙 $IgM^{+} B220^{hi}$ B 세포의 빈도수에서의 증가에 비해 더 작다. $IgM^{hi} B220^{lo}$ B 세포의 감소된 수는 $CD20^{-/-}$ 마우스의 복강 내에 $CD5^{+} B220^{lo}$ B1a 세포의 수가 64% 감소되었기 때문에 비장 B1 세포에서의 감소에 부분적으로 기인할 수 있다. $CD20^{-/-}$ 및 야생형 자손의 복강에서의 $IgM^{+} B220^{+}$ B 세포의 총수는 $CD5^{+} B220^{hi}$ B 세포의 수의 증가 때문에 유사하였다 (표 4, 도 1J). B1b B 세포 ($CD11b^{+} CD5^{-} B220^{lo}$)의 수는 $CD20^{-/-}$ 및 야생형 자손에서 유사하였다 (표 4). 골수, 혈액, 림프절 또는 비장으로부터 단리된 $CD20^{-/-}$ B 세포는 야생형 자손로부터의 B 세포와 비교하여 크기 (광 산란성)에서 명백한 차이가 없었다. 비장 조직 구획의 면역조직화학 분석은 $B220^{+}$ B 세포의 다른 정상 구조 및 조직화를 나타냈다. 따라서, 감소된 IgM 발현, 비장 중의 $IgM^{hi} B220^{lo}$ B 세포 서브셋에서의 감소, 및 복강 내의 B1 세포의 작은 수를 제외하고는, $CD20$ 발현은 B 세포 발생 및 조직 위치화에 필수적인 요구는 아니었다.
- [0247] 실시예 4
- [0248] $CD20^{-/-}$ B 세포 기능
- [0249] 표면 IgM 라이게이션에 대한 정제된 $CD20^{-/-}$ B 세포의 증식 반응은 항체 농도의 범위 (1 내지 40 $\mu g/mL$)에 걸쳐 야생형 B 세포에 필적하였다 (도 1K). 증식은 B 세포가 농도의 범위 (0.1 내지 10 pg/mL)에 걸쳐 LPS에 의해 또는 IL-4 (10 내지 100 U/mL) 및 차선 (5 $\mu g/mL$) 농도에서의 항-IgM 항체를 사용하여 활성화된 경우에 또한 정상이었다 (도 1K). 따라서, $CD20$ 손실은 마이토젠-유발된 증식에 대한 영향을 탐지할 수 없었다. 모든 Ig 이소형의 정상 수준은 $CD20^{-/-}$ 마우스로부터의 혈청에서 발견되었다 (도 1L). $CD20^{-/-}$ 마우스는 T 세포-의존 항원, DNP-KLH로 면역화한 후에 야생형 자손에서 관찰된 것과 유사한 모든 이소형의 1차 및 2차 항체 반응을 또한 생성하였다 (도 1M). 또한, $CD20^{-/-}$ 마우스 및 그의 야생형 자손은 NP-CGG로 면역화한 후에 동등한 1차 및 2차 IgM 및 IgG1 항-NP 항체 반응을 생성하였다 (각 군에 대해 5마리의 마우스). 더욱이, $CD20^{-/-}$ 마우스에서 생성된 1차 및 2차 IgG1 항-NP 항체 반응의 친화성은 그의 야생형 자손에서 생성된 것과 유사하였다. 따라서, $CD20$ 기능은 체액성 면역 반응의 생성 동안의 T-B 세포 상호작용, 이소형 스위칭 또는 친화성 성숙을 요구하지 않았다.
- [0250] 실시예 5
- [0251] B 세포 발생 동안의 $CD20$ 발현
- [0252] 마우스 항-마우스 $CD20$ 모노클로날 항체의 패널을 사용하여, 2개의 마우스 프리-B 세포주 (300.19 및 38B9) 및 2개의 T 세포주 (BW5147 및 BL4)는 $CD20$ 세포 표면 단백질을 발현하지 않은 반면에, 70Z 프리-B 세포주, A20 및 AJ9 성숙 B 세포주 및 NS-1 형질세포종 계통은 $CD20^{+}$ 이었다 (도 1H 및 도 2A). 유사하게는, $CD20$ 은 골수에서 $B220^{+}$ 세포의 서브셋에 의해서만 발현되고 (도 2B); $B220^{lo}$ 림프구의 30 $\pm$ 3%는 $CD20^{+}$ 인 반면에, 모든 $B220^{hi}$ B 세포는 $CD20^{+}$ 이었다 (n=6 마우스). 골수에서의 $CD19^{+}$ B 세포의 유사한 분획은 $CD20^{+}$ 이었다 (51 $\pm$ 2%, n=6). 이와 일관되게, $CD43^{+} B220^{+}$ 프로-B 세포는 $CD20$ 을 발현하지 않은 반면에, 10 $\pm$ 1% (n=3)의 $CD43^{-} IgM^{-} B220^{lo}$ 프

리-B 세포는 저밀도에서 CD20을 발현하였다 (도 2G). 모든 CD20⁺ 프리-B 세포(CD43⁻ IgM⁻ B220^{lo})는 그의 광 산란성에 기초하여 적었으며, 이는 CD20 발현이 중쇄 발현 시에 또는 그 주변에서 우선적으로 개시되었다는 것을 나타냈다. 이와 일관되게, 미성숙 IgM⁺ B220^{lo} B 세포의 대부분은 CD20 (76±9%, n=3; 분획 I, 도 2G)을 발현하였다. 골수에서의 미성숙 IgM^{hi} B220⁺ (분획 11, 도 2G) 또는 CD19^{lo} B 세포의 하위집단은 성숙 B220^{hi} (분획 III, 도 2G) 또는 CD19^{hi} B 세포 (도 2B)보다 높은 밀도 277±53% (n=3)에서 발현하였다. 따라서, CD20은 B 세포 변이를 미성숙시킨 소 프리-B 세포 동안 먼저 발현되며, CD20 발현은 성숙과 함께 증가되고, 이어서 재순환 B 세포의 성숙 B220^{hi} 풀로의 진입과 함께 감소된다.

[0253] 비장, 혈액, 말초 림프절 및 복강에서, 거의 대부분의 IgM⁺ 또는 B220⁺ B 세포는 CD20을 발현하였다 (도 2C 내지 2F). CD20^{hi} B220^{lo} 세포의 소 하위집단이 혈액 (91%, n=3) 및 비장 (7±2%, n=3) B 세포에서 관찰되었다 (도 2C 및 도 2E). 비장에서의 CD20^{hi} B220^{lo} B 세포는 주로 과도기 T1 및 T2 B 세포이고 (도 2H), 골수로부터의 최근 이주 세포를 나타내는 것으로 보인다. T1 세포 (CD21^{lo} HSA^{hi})는 성숙 B 세포보다 높은 밀도 139±23% (n=3)에서 CD20을 발현하는 반면에, T2 세포(CD21^{hi} HSA^{hi})는 더 높은 밀도 58±11% (n=3)에서 CD20을 발현하였다. T1 세포(CD21⁻ CD23⁻ IgM^{hi}) 및 변연대 B 세포(CD21⁺ CD23⁻ IgM^{hi}) (문헌 [Loder, et al. (1999) J. Exp. Med. 190: 75])는 또한 대부분의 비장 B 세포보다 높은 수준에서 CD20을 발현하였다 (도 21). CD20⁻ 말초 B 세포의 작은 수는 일부 마우스에서 관찰되지만, 이 수는 전형적으로 2% 미만의 B220⁺ 세포이었다. 복강에서, CD20은 CD5⁺ 및 CD5⁻ B 세포 모두에 의해 유사하게 발현되었다 (도 2F). CD20은 임의의 조사된 조직 중의 백혈구의 다른 하위집단에 의해 탐지가능한 수준에서 발현되지 않았다. 따라서, 마우스 CD20은 소 프리-B 세포 성숙 동안 후기 개시된 발현을 갖는 B 세포에 의해 독점적으로 발현되었다.

[0254] 실시예 6

[0255] CD20의 구조적 특성

[0256] 마우스 CD20에 대해 반응성을 갖는 MB20-1 모노클로날 항체 및 인간 CD20의 세포질 에피토프에 대해 반응성을 갖는 PB4 모노클로날 항체를 사용하여 표면-표지된 B 세포주로부터 마우스 및 인간 CD20 분자를 침전시켜 이들을 비교하였다. 마우스 CD20은 비-환원 조건 하에서 인간 CD20보다 빠르게 이동하지만, 또한 Mr이 33,000 및 35,000인 적어도 2개의 구별된 분자 종으로서 이동하였다 (도 3A). 환원 조건 하에서, 마우스 CD20은 Mr이 40,000 및 42,000인 적어도 2개의 동등하게 나타나는 분자 종으로서 이동하였다 (도 3A). 인간 CD20을 사용한 경우에 발생하는 것과 같이 (문헌 [Tedder, et al. (1988) Molec. Immunol. 25:1321], [Deans, et al. (1993) J. Immunol. 151:4494]), 다수의 세포-표면 분자가 마우스 CD20과 함께 공침전되었다. PB4 모노클로날 항체는 CD20 세포의 도메인과 반응하는 모노클로날 항체보다 인간 CD20과 결합된 분자를 더 잘 공침전시켰다. MB20-1 모노클로날 항체가 웨스턴 블롯 분석에서 마우스 CD20과만 반응하였고 CD20 또는 기타 단백질이 CD20^{-/-} B 세포의 용해물로부터 침전되지 않았기 때문에, 마우스에서 CD20-결합 분자의 공침전은 모노클로날 항체의 교차반응성 때문이 아니었다 (도 3B). 예상외로, 마우스 CD20은 인간 B 세포 (문헌 [Tedder and Schlossman (1988) J. Biol. Chem. 263:10009], [Genot, et al. (1993) J. Immunol. 151:71])에서와 같이 포르볼 미리스틸 아세테이트 (PMA) 처리 후에도 휴지기의 1차 마우스 B 세포, 항-IgM 항체- 또는 LPS-활성화된 B 세포, 또는 B 세포주에서 우세한 인단백질이 아니었다 (도 3C). 더욱이, LPS-아세포 또는 B 세포주에서 CD20의 PMA-유도된 인산화는, 인간 CD20에서 특성화된 바와 같이 (문헌 [Tedder and Schlossman (1988) J. Biol. Chem. 263:10009], [Valentine, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8085]) 더 빠르게 이동하는 종으로부터 더 느리게 이동하는 종으로 CD20 단백질 Mr의 유의한 이동을 유발하지 않았다. 따라서, 마우스 및 인간 CD20은 몇몇 구별되는 특성과 함께 많은 구조적 특징을 공유한다.

[0257] 실시예 7

[0258] CD20^{-/-} B 세포에서의 [Ca²⁺]_i 반응 감소

[0259] CD20^{-/-} 마우스에서의 정상적인 B 세포 발생에도 불구하고, CD20^{-/-} 마우스로부터의 비장 B220⁺ B 세포는 최적 농

도 (40 $\mu\text{g/mL}$; 도 4A) 및 최적 이하 농도 (5 $\mu\text{g/mL}$)의 항-IgM 항체로의 IgM 라이게이션 후에 야생형 B 세포에 비해 감소된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응을 발생시켰다. 즉각적인 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응의 동력학은 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서 변경되지 않았다. 그러나, 최대 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가의 크기는 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서 $34 \pm 4\%$ 더 낮았으며 ($p < 0.001$, $n=9$), 나중 시점에서 관찰된 지속적 증가의 양도 유사하게 감소하였다. 세포의 Ca^{2+} 의 EGTA로의 킬레이트화 결과 동력학이 감소하였으며, $\text{CD20}^{-/-}$ 및 야생형 B 세포에서의 IgM 가교 후에 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 크기 증가가 관찰되었다. EGTA 존재 하에서 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응의 최대 크기는 야생형 B 세포에 비해 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서 $38 \pm 7\%$ 더 낮았다 ($p < 0.002$, $n=7$).

[0260] CD19 -유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응은 야생형 B 세포에 비해 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에 있어 유의하게 더 낮았다 ($70 \pm 4\%$, $p < 0.001$, $n=5$)(도 4B). 더 낮은 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응은 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에 의한 CD19 발현의 감소로부터 기인하지 않았다 (도 4D). 세포의 Ca^{2+} 의 EGTA로의 킬레이트화 결과, 야생형 및 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포 둘 다에서 CD19 -유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응이 대부분 제거되었다. $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에 의한 IgM- 또는 CD19 -라이게이션 후의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응 감소는 내부 Ca^{2+} 저장량 또는 세포의 Ca^{2+} 농도의 차이에서 기인하지 않았을 가능성이 높았는데, 이는 탐시가르긴- 및 이오노마이신-유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응이 야생형 B 세포에서보다 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서 평균적으로 약간 더 높았기 때문이었다 (도 4C). $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응 감소는 또한 유전적 배경의 차이에서 기인하지 않았을 가능성이 높았다. $\text{CD20}^{-/-}$ 마우스 및 그의 야생형 자손은 129가지 계통의 ES 세포로부터 생성되었으나, 적어도 7세대에 대해서는 C57BL/6 마우스와 역교배하였다. 대조군 실험에서, IgM-유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응 및 CD19 -유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응은 C57BL/6, (C57BL/6 x 129) $_{F1}$ 및 129 B 세포 ($n=4$)에 대해 동일하지 않다면 유사하였다. 따라서, $\text{CD20}^{-/-}$ 마우스에서의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응 감소는 배경 차이로부터가 아니라 CD20 기능의 부재로부터 기인했을 가능성이 높았다. CD19 가교 후에 관찰된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응은 주로 막횡단 Ca^{2+} 유동에 의존적이었고 CD19 -유도된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 반응은 $\text{CD20}^{-/-}$ 마우스에서 현저하게 교란되었기 때문에, CD20 기능은 막횡단 Ca^{2+} 수송에 특히 중요할 수 있다.

[0261] 실시예 8

[0262] $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서의 신호 도입

[0263] B 세포 막횡단 신호 도입에서 CD20 손실의 효과를, IgM 라이게이션 이후 정제된 B 세포에서의 전체 세포 단백질 티로신 인산화를 측정함으로써 평가하였다. 개별 실험에서 개별 마우스마다 다소간의 편차가 B 세포들 사이에서 관찰되기는 했지만, 전반적인 티로신 인산화 수준은 $\text{CD20}^{-/-}$ 및 야생형 자손으로부터의 휴지기 비장 B 세포에서 유사하였다 (도 5A). IgM 라이게이션 후의 단백질 티로신 인산화도 또한 $\text{CD20}^{-/-}$ 및 야생형 자손으로부터의 B 세포에서 유사하였다. Lyn 및 기타 Src 키나제, PLC γ , CD19 , BTK, 및 MAP 키나제를 비롯하여 IgM 하류에 있는 개별 신호전달 분자의 인산화도 또한 $\text{CD20}^{-/-}$ 및 야생형 자손으로부터의 B 세포에서 유사하였다 (도 5B). 따라서, CD20 -결핍은 기저 막횡단 신호전달 또는 IgM-유도된 막횡단 신호전달을 유의하게 변경시키지 않을 가능성이 높았다.

[0264] 실시예 9

[0265] 생체내에서 B 세포의 항- CD20 모노클로날 항체 고갈

[0266] 각 IgG 이소형의 대표격인 12가지 마우스 항-마우스 CD20 모노클로날 항체에 대해, 이들이 생체내에서 B 세포에 결합하여 이를 고갈시키는 능력을 측정하였다. 각 모노클로날 항체를 시험관내에서 CD19^+ 1차 B 세포와 균일하게 반응시켰으며, 그 결과 모노클로날 항체 이소형과 무관한 특징적인 평균 형광 강도가 나타났다 (도 6A). 1차 B 세포와 모노클로날 항체의 반응성을 소정 범위의 모노클로날 항체 농도에 대해 측정했을 때, 1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 사이의 농도로 사용하는 경우에 대부분의 모노클로날 항체가 포화 염색 수준에 도달하였다 (도 6B). 평균

적으로, 50%-최대 로그 모노클로날 항체 염색은 약 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 모노클로날 항체 농도에서 달성되었다 (화살표, 도 6B). 모든 모노클로날 항체를 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용했을 때, 각 모노클로날 항체는 CD19^+ 1차 B 세포와 균일하게 반응하였으며, 그 결과 특징적인 낮은 평균 형광 강도 내지 높은 형광 강도를 나타냈다 (도 6C, 표 5). 마우스 CD20 cDNA-형질감염된 프리-B 세포주를 항-마우스 Ig 2차 항체와 사용하여 유사한 결과를 얻었다. 이러한 분석에 기초하여, MB20-1 모노클로날 항체는 가장 낮은 상대 친화도/결합도의 모노클로날 항체를 나타내는 한편, MB20-18 모노클로날 항체는 모든 12가지 항- CD20 모노클로날 항체의 가장 높은 수준에서 B 세포와 강하게 반응하여 B 세포를 염색시켰다 (표 5). 따라서, 각 모노클로날 항체는 B 세포와 특이적으로 반응하여, 유동 세포계측기로 측정시 분별있는 결합 특성을 나타내었다.

표 5

이소형	Ab	B 세포 반응성 ^a	% 생체내 고갈 ^b	
			혈액	비장
IgG1	MB20-1	69	95±3	93±3
	MB20-2	209	88±1	67±8
	MB20-14	166	94±4	77±8
IgG2a	MB20-6	96	99±1	93±5
	MB20-11	158	98±1	92±2
	MB20-16	170	99±1	95±0
IgG2b	MB20-7	525	82±9	36±36
	MB20-8	240	94±1	3±18
	MB20-10	317	91±1	3±9
	MB20-18	729	96±1	74±3
IgG3	MB20-3	47	1±1	1±3
	MB20-13	603	18±1	3±1

^a 값은 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 각 MB20 모노클로날 항체를 사용한 비장 CD19^+ B 세포의 면역형광 염색에 대한 평균 선형 형광 강도를 나타낸다 (도 6C). 비장세포 염색은 이소형-특이적 2차 항체를 사용하여 가시화하였다. 대조군 염색은 모든 경우에 6 이하였다.

^b 값(±표준편차)은 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체와 비교한, 모노클로날 항체 처리 ($n \geq 3$) 7일 후에 혈액 또는 비장에서부터 결핍된 B 세포의 %를 나타낸다.

[0267]

[0268]

각 항-마우스 CD20 모노클로날 항체를 마우스 1마리 당 250 μg 으로 투여하였으며, 이 경우 단일 투여량은 인간에서 항- CD20 요법의 경우에 1차적으로 4회 투여된 375 mg/m^2 의 투여량보다 약 10배 더 낮은 투여량 (표 7)과 동등하다 (문헌 [Press, et al. (2001) Hematology:221-240], [Kaminski, et al. (1993) N. Engl. J. Med. 329:459-465], [Weiner (1999) Semin. Oncol. 26:43-51], [Onrust, et al. (1999) Drugs 58:79-88], [McLaughlin, et al. (1998) Oncology 12:1763-1769]). 이러한 조건 하에서, 다수의 모노클로날 항체가 말초 B 세포수에 대해 효능 있고 장기간 지속되는 효과를 나타낸 반면, 다른 모노클로날 항체들은 불균일한 생체내 효과를 나타냈다 (도 7). 2일째까지 순환체로부터, 그리고 7일째까지 비장에서부터 모노클로날 항체-유도된 B 세포 고갈의 효과성은 모노클로날 항체의 이소형과 밀접한 관계가 있었으며 (표 5, 도 7A 및 도 7B), 그 효과성은 $\text{IgG2a} > \text{IgG1} > \text{IgG2b} > \text{IgG3}$ 의 순서였다. MB20-11 및 다른 IgG2a 모노클로날 항체 (MB20-6 및 -16)는 95%가 넘는 혈액 B 세포와 약 93%의 비장 B 세포를 고갈시켰다. 남아있는 극소량의 말초 B 세포는 주로 골수로부터 발생한, 표현형상으로 미성숙한 세포로 나타났다. MB20-11 모노클로날 항체는 0.5 $\mu\text{g}/\text{마우스}$ 의 낮은 단일 투여량으로 투여된 경우에도 상당수의 순환 B 세포 고갈시킨 반면, 7일째까지 비장 B 세포를 상당량 고갈시키기 위해서는 2.5 $\mu\text{g}/\text{마우스}$ 로 5배 더 많은 mAb의 투여량이 필요하였다 (도 7C). 동등하게 현저한 발견은 MB20-11 모노클로날 항체의 단일 주사로도 모노클로날 항체 처리 1시간 내에 순환 B 세포를 고갈시켰다는 것이며, 이 경우 B 세포가 순환계 및 비장에 다시 존재하기 전에 약 57일 동안의 지속 효과가 나타났다 (도 7D). 이와 반대로, 어떠한 모노클로날 항체도 $\text{CD20}^{-/-}$ 마우스에 투여시 유의한 효과를 나타내지 않았으며, 동일한 조건 하에서

투여된 이소형-대조군 모노클로날 항체는 B 세포수에 영향을 미치지 않았다 (도 7). 이와 유사하게, 순환 및 조직 Thy1.2⁺ T 세포수는, B 세포-제한 CD20 발현과 일치하게 항-CD20 모노클로날 항체-처리된 마우스에서 변하지 않았다 (도 7A).

[0269] 실시예 10

[0270] B 세포 고갈에서의 Fc γ R에 대한 역할

[0271] 항-CD20 모노클로날 항체 처리에 의한 B 세포 고갈에서의 선천적인 면역계의 역할은 Fc γ R-결핍 마우스 (문헌 [Takai, et al. (1994) Cell 76:519-529])를 이용하여 측정하였다. 마우스 이펙터 세포는 IgG에 대해 고-친화도 Fc γ RI (CD64), 및 저-친화도 Fc γ RII (CD32) 및 Fc γ RIII (CD16) 분자라는 3가지 상이한 Fc γ R 부류를 발현한다 (문헌 [Ravetch and Clynes (1998) Ann. Rev. Immunol. 16:421-432]). Fc γ RI 및 Fc γ RIII은 헤테로-올리고머성 복합체로, 각 리간드 결합 γ 쇄는 공통의 γ 쇄 (FcR γ)와 결합한다. FcR γ 쇄의 발현은 Fc γ R의 조립에 필요하며, 또한 대식세포에 의한 식세포작용 및 NK 세포에 의한 세포독성을 비롯한 이펙터 기능의 Fc γ R 촉발에 필요하다 (문헌 [Takai, et al. (1994) Cell 76:519-529]). 고-친화도 Fc γ RI은 우선적으로 IgG2a > IgG2b > IgG3/IgG1의 순서로 결합하는 반면, 2가지 저-친화도 수용체는 상이한 이소형의 폴리머성 IgG와 결합한다 (문헌 [Fossati-Jimack, et al. (2000) J. Exp. Med. 191:1293-1302]). Fc γ RIII은 IgG2a > IgG1 > IgG2b >> IgG3의 순서로 결합한다 (문헌 [Fossati-Jimack, et al. (2000) J. Exp. Med. 191:1293-1302]).

[0272] 야생형 마우스에서 나타나는 거의 완전한 B 세포 고갈 (도 7)과 대조적으로, MB20-11 모노클로날 항체 처리 결과, 순환 B 세포수가 FcR γ ^{-/-} 마우스에서 4일에 걸쳐 단지 20 내지 35%만 감소하였으며 (도 8A), 7 내지 18일째에는 효과가 전혀 없었다. 더욱이, MB20-11 모노클로날 항체 처리는 실제로 대조군 모노클로날 항체-처리된 자손에 비해 FcR γ ^{-/-} 마우스에서 비장 B 세포수를 증가시켰는데 (도 8B 및 도 8C), 이는 주로 미성숙 B 세포수의 증가 때문이었다. 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체는 FcR γ ^{-/-} 마우스에서 전혀 유의한 효과를 나타내지 않았다. FcR γ ^{-/-} 마우스에서, MB20-11 모노클로날 항체는 1시간째에 B 세포수의 초기 감소를 유도하였으나, 2일째에 순환 B 세포의 불완전한 고갈을 유도하였다. MB20-11 모노클로날 항체 처리는 대조군 모노클로날 항체-처리된 자손에 비해 FcR γ I^{-/-} 마우스에서 부분적으로만 B 세포를 고갈시켰으며 (21%의 비장 B 세포), 이는 7 일째까지 지속되었다. 이와 반대로, MB20-11 모노클로날 항체는 7일째까지 야생형, Fc γ RII^{-/-} 및 Fc γ RIII^{-/-} 마우스에서 순환 및 조직 B 세포를 95% 이상 고갈시켰다. 본원에서 관찰된 것과 동일한 결과가 2가지 독립적인 Fc γ RIII^{-/-} 마우스 계통을 사용해서 얻어졌다 (문헌 [Bruhns, et al. (2003) Immunity 18:573-581], [Hazenbos, et al. (1996) Immunity 5:181-188]). IgG1 MB20-1 및 IgG2b MB20-18 모노클로날 항체에 의한 B 세포 고갈은 FcR γ 쇄-결핍에 의해 유사하게 영향을 받았다. 순환 B 세포는 FcR γ ^{-/-} 마우스의 MB20-1 모노클로날 항체 처리에 의해 유의하게 감소하지 않았으며, 순환 B 세포는 야생형 마우스에서 고갈되었다 (도 8D). 이와 유사하게, 비장 B 세포는 FcR γ ^{-/-} 마우스의 MB20-1 모노클로날 항체 처리에 의해 유의하게 감소하지 않았으며, 비장 B 세포수는 야생형 마우스에서 93% 감소하였다. 순환 B 세포는 FcR γ ^{-/-} 마우스의 MB20-18 모노클로날 항체 처리에 의해 유의하게 감소하였으나, 야생형 마우스에서 발생한 것과 동일한 정도는 아니었다 (도 8E). 그러나, 비장 B 세포는 FcR γ ^{-/-} 마우스의 MB20-18 모노클로날 항체 처리에 의해 유의하게 감소하지 않았으며, 비장 B 세포수는 야생형 마우스에서 74% 감소하였다. 따라서, 항-CD20 모노클로날 항체 요법은 주로 FcR γ 쇄 발현을 필요로 하는 경로를 통해 B 세포를 고갈시켰다.

[0273] 실시예 11

[0274] B 세포 고갈에서 C의 역할

[0275] C 활성화는 항-CD20 모노클로날 항체 요법 동안 B 세포 고갈에 대한 주요 메커니즘인 것으로 간주되기 때문에, 항-CD20 모노클로날 항체 처리에 의한 B 세포 고갈에서 C의 역할을 C-결핍 (문헌 [Wessels, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11490-11494]) 및 C1q-결핍 (문헌 [Zhang, et al. (1999) Immunity 10:323-332]) 마우스를 사용하여 측정하였다. 각 항-CD20 모노클로날 항체의 C-활성화 능력은 우선 시험관내에서 측정하였다. C의 존재 하에, 대부분의 항-CD20 모노클로날 항체는, 항체들 사이에서 세포독성 용량이 변하기는 했

지만, 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체에 대한 프로피듐 요오다이드 흡수에 의해 나타난 바와 같이 유의한 B 세포 용해를 유도하였다 (도 9A). C가 존재하지 않는 경우, 어떠한 항-CD20 모노클로날 항체도 이와 같은 시험관내 분석 과정에서 B 세포 PI-흡수 또는 아팝토시스를 유도하지 않았다. MB20-11 모노클로날 항체도 시험관내에서 유의한 C-매개된 B 세포 용해를 유도함에 있어 효과적이기는 했지만, MB20-18 모노클로날 항체가 가장 효능있는 C-의존성 B 세포 용해를 개시하였다. 그러나, 각 모노클로날 항체의 시험관내 C-의존성 B 세포 사멸 능력은 각 모노클로날 항체가 생체내에서의 B 세포 고갈 능력과 상관관계가 없었다 (도 7B). 더욱이, MB20-11 모노클로날 항체는 $C3^{-/-}$ 및 $C4^{-/-}$ 마우스에서 모든 혈액과 90% 초과 비장 B 세포를 효과적으로 제거하였다 (도 9B). MB20-1 및 MB20-18 모노클로날 항체가 $C3^{-/-}$ 및 야생형 마우스 둘 다에서 유사한 정도로 혈액 및 비장 B 세포를 효과적으로 고갈시켰기 때문에, 상기 관찰 결과는 모노클로날 항체 이소형에 대해 특이적이지 않았다 (도 9C 및 도 9D). 따라서, 항-CD20 모노클로날 항체 요법은 주로 $Fc\gamma R$ -의존성 및 $C3^{-/-}$, $C4^{-/-}$ 및 $C1q$ -독립성 메커니즘을 통해 B 세포를 고갈시킨다.

[0276] 실시예 12

[0277] 단핵구는 생체내에서 B 세포 고갈을 매개한다.

[0278] 항-CD20 모노클로날 항체 처리의 고갈 능력이 모노클로날 항체의 이소형 및 $Fc\gamma R$ 발현과 직접적인 상관관계가 있었기 때문에, NK 세포, T 세포 및 대식세포의 $Fc\gamma R$ -매개된 B 세포 고갈에 대한 기여도를 측정하였다. 리포솜-캡슐화 클로드로네이트로의 처리에 의해 대식세포-결핍된 마우스는 MB20-11 모노클로날 항체 처리 후 1시간까지 순환 B 세포를 유의하게 고갈시키지 않았으며, 최대 7일까지 정상적인 순환 B 세포수를 나타냈다 (도 10A). 이와 유사하게, 클로드로네이트-처리된 마우스에서의 비장 B 세포수는 대조군 모노클로날 항체-처리된 자손에 비해 7일째에 39%만 감소하였다 (도 10B). CSF-1 결핍 ($CSF-1^{op}$)으로 인해 대식세포 아집단에서 조직-특이적 손실이 있는 마우스 (문헌 [Cecchini, et al. (1994) Development 120:1357-1372])도 또한 MB20-11 모노클로날 항체 처리 후에 순환 B 세포를 제거하는 속도가 느렸으며, 7일째까지 표현형상으로 성숙한 비장 B 세포의 84%만 고갈시켰다 (도 10). 이와 대조적으로, 기능성 T 세포가 결여된 무흉선 누드 및 $LAT^{-/-}$ 마우스 (문헌 [Zhang, et al. (1999) Immunity 10:323-332])는 96% 초과 혈액 및 비장 B 세포를 고갈시켰다. 이와 유사하게, 항-CD20 모노클로날 항체 처리 결과, NK 세포 기능이 결핍된 (문헌 [Kagi, et al. (1994) Nature 369:31-37]) 베이지 및 퍼포린 $^{-/-}$ 마우스에서 약 95%의 순환 및 비장 B 세포가 제거되었다 (도 10). 이러한 발견은, CSF-1-의존성 및 -독립성 대식세포 서브세트 둘 다가 생체내에서 $CD20^{+}$ B 세포를 고갈시킴에 있어 주요 이펙터 세포이며, 본질적으로는 T 세포-, NK 세포- 및 퍼포린-의존성 메커니즘을 배제한다는 것을 나타낸다.

[0279] 실시예 13

[0280] 모노클로날 항체 서열 분석

[0281] CD20은 상대적으로 작은 분자 부분만이 세포 표면에서 발현 (대략 42개의 아미노산으로 추정됨)된다는 점에서 대부분의 B 림프구 세포 표면 분자 사이에서 특유한 것이다. 따라서, 공간적인 속박으로 인해 대부분의 항-CD20 모노클로날 항체는 다른 항-CD20 모노클로날 항체의 결합을 우선적으로 차단한다. 이러한 현상은 대부분의 항-CD20 모노클로날 항체가 동일하지 않다면 유사한 CD20 단백질 영역 또는 에피토프에 결합한다는 인상을 남기기는 하였지만, 이는 입증되지 않았다. 더욱이, 단백질 항원과 이 항원 상의 특이적 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체 사이의 상호작용은 복잡하고, 각 모노클로날 항체 및 그의 특이적 아미노산 서열에 대해 거의 특유한 것이다. 이러한 항원 및 항체 상호작용의 복잡성 수준으로 인해, 대부분의 외래 항원에 대해 다양한 항체 레파토리가 생성된다. 그러나, 항-CD20 항체의 다양성은 마우스도 또한 자가 항원으로서 CD20을 발현한다는 사실에 의해 제한된다. 따라서, 정상적인 환경 하에서, 마우스는 인간 CD20에 존재하는 항원성 결정자에 반응하며 또는 마우스 CD20에 의해 공유되는 항체를 생성하지 않을 것이며, 이는 이러한 모노클로날 항체가 자기반응성을 나타낼 것이기 때문이다. 따라서, 정상적인 마우스에서 생성된 항-CD20 모노클로날 항체는 인간 CD20에 존재하며 인간 CD20에 특유한, 제한된 수의 규정된 에피토프에 결합하는 것이 가능하다.

[0282] 대부분의 단백질 항원에 대해 생성될 수 있는 다양한 항체 레파토리와 대조적으로, 교배된 마우스 계통은 종종 현저하게 균일한 항체를 생성함으로써 합텐 또는 구조적으로 간단한 항원에 반응한다 (문헌 [Blier and Bothwell (1988) Immunol. Rev. 105:27-43]). 제한된 체액성 반응의 가장 좋은 예 중 하나는 (4-히드록시-3-니트로페닐)아세틸 (NP) 합텐에 대한 C57BL/6(Igh^b) 마우스의 반응이다 (문헌 [Imanishi and Maekelae (1975)

J. Exp. Med. 141:840-854]). 단백질 담체에 커플링된 NP로 면역화된 C57BL/6 마우스는 비공통적인 $\lambda 1$ 경쇄를 포함하는 혈청 항체를 생성하는 반면, 담체 단백질 단독으로 면역화시키면 거의 $\lambda 1$ 이 없는 항체 또는 $\lambda 1^+$ B 세포를 유발한다 (문헌 [Imanishi and Maekelae (1975) 상기 문헌], [Maekelae and Karjalainen (1977) Immunol. Rev. 34:119-138], [Reth, et al. (1978) Eur. J. Immunol. 8:393-400], [Reth, et al. (1979) Eur. J. Immunol. 9:1004-1013], [Karjalainen, et al. (1980) J. Immunol. 125:313-317], [Weiss and Rajewsky (1990) J. Exp. Med. 172:1681-1689], [Jacob, et al. (1991) J. Exp. Med. 173:1165-1175], [Cumano and Rajewsky (1986) EMBO J. 5:2459-2466]). 항-NP 반응의 초기 (면역화 후 4 내지 8일)에는 다량의 항원-활성화된 $\lambda 1^+$ B 세포가 선택된 수의 거대한 J558 (V1) 족의 V_H 유전자 ($V186.2$ ($V1S2$), $C1H4$, $CH10$, $V23$ ($V1S4$), 24.8 , $V102$ ($V1S7$) 및 $V583.5$ 포함)와 함께 다양한 D 유전자 절편을 발현한다 (문헌 [Jacob and Kelsoe (1992) J. Exp. Med. 176:679-687], [Bothwell, et al. (1981) Cell 24:625-637], [Allen, et al. (1988) EMBO J. 7:1995-2001], [Jacob, et al. (1993) J. Exp. Med. 178:1293-1307]). 면역화 후 10일째까지, 대부분의 $\lambda 1^+$ B 세포는 YYGS (서열 115) 컨센서스 아미노산 모티프가 있는 티로신-풍부 CDR3 영역을 코딩하는 $V1S2$ -to-DFL16.1 유전자 재배열을 발현한다 (문헌 [Weiss and Rajewsky (1990) 상기 문헌], [Bothwell, et al. (1981) 상기 문헌], [Jacob, et al. (1993) 상기 문헌], [Cumano and Rajewsky (1985) Eur. J. Immunol. 15:512-520], [McHeyzer-Williams, et al. (1993) J. Exp. Med. 178:295-305]). $\lambda 1$ 경쇄와 쌍을 이룬 $V1S2$ -to-DFL16.1 중쇄 재배열은 정규 항-NP B 세포 항원 수용체로 지칭되며 (문헌 [Reth, et al. (1978) 상기 문헌], [Reth, et al. (1979) 상기 문헌]), 이는 NP에 대한 C57BL/6 마우스의 1차 및 2차 체액성 면역 반응을 지배한다. 따라서, 이러한 특이적 항체 유전자 절편을 사용하는 것은 모노클로날 항체의 항원 특이성을 예측하는 것으로 간주된다.

[0283] Igh^b 마우스 (문헌 [Imanishi and Maekelae (1975) 상기 문헌])에서 항-NP 항체 반응의 균일성은 포스포티콜린에 대한 BALB/c 마우스의 반응 (문헌 [Crews, et al. (1981) Cell 25:59-66]); 계통 A 마우스에서 p-아조페닐 아르소네이트에 대해 생성된 항체 (문헌 [Pawlak, et al. (1973) J. Exp. Med. 137:22-31]); BALB/c 및 DBA/2 마우스에서의 2-페닐옥사졸론 반응 (문헌 [Maekelae, et al. (1978) J. Exp. Med. 148:1644-1656]); 및 BALB/c 마우스의 폴리($Glu^{60}-Ala^{30}-Tyr^{10}$)에 대한 반응 (문헌 [Theze and Somme (1979) Eur. J. Immunol. 9:294-301])에 반영된다. 이들 항체 반응에서 유전적 변이가 낮은 원인은 분명하지 않다. 단일 V 유전자 절편 (문헌 [Siekevitz, et al. (1983) Eur. J. Immunol. 13:123-132]) 또는 Igh 대립유전자 (문헌 [Siekevitz, et al. (1982) Eur. J. Immunol. 12:1023-1032])에 대한 제한된 항체 반응의 연관성은, 상동성 V(D)J 재배열을 포함하는 몇몇 B 세포 클론의 확장을 초래하는 항원-상보성에 대해 기회적이면서 유일한 최상의 해결책을 시사한다. 이 경우, 생식세포주 V_H 유전자 레파토리에 있어서의 계통-특이적 차이는 구조적으로 유사한 분자에 대한 항체 반응을 조절할 것이다. 대안적으로, 제한된 항체 반응은 자가-관용에 의해 경계가 지워질 수 있거나 (문헌 [Manser, et al. (1987) Immunol. Rev. 96:141-162], [Hande, et al. (1998) Immunity 8:189-198]), 또는 돌연변이성 변화에 대해 관용성이 확고한 V(D)J 재배열을 발현하는 림프구 클론에 따라 달라질 수 있다 (문헌 [Manser, et al. (1984) Science 226:1283-1288]). 메카니즘과 무관하게, 정해진 구조에 대한 항체 반응은 균일할 수 있고, 항체 레파토리 내에서 제한된 반응을 반영할 수 있으며, 이는 또한 항체가 동일하지 않다면 유사한 분자의 상호작용 (항체의 가변 영역 내에서 보존된 특정 아미노산에 의해 매개됨)을 통해 동일한 표적 항원에 결합하고 있다는 사실을 반영한다. 표적 항원과 모노클로날 항체의 상호작용이 주로 항체 분자의 상보성-결정 영역 (CDR) 내에 있는 아미노산에 의해 매개되기는 하지만, 프레임워크 아미노산도 또한 항원-결합 활성화에 중요하다. 따라서, 구조적으로 유사한 항체가 동일한 항원 또는 표적 분자의 영역에 결합할 가능성이 높은 반면, 상이한 V 영역을 갖는 구조적으로 유사하지 않은 항체가 상이한 분자 상호작용을 통해 항원의 상이한 영역과 상호작용할 가능성이 높다.

[0284] 표적 항원의 동일한 영역에 결합하는 구조적으로 유사한 항체가 표적 항원의 동일한 분자 부위에 결합할 가능성이 더 높기 때문에, 공개된 항-인간 CD20 모노클로날 항체의 아미노산 서열을 조사하였다. 1F5 (문헌 [Shan, et al. (1999) 상기 문헌]), B9E9 (문헌 [Schultz, et al. (2000) 상기 문헌]), 2H7 (미국 특허 제6,120,767호), 2B8 (미국 특허 제5,843,439호), 1H4 (문헌 [Haisma, et al. (1998) 상기 문헌]) 및 Leu-16 (문헌 [Wu, et al. (2001) 상기 문헌]) 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 V 영역은 아미노산 서열에 상동성이 있다 (도 11). 이러한 보존 수준은 이들 각 모노클로날 항체가 뉴클레오타이드 수준에서도 유사하다는 사실을 반영한다. 이들 항-CD20 모노클로날 항체의 중쇄는 V(D)J 유전자 절편과, $V1S121^*01$ 유전자 절편으로부터 유래한 V

영역, L16, Q52 또는 SP2 유전자 절편으로부터 유래한 D 영역, 및 J1 또는 J2 유전자 절편으로부터 유래한 J 영역과의 유사한 조합을 통해 생성하였다 (표 1). 이와 유사하게, J1*02 또는 J5*01 유전자 절편으로부터의 J 영역과 함께 V4-72*01 유전자 절편으로부터 경쇄를 생성하였다. 공지된 항-인간 CD20 항체들 사이의 균일성 수준은, 이들 각 모노클로날 항체가 인간 CD20의 유사하거나 동일한 부위에 결합하고 있음을 시사한다.

[0285] 공지된 항-CD20 모노클로날 항체들 사이의 아미노산 서열 상동성 수준은 항-인간 CD20 및 항-마우스 CD20 모노클로날 항체의 커다란 패널로 비교함으로써 강조된다. 비교를 위해, 공지된 항-CD20 모노클로날 항체를 우선 균일한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 갖는 제2 군의 항-인간 CD20 모노클로날 항체 (HB20-03, -04 및 -25)와 대비하였다. 중쇄 및 경쇄 V 영역 사이의 상당한 유사성이 도 12에 도시된 바와 같이 UPGMA 계통수 (산술 평균을 이용한 비-가중 짝짓기 방법)를 이용하여 가시화되었다. 이 모식도에서, 계통수 분지 지점들 사이의 수평 거리는 서열 연관도의 측정치이다. 예를 들어, 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄는 HB20-03, -04 및 -25 모노클로날 항체 (이들 서로가 가장 유사함)의 서열들보다 서로가 더 유사하였다. 경쇄 V 영역 서열들 중에서, 1H4 및 B9E9 서열이 가장 유사하였지만, 2H7, 1F5 및 2B8 모노클로날 항체에 대한 서열과도 매우 유사하였다. 이와 마찬가지로, HB20-3 및 HB20-4 모노클로날 항체는 매우 유사한 아미노산 서열을 가지고 있었으며, 이는 HB20-25 모노클로날 항체의 상응하는 서열보다 상대적으로 덜 유사하였다. 그러나, HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체의 경쇄 서열은 공지된 항-CD20 모노클로날 항체의 서열과 훨씬 더 상이하였다. 각 모노클로날 항체 사이에서 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄의 서열 상동성을 비교하였을 때, 공지된 항-CD20 모노클로날 항체와 HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체 사이의 서열 상동성 수준은 매우 뚜렷하였다 (도 12). 이는, 상이 2가지 군의 모노클로날 항체가 구별되는 것이며, 또한 상이한 분자 상호작용을 통해 또는 CD20 단백질 상의 구별되는 부위에서 인간 CD20에 결합할 가능성이 높음을 의미한다. 또한, HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체는 공지된 항-CD20 모노클로날 항체들이 공유하는 특성과 구별되는 생물학적 특성을 공유할 것으로 여겨진다.

[0286] 공지된 항-CD20 모노클로날 항체들 사이의 아미노산 서열 상동성 수준은 항-인간 CD20 및 항-마우스 CD20 모노클로날 항체의 커다란 패널로 비교함으로써 추가로 입증되었다. 일반적으로, 2B8, B9E9, 1F5, 1H4 및 Leu-16 중쇄는 그 서열이 HB20-01, -02 및 -06 모노클로날 항체의 중쇄와 유사하였다 (도 13 및 도 15). 서열 유사성에 기초하여, 이들 중쇄 V_H 절편을 A군 서열로 칭하였다 (도 13). 2H7 모노클로날 항체의 아미노산 서열은 다른 A군 중쇄와 유사하였지만, 다른 A군 서열의 중쇄로부터 벗어나 있었기 때문에, 이 중쇄를 B군 중쇄를 나타내는 것으로 칭하였다. HB20-03, -04 및 -25는 구조적으로 유사하였으며, 이들을 C군 중쇄로 칭하였다. HB20-05 모노클로날 항체 중쇄도 또한 구조적으로 구별되었으며, 이를 D군 중쇄를 나타내는 것으로 칭하였다. 많은 항-마우스 CD20 모노클로날 항체가 구조적으로 유사한 중쇄를 공유하였으며, MB20-08, -10, -18, -07, -02 및 -14를 E군 중쇄로 칭하였다. MB20-11 및 -16 모노클로날 항체 중쇄는 F군을 나타낼만큼 충분히 구별되었다. MB20-01 및 -13 모노클로날 항체는 다른 모든 항-CD20 모노클로날 항체와 구조적으로 구별되는 매우 다양한 중쇄를 사용하였으며, 이들을 G군 중쇄로 칭하였다. 이들 상이한 군의 중쇄 아미노산 서열은 각 항-CD20 중쇄의 생성을 위한 상이한 V(D)J 유전자 절편의 이용과 밀접한 관계가 있었다 (표 1). 이와 같이, 공지된 항-CD20 모노클로날 항체 중쇄는 본원에 개시된 대부분의 항-CD20 모노클로날 항체 중쇄와 구조적으로 구별되었다.

[0287] 공지된 항-CD20 모노클로날 항체들 사이의 현저한 아미노산 서열 상동성 수준은 항-인간 CD20 및 항-마우스 CD20 모노클로날 항체의 패널 사이에서 나타나는 경쇄 이용도를 비교함으로써 추가로 강조되었다. 2B8, B9E9, 1F5, 1H4, Leu-16 및 2H7 경쇄는 서열이 매우 유사하였으나, 다른 항-CD20 모노클로날 항체에 의해 사용되는 경쇄에 근거하여 구별되었다 (도 16 및 도 18). 서열 유사성에 기초하여, 이들 경쇄를 A군 서열로 칭하였다 (도 16). 다수의 항-마우스 CD20 모노클로날 항체 경쇄의 아미노산 서열은 대부분 유사하였지만, A군 경쇄로부터 벗어나 있었기 때문에, 이들 경쇄를 B군으로 칭하였다. HB20-03, -04 및 -25는 구조적으로 구별되었으며, C군 경쇄로 칭하였다. HB20-01, -02 및 -06 모노클로날 항체는 E군으로 칭해지는 유사한 경쇄를 사용하였다. MB20-18 및 MB20-01은 구조적으로 구별되는 경쇄를 사용하였기 때문에, 각각 F군 및 G군으로 칭하였다. 이들 상이한 군의 경쇄 아미노산 서열은 각 항-CD20 모노클로날 항체의 생성을 위한 상이한 VJ 유전자 절편의 이용과 밀접한 관계가 있었다 (표 1). 이와 같이, 공지된 항-CD20 모노클로날 항체 경쇄는 본원에 개시된 항-CD20 모노클로날 항체에 의해 사용되는 경쇄와 구조적으로 구별되었다.

[0288] 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 분석 결과, 상이한 항-CD20 모노클로날 항체가 구조적으로 구별되는 군에 속하기 때문에 상이한 분자 상호작용을 통해 인간 또는 마우스 CD20에 결합할 수 있음이 추가로 증명되었다. 2B8, B9E9, 1F5, 1H4 및 Leu-16 모노클로날 항체는 구조적으로 유사한 중쇄 및 경쇄를 사용하였으며, 각각

AA로 칭하였다 (도 19, 표 1). 2H7 모노클로날 항체 중쇄는 다른 공지된 항-CD20 모노클로날 항체에 의해 사용되는 중쇄와 구조적으로 상이하였지만 유사한 경쇄와 쌍을 이루었기 때문에, 이 모노클로날 항체를 BA 모노클로날 항체로 군을 지정하였다. CC군 모노클로날 항체인 HB20-03, -04 및 -25는 구조적으로 구별되는 특유한 부류의 항-CD20 모노클로날 항체를 나타낸다. 이와 유사하게, 특유한 중쇄 및 경쇄의 이용, 및 상이한 중쇄 및 경쇄의 쌍을 사용함으로써 달성된 조합적 다양성은, 각각의 다른 항-CD20 모노클로날 항체가 공지된 항-CD20 모노클로날 항체와 구조적으로 구별되는 것으로 분류되도록 하였다 (도 19).

[0289] 실시예 14

[0290] 항-CD20 모노클로날 항체 결합 밀도 및 B 세포 고갈

[0291] CD20 발현은 상이한 림프종 유형에서 뿐만 아니라 개별 종양 샘플의 세포들 사이에서도 매우 불균일하며, 이는 항-CD20 모노클로날 항체 요법의 성과에 영향을 미칠 수 있다 (문헌 [Smith (2003) Oncogene 22:7359-7368]). 전형적으로, 만성 림프구성 백혈병 세포 및 작은 림프구성 림프종 세포는 CD20을 낮은 수준으로 발현하며, 이에 상응하여 높은 수준으로 CD20을 발현하는 여포성 림프종 세포보다 더 낮은 리톡시맙 반응 속도를 나타낸다 (문헌 [McLaughlin, et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16:2825-2833]). 따라서, CD20 발현 밀도는 항-CD20의 치료 효능에 영향을 미치는 중요한 인자일 수 있는데, 이는 B 세포에 결합하여 이를 표적화함으로써 고갈시킬 수 있는 항-CD20 모노클로날 항체의 개수를 CD20 밀도가 규정하기 때문이다. CD20 발현 밀도가 치료 효능에 영향을 미치는지의 여부를 측정하여 밀도 변화가 B 세포 고갈에 영향을 미치는 정도를 측정하기 위해, 이형접합성 CD20^{+/-} 마우스를 고투여량 (250 μ g) 및 저투여량 (10 μ g)으로 MB20-11 모노클로날 항체를 처리하였다. CD20^{+/-} 마우스로부터의 B 세포는 야생형 자손에서 발견되는 밀도보다 절반의 밀도로 CD20을 발현하였다. 항-CD20 모노클로날 항체의 고투여량에서, 야생형 또는 단일-불충분(haplo-insufficient) CD20 발현은 7일째까지 비장으로부터 93 내지 97%의 B 세포가 제거되는 순환 또는 비장 B 세포 고갈에 대해 검출가능한 영향을 미치지 않았다 (도 20A 및 도 20B). 이와는 대조적으로, 저투여량의 항-CD20 모노클로날 항체는 야생형 마우스로부터 93 내지 98%의 순환 및 비장 B 세포를 효과적으로 고갈시켰지만, 7일째까지 CD20^{+/-} 마우스로부터 단지 30 내지 41%의 순환 또는 비장 B 세포를 제거하였다 (도 20A 및 도 20B). 따라서, 항-CD20 모노클로날 항체 처리의 효과성은 B 세포에서의 CD20 발현을 단지 50% 감소시키는 것에 의해 유의하게 변경되었다. 더욱이, 표적 B 세포에 대한 항-CD20 모노클로날 항체의 결합 밀도는, 특히 존재하는 모노클로날 항체의 농도가 더 낮을 때, 세포 표면의 CD20 밀도에 의해 상당한 영향을 받았다.

[0292] 실시예 15

[0293] MB20-11 모노클로날 항체 결합 및 세포 표면 CD20 발현

[0294] 세포 표면 CD20 발현 밀도는 항-CD20의 치료 효능에 대한 중요한 인자이다 (문헌 [Smith (2003) 상기 문헌]). 따라서, 요법 과정에서 CD20 발현을 상향조절하여 생체내에서 항-CD20 모노클로날 항체의 효능을 증진시키기 위한 시도가 행해졌으며, 그 예로는 환자를 G- 또는 GM-CSF로 처리하는 것이 있다. 그러나, 관찰된 증진 효과는 CD20 상향조절 이외의 메카니즘으로 설명될 가능성이 높다 (문헌 [Ravetch and Lanier (2000) Leukemia 16:693-699], [van der Kolk, et al. (2002) Leukemia 16:693-699]). 본원에서, MB20-11 모노클로날 항체가 생체내에서 마우스 B 세포를 고갈시키는데예외적으로 효과적임을 증명하였다 (도 7 내지 10). MB20-11 모노클로날 항체의 생체내 효과성이 부분적으로는 IgG2a 이소형에 의한 것으로 보이는 하지만, 다른 인자들도 치료 효능에 기여할 가능성이 높다. 따라서, MB20-11 모노클로날 항체 결합이 비장 B 세포에 의한 세포 표면 CD20 발현에 미치는 효과를 시험관내에서 측정하였다. 예상외로, 37°C에서 배양된 B 세포에 대한 MB20-11 모노클로날 항체의 결합은, 얼음 위에서 유지된 세포 또는 유사하거나 상이한 이소형의 다른 MB20 모노클로날 항체와 함께 배양된 세포에 비해, 시간에 따라 보다 많은 MB20-11 모노클로날 항체의 결합을 유도하였다 (도 21; 데이터 미기재). 평균적으로, MB20-11 모노클로날 항체 결합은 30분 내지 8시간의 소정 기간에 걸쳐 97 $\pm$ 29% (n=4, p<0.05) 증가하였다 (도 21). 시간에 따른 MB20-11 모노클로날 항체 결합의 증가는 낮은 모노클로날 항체 친화도와 관련성이 있어 보이지는 않았는데, 이는 세포 표면에서 CD20 발현의 증가를 유도하지 않은 다른 MB20 모노클로날 항체와 유사한 모노클로날 항체 농도에서 MB20-11 모노클로날 항체가 포화 수준의 염색에 도달하였기 때문이다 (도 6). 다른 항-마우스 CD20 모노클로날 항체가 이러한 특성을 나타내지 않았기 때문에 (도 21, 데이터 미기재), MB20-11 모노클로날 항체는 CD20 상의 특유한 영역 또는 에피토프에 결합할 수 있다. MB20-11 모노클로날 항체가 CD20에 결합하는 것은 B 세포 상에서 세포 표면 CD20 발현의 증가를 유도하거나, 또는 초기 MB20-11 모노클로날 항체 결합 부위를 노출시키는 세포 표면 CD20 분자에서의 구조 변화를 유도할 수 있다.

- [0295] 실시예 16
- [0296] HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체의 결합 밀도
- [0297] 모노클로날 항체의 결합 밀도는, 보다 높은 밀도로 B 세포에 결합하는 모노클로날 항체가 치료에 있어 보다 효과적일 수 있음을 나타내는, 생체내에서 최적의 항-CD20 모노클로날 항체 매개된 B 세포 고갈 (도 20)에 대해 중요하다. MB20-18 모노클로날 항체는, 특히 모노클로날 항체의 농도가 제한되는 경우에 MB20 군의 모노클로날 항체의 가장 높은 밀도에서 B 세포의 표면에 결합하였다 (도 6). 이는 생체내 B 세포 고갈에 대한 다른 IgG2b 항-CD20 모노클로날 항체 사이에서 MB20-18 모노클로날 항체의 특별한 효과성에 기여했을 수 있다 (도 7B). 이들 아미노산 서열의 유의차에 기초하여, CC군의 HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체 (표 1)는 공지된 항-CD20 모노클로날 항체들이 공유하는 특성과 구별되는 생물학적 특성을 공유할 것으로 여겨진다 (도 12). 이들 차이점 중에서, HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체는 간접 면역형광 염색 분석에서 공지된 항-CD20 모노클로날 항체보다 유의하게 더 높은 수준으로 CD20을 발현하는 1차 B 세포 및 B 림프종 세포주에 결합하였다 (도 22). 평균적으로, HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체는 1F5, B9E9 및 1H4 모노클로날 항체보다 3.7배 더 높은 수준으로 인간 혈액 B 세포에 결합하였다 (표 6). 이와 유사하게, HB20-3, -4 및 -25 군의 모노클로날 항체는 1F5, B9E9 및 1H4 군의 모노클로날 항체보다 각각 4.5배, 3.1배 및 4.3배 더 높은 수준으로 B 세포주인 라지, BJAB 및 DHL-4에 결합하였다. 최초로 기재된 항-CD20 모노클로날 항체 (문헌 [Stashenko, et al. (1980) J. Immunol. 125:1678])였던 B1 모노클로날 항체가 B 세포를 염색시키고, 다른 공개된 항-CD20 모노클로날 항체와 비교했을 때 더 높은 밀도로 B 세포에 특징적으로 결합한다는 것이 일관되게 관찰되었다 (표 6). 그럼에도 불구하고, HB20-3, -4 및 -25 군의 모노클로날 항체는 B1 모노클로날 항체보다 더 높은 수준으로 1차 B 세포 및 B 세포주와 반응하였다 (표 6). 구체적으로, HB20-3 모노클로날 항체는 B1 모노클로날 항체보다 1차 B 세포, 라지 세포, BJAB 세포 및 DHL-4 세포와 각각 69%, 130%, 71% 및 57% 더 높은 수준으로 결합하였다. 따라서, CC군 모노클로날 항체의 특유한 특징은 다른 공지된 항-CD20 모노클로날 항체와 비교하여 세포 표면 CD20에 대해 비특정적으로 더 높은 결합 활성을 나타낸다는 것이다.
- [0298] 보다 높은 밀도로 결합하는 것과 1F5 모노클로날 항체보다 더 높은 수준으로 1차 B 세포 및 B 세포주와 반응한다는 것 이외에, HB20-3, HB20-4 및 HB20-25는 중쇄 CDR3과 CDR1 영역 및 경쇄 CDR3 영역에 공통적인 아미노산 모티프를 공유한다. 이 공통적인 모티프는 중쇄에 대해 도 15에, 그리고 경쇄에 대해 도 18에 명백히 나타나 있다. 예를 들어, 중쇄 CDR3 영역은 FYXYXXX¹YGAX²XXY의 아미노산 서열 모티프를 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있고, X¹은 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 Y 또는 S이고, X²는 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 M 또는 L이고, F는 페닐알라닌이고, Y는 티로신이고, G는 글리신이고, A는 알라닌이고, M은 메티오닌이고, L은 루이신이며, S는 세린이다.
- [0299] 중쇄 CDR1 영역은 NXXXX의 아미노산 서열 모티프를 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있고, N은 아스파라긴이다.
- [0300] 또한, 경쇄 CDR3 영역은 XHFWXX³XWX의 아미노산 서열 모티프를 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산 서열일 수 있고, H는 히스티딘이고, F는 페닐알라닌이고, W는 트립토판이고, X³은 임의의 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 T 또는 I이고, 여기서 T는 트레오닌이고 I는 이소루이신이다.

표 6

항체	세포 공급원			
	혈액 B 세포	라지	BJAB	DHL4
대조군	1	3	10	1
HB20-3	469	2216	1198	765
HB20-4	397	1579	1095	578
HB20-25	227	1347	849	514
1F5	104	455	386	169
B9E9	112	438	377	162
1H4-2a	75	244	240	98
B1	277	944	700	486

인간 혈액 림프구 및 라지, BJAB 또는 DHL-4 B 림프아구양 세포주의, 포화 농도의 항-CD20 모노클로날 항체 또는 2차 항체 단독 (대조군)과의 반응성. 항-CD20 모노클로날 항체는 포화된 것으로 측정되며 최적 염색을 제공하는 농도로 사용하였다. 1F5, B9E9 및 1H4 (IgG2a) 모노클로날 항체는 1:200으로 희석된 복수액으로 사용하였다. HB20-3, -4 및 -25 모노클로날 항체는 조직 배양 상층액으로 사용하였다. B1 모노클로날 항체는 10 µg/mL의 정제된 모노클로날 항체로 또는 조직 배양 상층액으로 사용하였다. 모든 경우에, 모노클로날 항체 염색은 PE-접합된 이소형-특이적 2차 항체를 사용하여 유동 세포계측 분석으로 가시화하였다. 값은 유동 세포계측 분석으로 측정된 각 B 세포 집단에 대한 염색의 평균 선형 형광 강도를 나타낸다. 결과는 3회 이상의 실험에서 얻은 결과들의 대표값이다.

[0301]

[0302]

실시예 17

[0303]

항-CD20 모노클로날 항체의 치료 효과

[0304]

2.5 µg의 투여량으로 정맥내 투여된 MB20-11 모노클로날 항체가 순환 및 조직 B 세포를 효과적으로 고갈시켰기 때문에 (도 7C), 피하 (s.c.)로 투여된 유사한 소량의 항-CD20 모노클로날 항체가 동등한 정도로 B 세포를 고갈시키는지의 여부를 측정하였다. 대부분의 순환 및 조직 B 세포는, 항-CD20 모노클로날 항체 0.5 µg의 투여량을 정맥내 또는 피하로 투여한 마우스에서 고갈되었다 (도 23A 및 도 23B). 리톡시맙은 375 mg/m²의 투여량으로 인간에게 정상적으로 정맥내 투여하였으며, 이는 2,500 µg/마우스의 투여량에 상응할 것이다 (표 7). 마우스에서의 효과적인 B 세포 고갈은 5 내지 10 µg의 단일 투여량의 MB20-11 모노클로날 항체를 피하로 투여함으로써 얻어졌고, 이는 현재 환자에게 정맥내 투여되는 리톡시맙의 양보다 항체의 양이 250배 내지 500배 더 적은 양과 균등할 것이다. 마우스에서의 현재 발견에 기초하여, 치료에 있어 MB20-11 모노클로날 항체에 필적할만한 항-CD20 모노클로날 항체는, 인간에게 1.3 내지 2.6 mg을 피하로 투여했을 때 순환 및 조직 B 세포 둘 다를 효과적으로 고갈시킬 수 있었다.

표 7

마우스 µg/마우스	마우스* mg/kg	인간 # mg/kg	인간 투여량 # mg	인간 # mg/m ²
0.5	0.025	0.0020	0.128	0.075
1	0.05	0.0039	0.257	0.15
2.5	0.125	0.0099	0.641	0.375
5	0.25	0.0197	1.28	0.75
10	0.5	0.039	2.57	1.5
25	1.25	0.099	6.41	3.75
50	2.5	0.197	12.8	7.5
100	5	0.395	25.7	15
250	12.5	0.987	64.1	37.5
2500	124	9.9	641	375

* 추정 중량 0.02 kg

추정 중량 65 kg, 신체 표면적 1.71 m²

출처: www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm으로부터의 투여량 계산기

[0305]

[0306]

상기 기재 내용은 본 발명을 예시하는 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 해석해서는 안된다. 본 발명은 하기

청구항에 의해 정의되며, 청구항의 등가물도 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0062]

도 1A 내지 도 1M은 Cd20 유전자의 표적화된 파괴를 예시한다. 도 1A: Cd20 유전자의 3' 말단을 코딩하는 게놈 클론. 도 1B: 엑손 5 내지 8 (흑색 사각형)을 함유하는 야생형 Cd20의 인트론-엑손 조직도. 엑손 번호는 인간 CD20 구조를 기초로 한다 (문헌 [Tedder et al., (1989) J. Immunol. 142:2560-2568]). 도 1C: 표적화 벡터의 구조. 도 1D: 상동성 재조합 후에 엑손 6의 EcoRV 제한 부위가 결실된 Cd20 대립유전자의 구조. 도 1E: 2 마리 야생형 자손(littermate) 및 4 마리 CD20^{-/-} 자손으로부터의 게놈 DNA를 EcoRV로 소화시키고 니트로셀룰로스로 이동시켜 도 1D에 나타낸 5' DNA 프로브와 혼성화시킨 써딘 블롯 분석. 도 1F: 엑손 6 (EcoRV 부위의 5') 및 엑손 7에서 결합하는 프라이머를 사용한, 야생형 자손 및 CD20^{-/-} 자손으로부터의 게놈 DNA의 PCR 증폭. G3PDH 증폭은 양성 대조군으로서 나타내었다. 도 1G: 야생형 자손 및 CD20^{-/-} 자손의 비장 RNA로부터 생성된 cDNA의 PCR 증폭. 각 반응 혼합물은 엑손 3에 의해 코딩되는 서열과 혼성화되는 센스 프라이머 및 엑손 6 또는 Neo^r 유전자 프로모터 서열과 혼성화하는 2종의 안티센스 프라이머를 함유하였다. 엑손 3 프라이머 및 엑손 6 프라이머를 사용하여 증폭시킨 DNA는 445 bp 길이였으나, 엑손 3 프라이머 및 Neo 프라이머는 749 bp 단편을 증폭시켰다. 도 1H: MB20-13 모노클로날 항체와 CD20 cDNA로 형질감염되거나 (굵은 선) 또는 형질감염되지 않은 (굵김선) 300.19 세포 또는 CHO 세포와의 반응성. 가는 선은 CD20 cDNA로 형질감염된 세포를 나타내며, 2차 항체만으로 염색하거나 이소형-대조군 모노클로날 항체로 염색하였다. 면역형광 염색은 유동 세포계측 분석으로 가시화시켰다. 도 1I: MB20-7 모노클로날 항체 (피코에리트린-접합된 항-마우스 IgG2b 항체를 사용하여 가시화 함) 및 항-CD19 모노클로날 항체 (FITC-접합된 것)를 사용하고 유동 세포계측 분석법을 이용한, CD20^{-/-} 자손 또는 야생형 자손으로부터의 비장세포의 면역형광 염색. 사각형으로 그린 사분면은 미반응성 모노클로날 항체 대조군을 사용하여 결정된 음성 및 양성 세포 집단을 나타낸다. 도 1H 및 도 1I의 결과는 12종의 항-마우스 CD20 모노클로날 항체를 사용하여 얻은 결과를 대표하는 것이다. 도 1J: CD20^{-/-} 자손 및 야생형 자손에서의 B 림프구 분포. 게이팅(gating)된 세포 집단은 표 4에 기재한 세포에 상응하며, 10 마리의 자손 군을 사용하여 얻은 결과를 대표한다. 도 1K: CD20^{-/-} B 세포의 마이토젠 반응. CD20^{-/-} 자손 및 야생형 자손으로부터의 정제된 비장 B 세포 (2×10⁵개/웰)를 항-IgM F(ab')₂ 항체 단편, 항-IgM 항체 및 IL-4, 또는 LPS와 함께 배양하였다. 수치는 3벌 배양물로부터의 평균치 (±SEM)이며, 4회의 독립적인 실험으로 얻은 결과를 대표한다. 도 1L: 6 마리의 CD20^{-/-} 자손 (흑색 막대그래프) 및 야생형 자손 (백색 막대그래프)에 대하여 이소형-특이적 ELISA로 측정 한 평균 (±SEM) 혈청 Ig 수준. 도 1M: T 세포-의존적 체액성 면역 반응. 2 마리의 CD20^{-/-} 마우스 (흑색 원, 실선) 및 야생형 마우스 (백색 사각형, 굵김선)를 제0일 및 제21일에 DNP-KLH로 면역화하였고, 도면에 나타낸 시간에 혈청을 수집하였다. 혈청 항-DNP 항체는 이소형-특이적 ELISA로 결정하였다. 평균 CD20^{-/-} 항체 수준 (실선) 및 야생형 항체 수준 (굵김선)이 나타나 있다.

[0063]

도 2A 내지 도 2I는 B 세포 발생 동안의 CD20 발현을 보여준다. 도 2A: MB20-7 모노클로날 항체 (굵은 선) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (굵김선)를 사용한, 마우스 림프아구양 세포주의 면역형광 염색. 야생형 C57BL/6 마우스의 골수 (도 2B), 혈액 (도 2C), 말초 림프절 (PLN, 도 2D), 비장 (도 2E) 및 복강 (도 2F)으로부터 단리한 림프구의 단일 세포 현탁액을 2색 면역형광 염색을 통해 유동 세포계측 분석법으로 시험하였다. 도 2G: 4색 유동 세포계측 분석법으로 평가한, 골수 B 세포 아집단에 의한 CD20 발현. 프로(pro)-B 세포는, 림프구의 전방산란 성질과 측방산란 성질을 갖는 CD43⁺ B220^{lo} 세포로 확인되었다. 프리(Pre)-B 세포는 IgM⁻ CD43⁻ B220^{lo} 세포였다. 미성숙 CD43⁻ B 세포 및 성숙 CD43⁻ B 세포를 IgM 및 B220의 상대 밀도에 따라 3개의 분획 (I, II 및 III)으로 나누었다. 이소형-매치(match)된 대조군 모노클로날 항체를 음성 대조군 (점선)으로 사용하여 배경(background) 형광 염색을 평가하였다. 도 2H: HSA 및 CD21 발현의 상대 밀도로 규명한, T1, T2 또는 성숙 (M) 비장 B 세포에 의한 CD20 발현. 도 2I: CD23 발현 및 IgM과 CD21의 상대 밀도로 규명한, T1, T2, 변연대 (MZ) 및 성숙 (M) 비장 B 세포에 의한 CD20 발현. 모든 결과는 3 마리 이상의 2개월령 야생형 마우스를 사용하여 얻은 결과를 대표한다.

[0064]

도 3A 내지 도 3C는 마우스 CD20 및 CD20^{-/-} B 세포의 생화학적 특성을 보여준다. 도 3A: HB20-8 모노클로날 항

체 (PB4; 인간 CD20) 및 MB20-1 모노클로날 항체 (마우스 CD20) 각각에 의해 표면-바이오티닐화된 라지(Raji) (인간) 및 A20 (마우스) B 세포주로부터 면역침전 (화살표)된 CD20. 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체 (C 항체)를 사용한 면역침전물을 보여준다. 환원된 겔 패널에서의 수직 굵금선은 이들 결과가 별개의 겔을 병행하여 운행시켜 얻은 것임을 나타낸다. 도 3B: CD20 발현의 웨스턴 블롯 분석. 라지 (1×10^6 개 세포/레인), A20 및 300.19 B 세포주 또는 정제된 마우스 비장 B 세포 (5×10^6 개 세포/레인)의 용해물을 환원 조건하에 비등시켰다가 SDS-PAGE로 분리하여 니트로셀룰로스로 이동시킨 후에 MB20-1 모노클로날 항체로 프로빙(probing)했다. 도 3C: PMA의 존재 및 부재하에 인큐베이션한 원발성 B 세포 및 B 세포주에서의 CD20 인산화. 인산염 무함유 배지 중에서 배양한 A20 세포 (2×10^7 개), LPS-활성화된 마우스 비장 B 세포 (2×10^7 개) 및 라지 세포 (1×10^7 개)를 $^{32}\text{PO}_4$ 를 함유하는 배지 중에서 90분 동안 인큐베이션했다. 각 배양물의 절반은 PMA (200 ng/ml)과 함께 30분 동안 인큐베이션한 후에 세포를 세정제로 용해시켰다.

[0065] 도 4A 내지 도 4D는 $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에서의 변경된 Ca^{2+} 반응을 보여준다. $\text{CD20}^{-/-}$ 자손 및 야생형 자손으로부터의 indo-1-로딩된 B 세포에서 IgM (도 4A), CD19 라이게이션 (도 4B) 또는 탐사가르긴 (도 4C)에 의해 유도된 Ca^{2+} 반응. 제1분 (화살표)에는 EGTA의 존재 또는 부재하에서 최적 농도의 염소 항-IgM F(ab')_2 항체 단편, 항-CD19 모노클로날 항체 또는 탐사가르긴을 가하였다. indo-1 형광의 비율 증가는 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 증가되었음을 나타낸다. 이들 결과는 6회 이상의 실험으로부터 얻은 결과를 대표한다. 도 4D: $\text{CD20}^{-/-}$ (가는 선) 및 야생형 (굵은 선) 자손으로부터의 비장세포에 의한 CD19 발현을 피코에리트린-접합된 항-CD19 모노클로날 항체를 사용한 면역형광 염색을 통해 유동 세포계측 분석법으로 평가하였다. 굵금선은 대조군 모노클로날 항체를 사용한 경우의 야생형 비장세포 염색을 대표한다.

[0066] 도 5A 및 도 5B는 $\text{CD20}^{-/-}$ 자손 및 야생형 자손의 정제된 비장 B 세포에서의 단백질 티로신 인산화를 보여준다. 도 5A: B 세포 (2×10^7 개/샘플)를 F(ab')_2 항-IgM 항체 단편과 함께 도면에 나타난 시간 동안 인큐베이션하고 세정제로 용해시켰다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로스로 이동시켜 항-포스포티로신 (항-pTyr) 항체로 면역블롯팅하였다. 블롯을 스트리핑(striping)하고 동등한 단백질 로딩에 대한 대조군으로서 항-SHP-1 항체로 다시 프로빙했다. 도 5B: $\text{CD20}^{-/-}$ B 세포에 의한 신호 전달 분자의 티로신 인산화. 야생형 자손 및 $\text{CD20}^{-/-}$ 자손으로부터의 정제된 비장 B 세포를 도면에 나타난 시간 동안 F(ab')_2 항-마우스 IgM 항체 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하였다. 세포의 세정제 용해물을 사용하여 항-포스포티로신 항체로 웨스턴 블롯 분석을 행하여, 단백질 인산화를 평가하였다. 이어서, 상기 블롯을 스트리핑하고 항-ERK2 항체로 다시 프로빙하여 샘플 사이의 동등한 단백질 로딩을 확인하였다. 각 패널은 분자량 마커 (kDa)의 이동을 보여준다. 모든 결과는 3회 이상의 별도 실험으로부터 얻은 결과를 대표한다.

[0067] 도 6A 내지 도 6C는 항-CD20 모노클로날 항체와 마우스 비장 B 세포와의 반응성을 보여준다. 도 6A: 대표적인 항-CD20 모노클로날 항체 (실선) 또는 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체 (굵금선) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색된 CD19^+ 세포의 형광 강도. 도 6B: 소정 범위의 모노클로날 항체 농도에서 항-CD20 모노클로날 항체 염색의 평균 형광 강도 (MFI). 화살표는 모노클로날 항체가 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용된 경우에 있어서 염색의 평균 강도를 표시한다. 도 6C: 항-CD20 모노클로날 항체 (실선) 또는 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체 (굵금선) (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색된 CD19^+ 세포의 형광 강도. 모든 경우에 있어서, 모노클로날 항체 염색은 PE-접합된 이소형-특이적 2차 항체를 사용하여 유동 세포계측 분석법으로 가시화하였다. 상기 결과는 3회 이상의 실험으로 얻은 결과를 대표한다.

[0068] 도 7A 내지 도 7D는 생체내 B 세포 고갈을 보여준다. 도 7A: 야생형 마우스 또는 $\text{CD20}^{-/-}$ 마우스를 MB20-11 모노클로날 항체 또는 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체로 처리한 후에 면역형광 염색을 통해 유동 세포계측 분석법으로 측정된, 혈액 (제2일) 및 비장 (제7일)으로부터의 대표적인 B 세포 고갈. 수치는 게이트된 B220^+ B 세포의 비율(%)을 나타낸다. 도 7B: 2 마리 이상의 야생형 자손에게 MB20 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체를 처리한 후, 혈액 (제2일 또는 제7일, 1 ml 당) 및 비장 (제7일) B 세포의 총 수 ($\pm\text{SEM}$). MB20 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체로 처리된 마우스에 대한 평균 결과 사이의 유의차는

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 나타났다. 도 7C: 여러 투여량의 MB20-11 모노클로날 항체 처치 7일 후, 야생형 자손에서의 혈액 및 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM) (데이터 지점 당 ≥ 2 마리 마우스). 미처치 마우스 (0) 및 모노클로날 항체로 처치된 마우스 사이의 유의차는 ** $p < 0.01$ 로 나타났다. 도 7D: 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치 (군 당 ≥ 5 마리 마우스)한 후, 야생형 마우스에서의 혈액 및 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM). 시간 표시 0 뒤편으로 나타난 수치는 제1시간에 얻은 데이터를 대표한다.

[0069]

도 8A 내지 도 8E는 B 세포 고갈이 $Fc\gamma R$ -의존적임을 보여준다. 도 8A: 제0일에 $Fc\gamma R^{-/-}$, $Fc\gamma RI^{-/-}$, $Fc\gamma RII^{-/-}$ 및 $Fc\gamma RIII^{-/-}$ 마우스에게 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 후의 혈액 B 세포 고갈. 수치는 모노클로날 항체 처치 (시점 당 ≥ 5 마리 마우스) 이전 (시간 표시 0) 및 1시간 또는 2일, 4일 또는 7일 후의 평균 순환 B 세포수 ($\pm$ SEM, 1 ml 당)를 나타낸다. 도 8B: 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 대표적인 비장 B 세포 고갈. 수치는 도면에 나타난 게이트 내에서의 $B220^{+}$ 림프구 비율(%)을 나타낸다. 도 8C: MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 막대) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 막대)를 처치 (군 당 ≥ 5 마리 마우스)한지 7일 후의 평균 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM). 수치는 항-CD20 모노클로날 항체로 처치한 마우스에서의 $B220^{+}$ 림프구를 대조군 모노클로날 항체로 처치한 자손에서의 결과와 비교한 평균 상대 비율(%)을 나타낸다. 도 8D: 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 $Fc\gamma R^{-/-}$ 자손에서와 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 사각형) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 사각형)를 처치한 야생형 자손에서의 B 세포 고갈 비교. $Fc\gamma R^{-/-}$ 자손에게 MB20-11 모노클로날 항체 또는 대조군 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 대표적인 비장 B 세포 고갈. 수치는 $B220^{+}$ 림프구의 비율(%)을 나타낸다. 막대 그래프는 $Fc\gamma R^{-/-}$ 마우스 (흑색 막대) 또는 야생형 마우스 (백색 막대) (군 당 ≥ 5 마리 마우스)에게 MB20-11 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 평균 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM)를 대표한다. 도 8E: 제0일에 MB20-18 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 $Fc\gamma R^{-/-}$ 자손에서와 제0일에 MB20-18 모노클로날 항체 (흑색 사각형) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 사각형)를 처치한 야생형 자손에서의 혈액 및 비장 (제7일) B 세포 고갈 비교. 막대 그래프는 $Fc\gamma R^{-/-}$ 마우스 (흑색 막대) 또는 야생형 마우스 (백색 막대) (군 당 ≥ 5 마리 마우스)에게 MB20-18 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 평균 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM)를 대표한다. 도 8A 내지 도 8E: MB20 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체로 처치된 마우스에 대한 평균 결과 사이의 유의차는 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 나타났다.

[0070]

도 9A 내지 도 9D는 생체내 B 세포 고갈이 C와 무관하다는 것을 보여준다. 도 9A: 비장 B 세포에 대한 MB20 모노클로날 항체의 시험관내 C-의존적 세포독성. 수치는 3회 이상의 실험에서 요오드화프로피듐 양성 (PI^{+})이었던 $B220^{+}$ 세포의 평균 ($\pm$ SEM) 비율(%)을 대표한다. 도 9B: 제0일에 $C3^{-/-}$, $C4^{-/-}$ 또는 $C1q^{-/-}$ 마우스에게 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 후의 B 세포 고갈. 혈액으로 표시한 도면에서의 수치는 모노클로날 항체 처치 (시점 당 ≥ 5 마리 마우스) 이전 (시간 표시 0) 및 1시간 또는 2일, 4일 또는 7일 후의 평균 순환 B 세포수 ($\pm$ SEM, 1 ml 당)를 나타낸다. MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 막대) 및 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 막대)를 처치 ($\geq$ 군 당 5 마리 마우스)한지 7일 후의 대표적인 비장 B 세포 빈도 및 평균 B 세포수 ($\pm$ SEM). 도 9C 및 도 9D: 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 또는 MB20-18 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 $C3^{-/-}$ 마우스에서와 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 또는 MB20-18 모노클로날 항체 (흑색 사각형) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 사각형)를 처치한 야생형 자손에서의 혈액 및 비장 B 세포 고갈 비교. $C3^{-/-}$ 자손에게 MB20-11 모노클로날 항체 또는 대조군 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 대표적인 비장 B 세포 고갈. 수치는 도면에 나타난 게이트 내에서의 $B220^{+}$ 림프구 비율(%)을 나타낸다. 막대 그래프는 $C3^{-/-}$ 마우스 (흑색 막대) 또는 야생형 마우스 (백색 막대) (군 당 ≥ 5 마리 마우스)에게 MB20-11 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체를 처치한지 7일 후의 평균 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM)를 대표한다. 도 9A 내지 도 9D: MB20 모노클로날 항체 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체로 처치된 마우스에 대한 평균 결과 사이의 유의차는 * $p < 0.05$, ** $p <$

0.01로 나타났다.

[0071] 도 10A 및 도 10B는 단핵구가 B 세포 고갈을 매개한다는 것을 보여준다. 야생형 마우스에게는 도면에 나타난 바와 같이 (화살표) 클로드로네이트 (CLOD)를 처치하여 대식세포를 고갈시켰지만, 다른 마우스는 백혈구 아집단이 유전적으로 고갈된 것이었다. 도 10A: 제0일에 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 원) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 원)를 처치한 후의 혈액 B 세포 고갈. 클로드로네이트-처리된 마우스의 경우에는 모노클로날 항체를 처치하고 1시간 및 2일, 4일 및 7일 후에 혈액 B 세포수를 측정하였으며, 시간 표시 0을 나타낸 수직 끊김선은 모노클로날 항체를 처치한 시점을 가리킨다. CSF1^{op} 마우스의 경우에는 이들 마우스가 몸집이 작고 사망 위험이 있기 때문에 모노클로날 항체를 처치한지 1시간 후의 순환 B 세포수를 정량할 수 없었다. 1시간 시점에서의 B 세포수는 다른 유전형의 마우스에 대해 나타났다. 도 10B: 대표적인 유동 세포계측 분석치 및 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 막대) 또는 이소형-대조군 모노클로날 항체 (백색 막대)를 처치 (군 당 ≥ 5 마리 마우스)한지 7일 후의 평균 비장 B 세포수 ($\pm$ SEM). 이소형-대조군 모노클로날 항체 또는 MB20 모노클로날 항체로 처리된 세포로부터의 평균 결과 사이의 유의차는 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 나타났다.

[0072] 도 11A 및 도 11B는 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 (표 1)의 아미노산 서열 정렬을 보여준다. 도 11A: 중쇄 아미노산의 번호매김과 각 모노클로날 항체의 V, D 및 J 영역에 대한 코딩 서열의 기원 지정은 통상의 방법 (문헌 [Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. U. S. Government Printing Office, Bethesda, MD])에 따른 것으로서, 아미노산 위치 1 내지 94 및 상보성-결정 영역 CDR1 및 CDR2가 V_H 유전자에 의해 코딩된다. 끊김선은 유사한 아미노산 서열들의 정렬을 최대화하기 위해서 서열 내에 삽입한 갭(gap)을 나타낸다. 서열 내의 갭은 명확성을 위해서 V_H, D 및 J 절편 사이에 도입되었다. 도 11B: 항-CD20 모노클로날 항체의 경쇄 V_K 아미노산 서열 분석. 아미노산의 번호매김과 각 모노클로날 항체에 대한 코딩 서열의 기원 지정은 통상의 방법 (문헌 [Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. U. S. Government Printing Office, Bethesda, MD])에 따랐다. 예측되는 신호 서열 절단 부위 다음의 아미노산을 1번이라고 번호를 매겼다. 끊김선은 유사한 아미노산 서열들의 정렬을 최대화하기 위해서 서열 내에 삽입한 갭을 나타낸다. 서열 내의 갭은 명확성을 위해서 V_K 절편 서열과 J 절편 서열 사이에 도입되었다.

[0073] 도 12는 도 11에 나타난 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체에 대하여 추정되는 모노클로날 항체의 중쇄 서열 및 경쇄 서열의 UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) 트리를 도시한다. 비교를 위해서, HB20-03, HB20-04 및 HB20-25 모노클로날 항체의 3가지 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체를 나타내었다. 수평 방향 트리 가지의 상대적 길이는 서열 관련성의 척도이다. 예를 들어, 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄는 HB20-03, HB20-04 및 HB20-25 모노클로날 항체의 서열에 대한 것보다 서로에게 더 유사하고, HB20-03, HB20-04 및 HB20-25 모노클로날 항체의 서열은 서로에게 가장 유사하다. 3번째 패널에서는, 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 연결하여 인접한 H + L 쇄 서열을 형성한 후에 서열 분석을 행하였다. 이러한 분석은 중쇄 및 경쇄의 조합이 공지된 항-CD20 모노클로날 항체와 HB20-03, HB20-04 및 HB20-25 모노클로날 항체 사이에는 관련성이 없음을 보여준다. UPGMA 트리는 진웍스(Geneworks) 버전 2.0 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재하는 인텔리제네틱스, 인크.(IntelliGenetics, Inc.) 제품)을 사용하여 생성한 것이다.

[0074] 도 13은 도 11에 나타난 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 및 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체 (표 1)에 대하여 추정되는 모노클로날 항체 중쇄의 V(D)J 서열의 아미노산 서열 비교를 보여준다. 데이터는 추정되는 모노클로날 항체 중쇄 서열의 UPGMA 트리로서 나타난 것이다. 수평 방향 트리 가지의 상대적 길이는 서열 관련성의 척도이다. 중쇄는 오른쪽에 나타난 것과 같이 서열 유사성을 기초로 하여 그룹을 나누었다 (A 내지 G).

[0075] 도 14A 내지 도 14N은 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체 (표 1)의 중쇄 V_H-D-J_H 연결부 서열에 대한 뉴클레오타이드 서열 및 예측되는 아미노산 서열을 보여준다. 도 14A: HB20-01, HB20-02 및 HB20-06의 아미노산 서열 (서열 1) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 2), 도 14B: HB20-03의 아미노산 서열 (서열 3) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 4), 도 14C: HB20-04의 아미노산 서열 (서열 5) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 6), 도 14D: HB20-05의 아미노산 서열 (서열 7) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 8), 도 14E: HB20-25의 아미노산 서열 (서열 9) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 10), 도 14F: MB20-01 및 MB20-13의 아미노산 서열 (서열 11) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 12), 도 14G: MB20-02의 아미노산 서열 (서열 13) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 14), 도 14H: MB20-07의 아미노산 서열 (서열 15) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 16), 도 14I: MB20-08의 아미노산

산 서열 (서열 17) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 18), 도 14J: MB20-10의 아미노산 서열 (서열 19) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 20), 도 14K: MB20-11의 아미노산 서열 (서열 21) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 22), 도 14L: MB20-14의 아미노산 서열 (서열 23) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 24), 도 14M: MB20-16의 아미노산 서열 (서열 25) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 26), 도 14N: MB20-18의 아미노산 서열 (서열 27) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 28) 서열. 5' PCR 프라이머와 중첩되는 서열은 두겹의 밑줄로 표시하였으며, 각 서열 (표 1) 중복에 중복되는 (redundant) 프라이머를 사용하였기 때문에 이것은 실제 DNA 서열과 다를 수 있다. V, D 및 J 서열 사이의 대략적인 연결부 경계는 서열에서 수직 막대 (1)로 표시하였다. 공지된 D 영역 DNA 서열에 상동성이라고 추정되는 서열은 1줄의 밑줄을 그었다. 낮은 빈도의 뉴클레오타이드는 연결부 경계에서의 뉴클레오타이드 부가이거나 또는 체세포 과다돌연변이(hypermuation)에 대한 잠재적 부위임을 지시한다.

[0076] 도 15는 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 및 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체의 중쇄 V_H-D-J_H 연결부 서열에 대한 아미노산 서열 정렬을 보여준다. 각 모노클로날 항체는 다른 모노클로날 항체 서열과의 상동성에 따라 그룹을 나누었다. 나타난 서열의 상대적 정렬 순서는 2B8 (리톡시맵) 모노클로날 항체 서열과의 관련성을 기초로 한 것이다. 중쇄 아미노산의 번호매김과 각 모노클로날 항체의 V, D 및 J 영역에 대한 코딩 서열의 기원 지정은 통상의 방법 (문헌 [Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. U. S. Government Printing Office, Bethesda, MD])에 따른 것으로서, 아미노산 위치 1 내지 94 및 CDR1 및 CDR2가 V_H 유전자에 의해 코딩된다. 점선은 각 모노클로날 항체의 아미노산 서열과 모든 모노클로날 항체에 대한 컨센서스 아미노산 서열 사이의 동일성을 나타낸다. 굵김선은 유사한 아미노산 서열들의 정렬을 최대화하기 위해서 서열 내에 삽입한 갭을 나타낸다. 서열 내의 갭은 명확성을 위해서 V_H 절편과 D 절편 사이에 도입되었다. CDR 영역에는 명확성을 위해서 박스 표시를 하였다.

[0077] 도 16은 도 11에 나타난 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 및 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체에 대하여 추정되는 모노클로날 항체 경쇄 VJ 서열의 아미노산 서열 비교를 보여준다. 데이터는 추정되는 모노클로날 항체 경쇄 V 및 J 서열의 UPGMA 트리로서 나타난 것이다. 수평 방향 트리 가지의 상대적 길이는 서열 관련성의 척도이다. 경쇄는 오른쪽에 나타난 것과 같이 서열 유사성을 기초로 하여 그룹을 나누었다 (A 내지 G).

[0078] 도 17A 내지 도 17N은 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체 (표 1)의 경쇄 V-J 서열에 대한 뉴클레오타이드 서열 및 예측되는 아미노산 서열을 보여준다. 5' PCR 프라이머와 중첩되는 서열은 두겹의 밑줄로 표시하였으며, 각 서열 (표 1) 중복에 중복되는 프라이머를 사용하였기 때문에 이것은 실제 DNA 서열과 다를 수 있다. 도 17A: HB20-01, HB20-02 및 HB20-06의 아미노산 서열 (서열 29) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 30), 도 17B: HB20-03의 아미노산 서열 (서열 31) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 32), 도 17C: HB20-04의 아미노산 서열 (서열 33) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 34), 도 17D: HB20-05의 아미노산 서열 (서열 35) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 36), 도 17E: HB20-25의 아미노산 서열 (서열 37) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 38), 도 17F: MB20-01의 아미노산 서열 (서열 39) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 40), 도 17G: MB20-02의 아미노산 서열 (서열 41) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 42), 도 17H: MB20-03의 아미노산 서열 (서열 43) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 44), 도 17I: MB20-07의 아미노산 서열 (서열 45) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 46), 도 17J: MB20-08의 아미노산 서열 (서열 47) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 48), 도 17K: MB20-10의 아미노산 서열 (서열 49) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 50), 도 17L: MB20-13의 아미노산 서열 (서열 51) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 52), 도 17M: MB20-14의 아미노산 서열 (서열 53) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 54), 도 17N: MB20-18의 아미노산 서열 (서열 55) 및 뉴클레오타이드 서열 (서열 56). 낮은 빈도의 뉴클레오타이드는 연결부 경계에서의 뉴클레오타이드 부가이거나 또는 체세포 과다돌연변이에 대한 잠재적 부위임을 지시한다. "N"은 서열 내의 뉴클레오타이드가 분명치 않아서 상응하는 아미노산이 알려져 있지 않음을 나타낸다.

[0079] 도 18은 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 및 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체 (표 1)의 경쇄 VJ 서열에 대한 아미노산 서열 정렬을 보여준다. 각 모노클로날 항체는 다른 모노클로날 항체 서열과의 상동성에 따라 그룹을 나누었다. 나타난 서열의 상대적 정렬 순서는 모든 항-CD20 모노클로날 항체에 대한 컨센서스 경쇄 서열과의 관련성을 기초로 한 것이다. 경쇄 아미노산의 번호매김과 각 모노클로날 항체의 V 및 J 영역에 대한 코딩 서열의 기원 지정은 통상의 방법 (문헌 [Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. U. S. Government Printing Office, Bethesda, MD])에 따른 것이다. 점선은 각 모노클로날 항체의 아미노산 서열과 모든 모노클로날 항체에 대한 컨센서스 아미노산 서열 사이의 동일성을 나타낸다. 굵김선은 유사한 아미노산 서열들의 정렬을 최대화하기 위해서 서열

내에 삽입한 갭을 나타낸다. 서열 내의 갭은 명확성을 위해서 V 절편과 J 절편 사이에 도입되었다. CDR 영역에는 명확성을 위해서 박스 표시를 하였다.

[0080] 도 19는 공지된 마우스 항-인간 CD20 모노클로날 항체 및 인간 CD20과 마우스 CD20에 반응성인 HB20 및 MB20 시리즈 모노클로날 항체에 대하여 추정되는 모노클로날 항체의 중쇄 서열 및 경쇄 서열의 UPGMA 분석을 도시한다. 중쇄의 V(D)J 및 경쇄의 (VJ) 서열을 연결하여 인접한 H + L 쇠 서열을 형성한 후에 서열 분석을 행하였다. 중쇄와 경쇄의 쌍은 오른쪽에 나타난 것과 같이 중쇄와 경쇄 사이의 서열 유사성 (도 13 및 도 16)을 기초로 하여 그룹을 나누었다.

[0081] 도 20A 및 도 20B는 B 세포의 세포 표면에 대한 항-CD20 모노클로날 항체의 결합 밀도가 항-CD20 모노클로날 항체-유도된 B 세포 고갈의 효과를 조절한다는 것을 보여준다. 세포 표면 CD20을 정상 밀도의 50%로 발현하는 이형접합성 CD20^{+/-} 마우스에서의 B 세포 고갈을 야생형 자손과의 비교를 통해 조사하였다. 양쪽 세트의 자손 모두에게 MB20-11 모노클로날 항체 (흑색 막대) 또는 이소형-매치된 대조군 모노클로날 항체 (백색 막대) (n ≥ 3 마리 마우스/군)를 10 μg 또는 250 μg씩 정맥내 처치하고, 제7일에 혈액 (1 ml 당) (도 20A) 및 비장 (전체) (도 20B)의 B220⁺ B 세포수를 유동 세포계측법으로 정량하였다. 수치는, MB20-11 모노클로날 항체로 처치된 마우스에 남아있는 B 세포를, 대조군 모노클로날 항체로 처치된 자손에서의 경우에 대한 비율(%)로서 표시한 평균 (±SEM) B 세포수를 대표한다. 각 군의 마우스에 대한 평균 결과 사이의 유의차는 *p < 0.05, **p < 0.01로 나타났다. MB20-11 모노클로날 항체는 250 μg으로 사용된 경우에 CD20^{+/-} 자손 및 야생형 자손에서 순환 B 세포 및 비장 B 세포를 효과적으로 제거하였다. 그러나, MB20-11 모노클로날 항체를 10 μg으로 사용한 경우, CD20^{+/-} 마우스에서는 B 세포의 일부 분획만이 고갈된 반면에 야생형 자손에서는 거의 대다수의 B 세포가 고갈되었다.

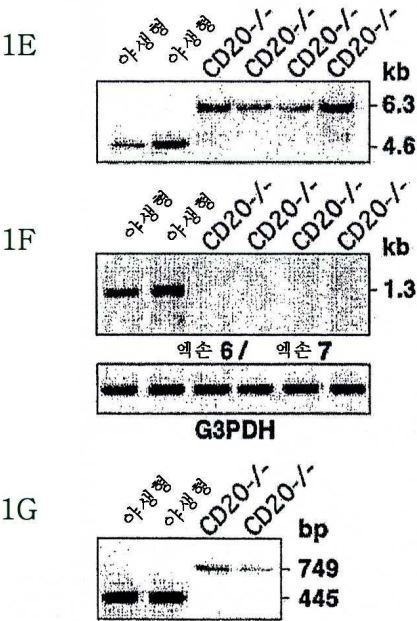
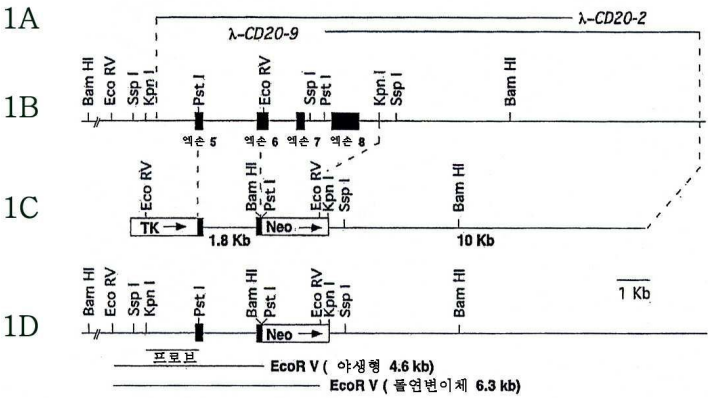
[0082] 도 21A 및 도 21B는 CD20에 대한 MB20-11 모노클로날 항체의 결합이 세포 표면 CD20 밀도를 증가시킨다는 것을 보여준다. 도 21A: MB20-11 모노클로날 항체의 결합 증가는 정제된 마우스 비장 B 세포를 도면에 나타난 시간 동안 이소형 대조군 모노클로날 항체 (C) 또는 MB20-11 모노클로날 항체 (10 μg/ml)와 함께 인큐베이션하였다가 형광색소 접합된 염소 항-마우스 IgG2a 2차 항체로 염색한 후에 유동 세포계측 분석법을 실시하는 간접적 면역형광 염색법으로 밝혀냈다. 제0시점의 경우에는 세포를 모노클로날 항체와 함께 30분 동안 병상에서 인큐베이션한 후에 세척하고 2차 항체로 염색한 것이다. 도 21B: 세포 표면 CD20에 대한 MB20-11 모노클로날 항체의 결합을 MB20-18 모노클로날 항체를 사용한 경우에서의 결과와 대표적인 시간 경과에 따라 비교한 것. 각 수치는 도 21A에 나타난 바와 같은 정제된 비장 B 세포의 형광 염색에 대한 평균 형광 채널수를 대표한다. 이들 결과는 3회 이상의 독립적인 실험으로 얻은 결과를 대표한다.

[0083] 도 22A 및 도 22B는 HB20-3, HB20-4 및 HB20-25 모노클로날 항체가 공지된 항-CD20 모노클로날 항체보다 세포 표면 CD20에 더 높은 밀도로 결합한다는 것을 보여준다. 인간 혈액 림프구 (도 22A) 및 라지 B 림프아구양 세포주 (도 22B)와 1F5, HB20-3 및 B1 항-CD20 모노클로날 항체 (실선) 또는 2차 항체 단독 (끊김선)과의 반응성을 보여준다. 항-CD20 모노클로날 항체는, 예비측정시에 포화되어 최적의 염색을 제공하는 것으로 측정되었던 하기 농도로 사용하였다: 1F5를 1:200으로 희석된 복수액으로 사용하거나, HB20-3을 HB20-3 하이브리도마로부터의 조직 배양 상등액으로 사용하거나, 또는 B1 모노클로날 항체를 정제된 모노클로날 항체 10 μg/ml 또는 조직 배양 상등액으로 사용함. 모든 경우에 있어서, 모노클로날 항체 염색은 PE-접합된 이소형-특이적 2차 항체를 사용하여 유동 세포계측 분석법으로 가시화하였다. 상기 결과는 3회 이상의 실험으로 얻은 결과를 대표한다.

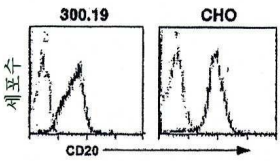
[0084] 도 23A 및 도 23B는 MB20-11 모노클로날 항체의 정맥내 (도 23A) 또는 피하 (s.c., 도 23B) 투여가 생체내 순환 B 세포 및 조직 B 세포를 효과적으로 고갈시킨다는 것을 보여준다. 야생형 마우스에게 도면에 나타난 투여량의 MB20-11 모노클로날 항체를 피하 또는 정맥내 처치하였다. 수치는 제7일에 유동 세포계측법으로 평가한 평균 (±SEM) 혈액 (1 ml 당) 또는 비장 (전체) B220⁺ B 세포수를 대표한다 (n ≥ 2). 각 군의 마우스에 대한 평균 결과 사이의 유의차는 *p < 0.05, **p < 0.01로 나타났다.

도면

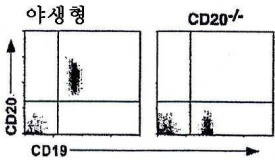
도면1



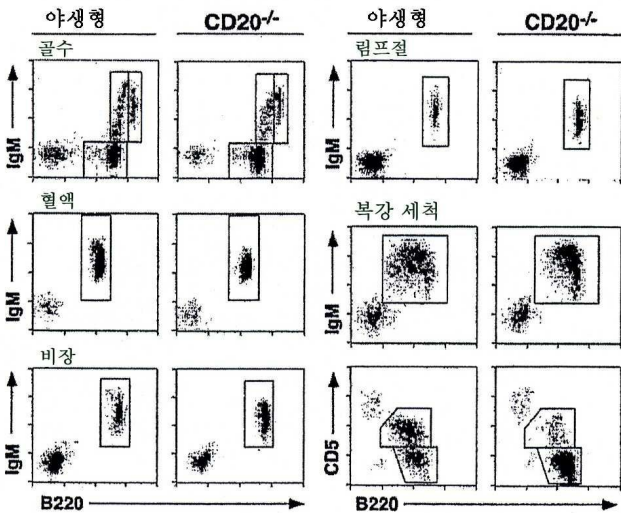
도면1B



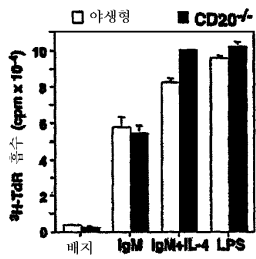
도면1I



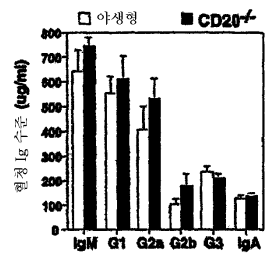
도면1J



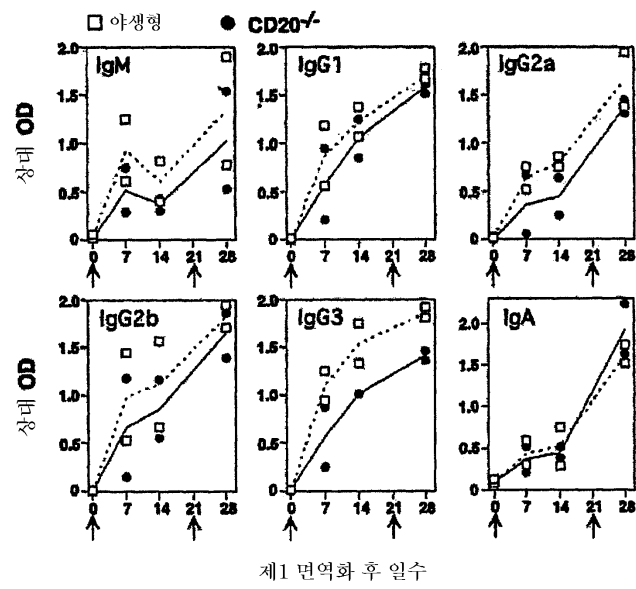
도면1K



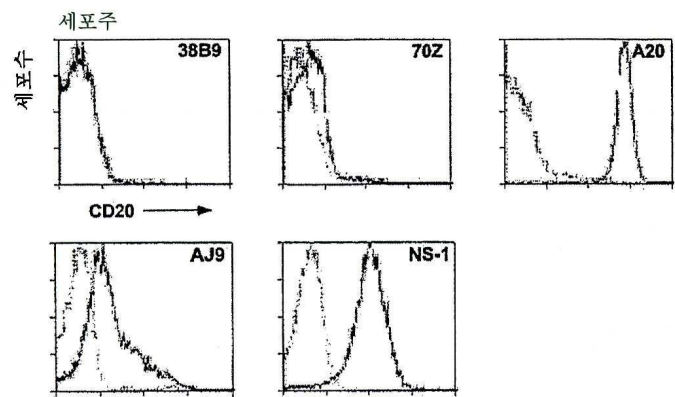
도면1L



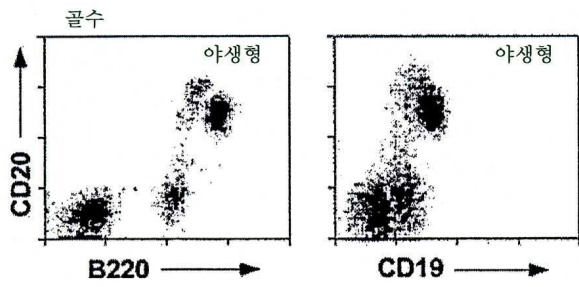
도면1M



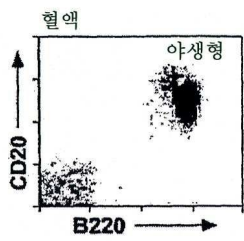
도면2A



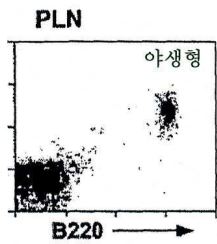
도면2B



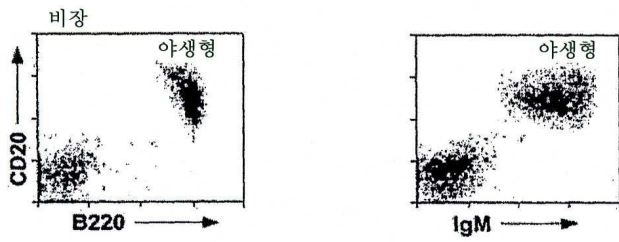
도면2C



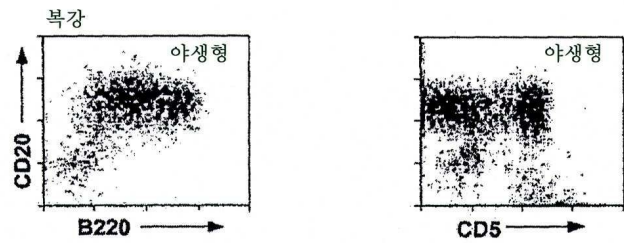
도면2D



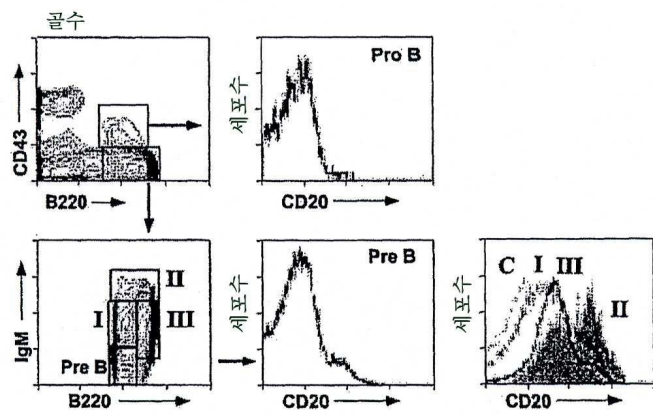
도면2E



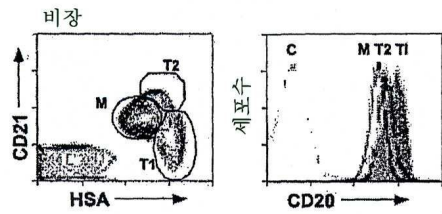
도면2F



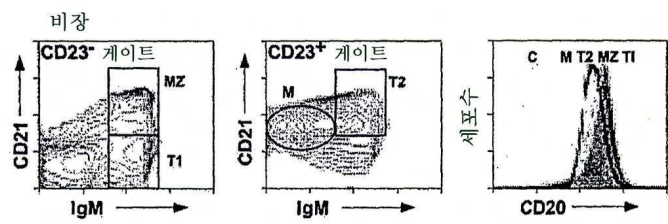
도면2G



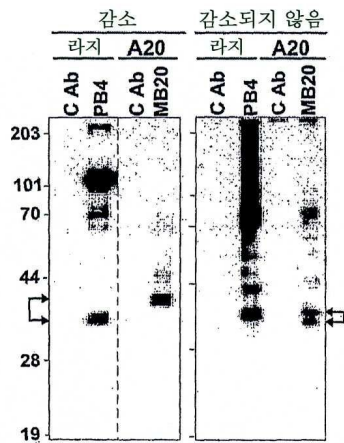
도면2H



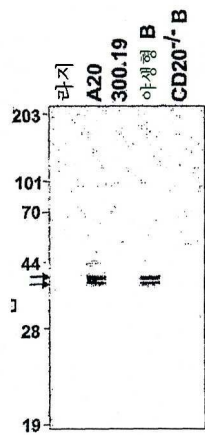
도면2I



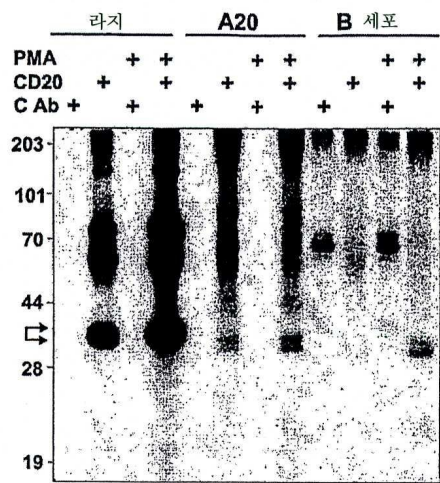
도면3A



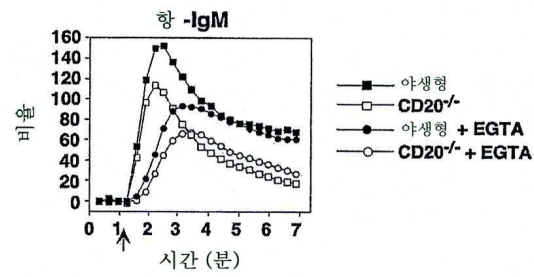
도면3B



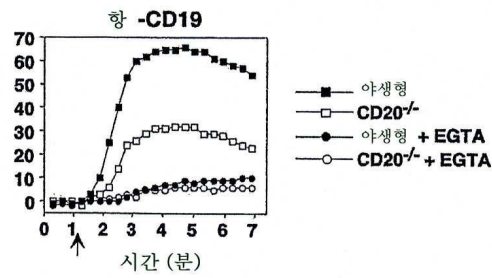
도면3C



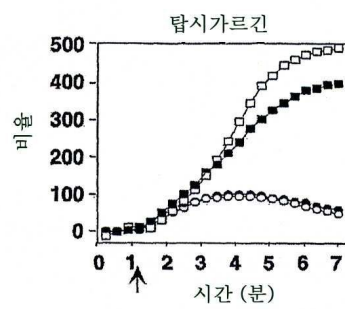
도면4A



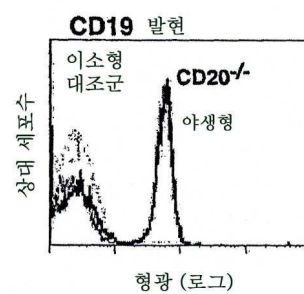
도면4B



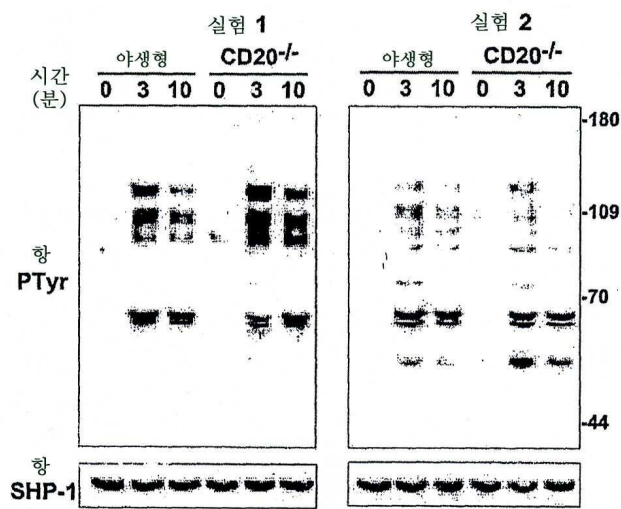
도면4C



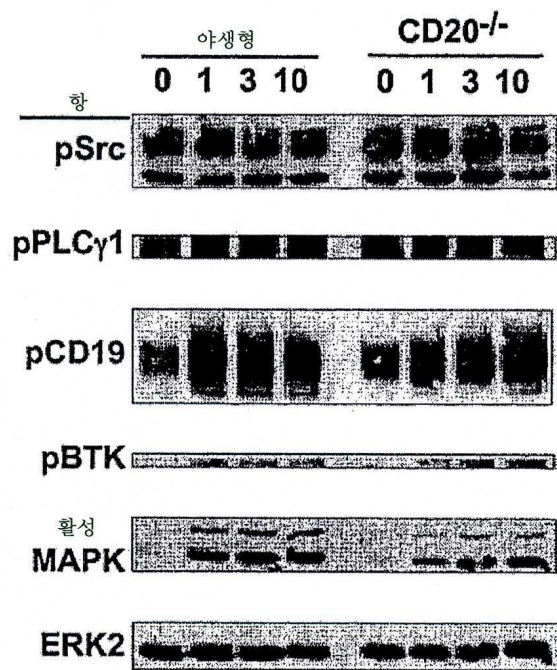
도면4D



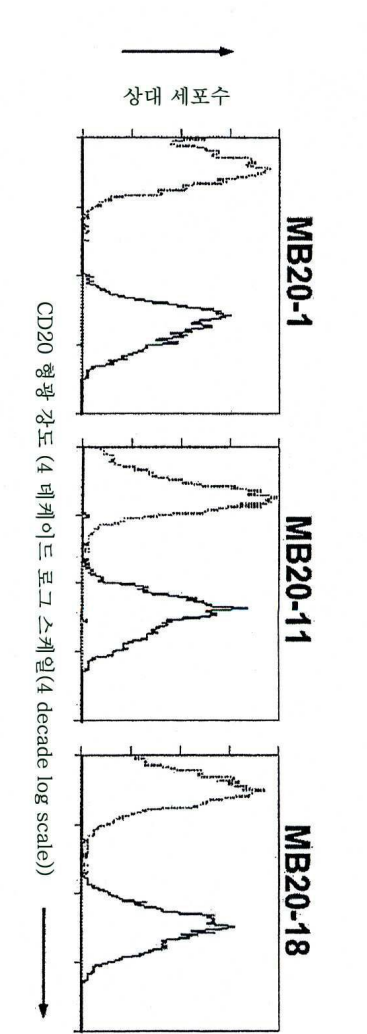
도면5A



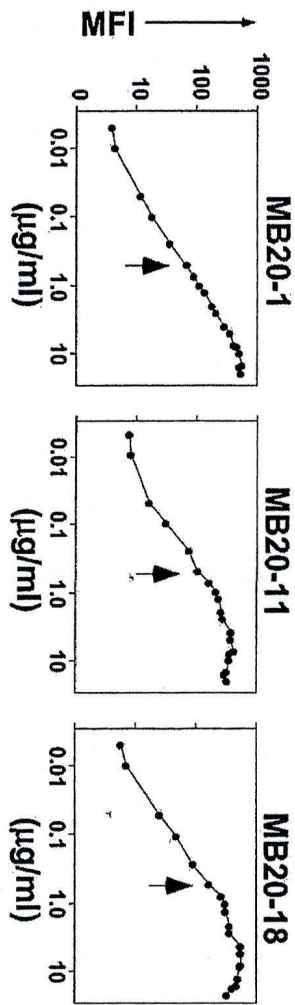
도면5B



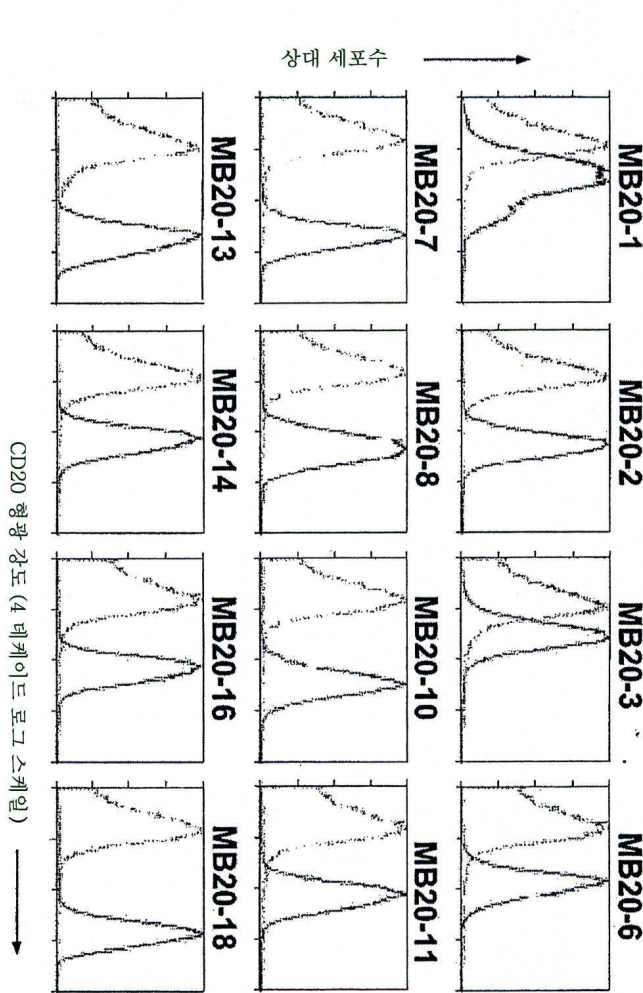
도면6A



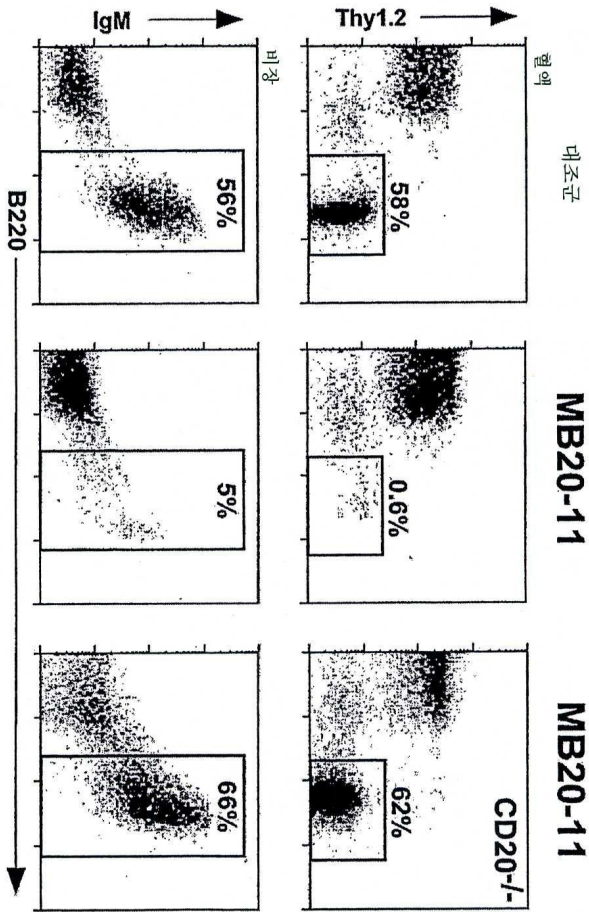
도면6B



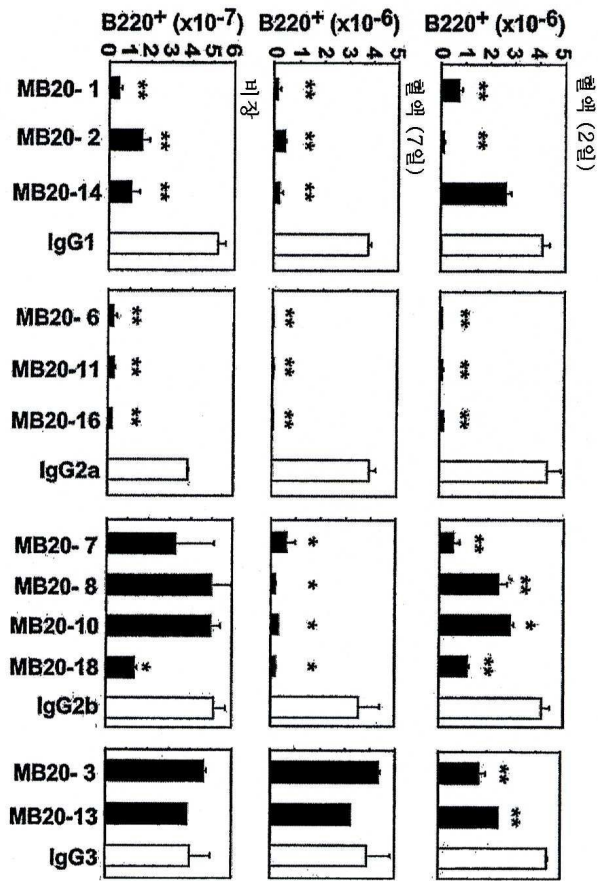
도면6C



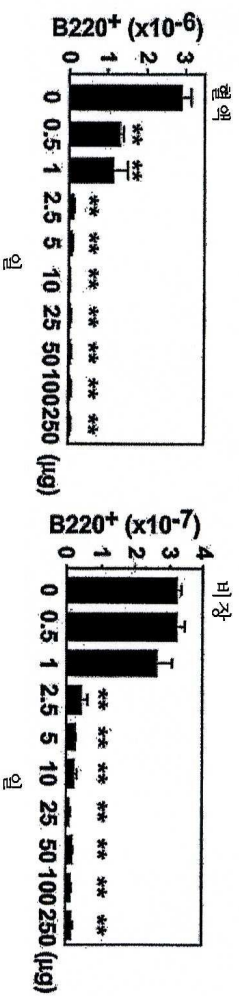
도면7A



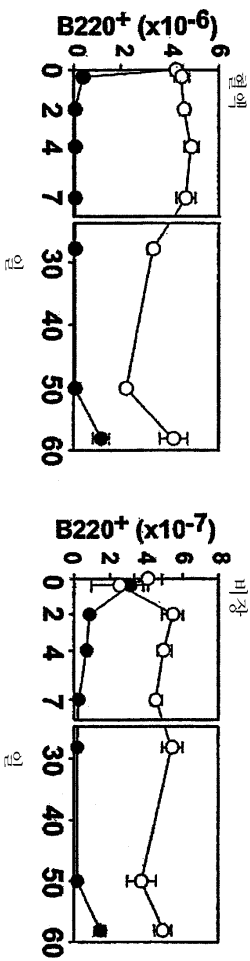
도면7B



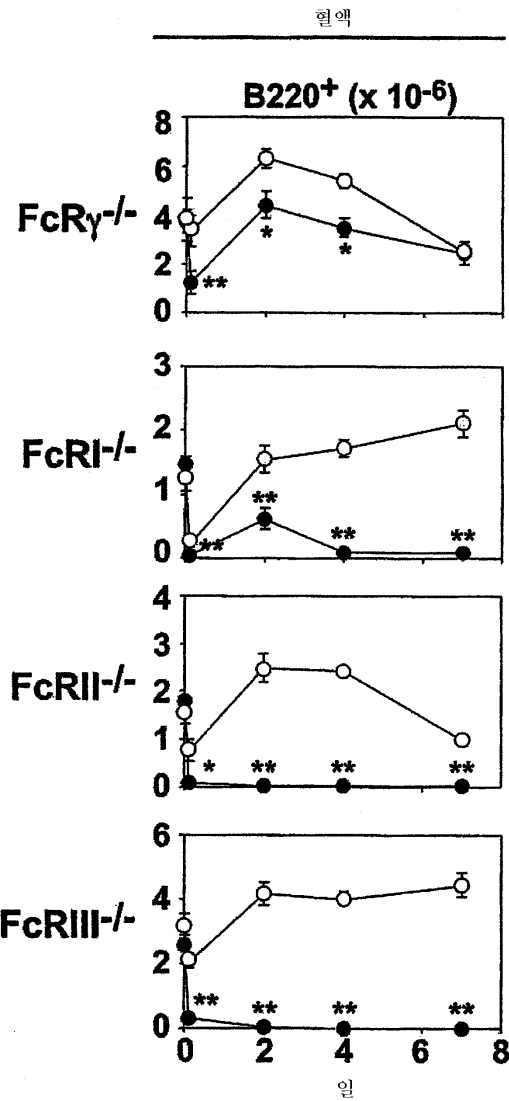
도면7C



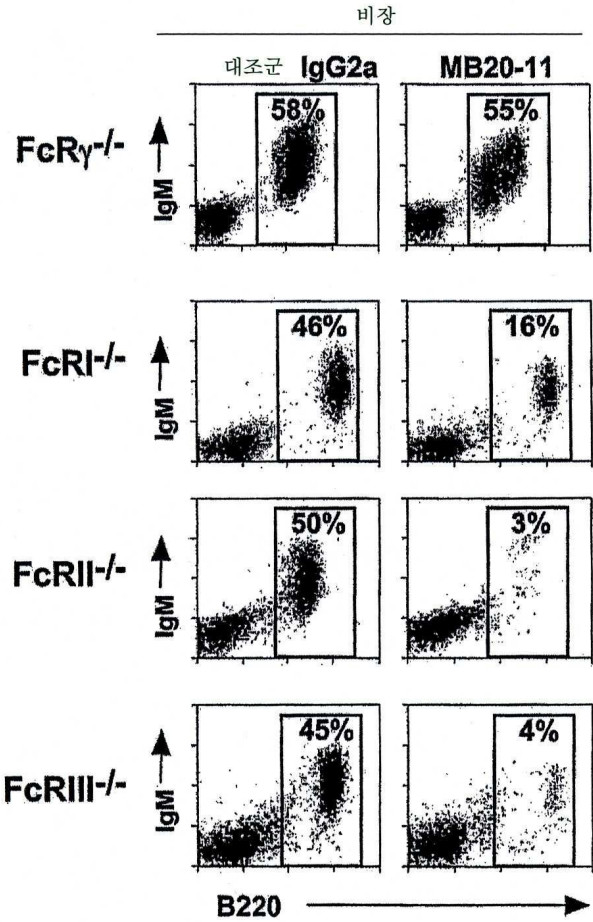
도면7D



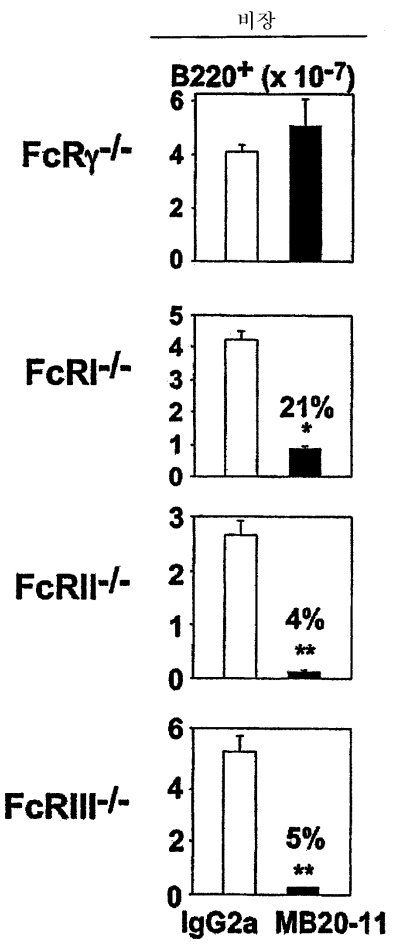
도면8A

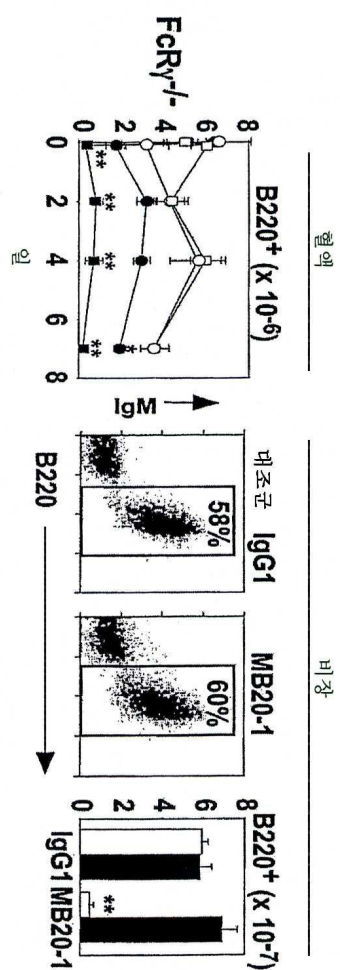


도면8B

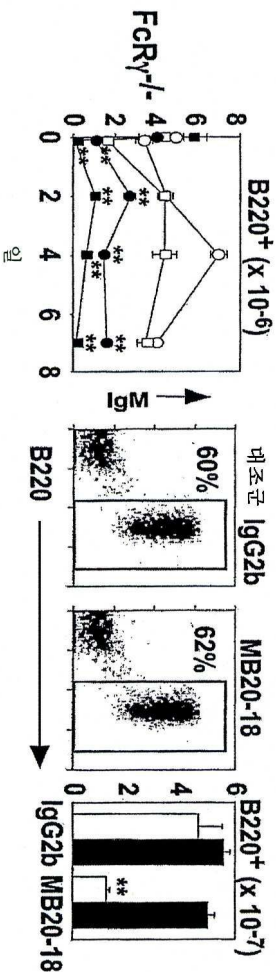


도면8C

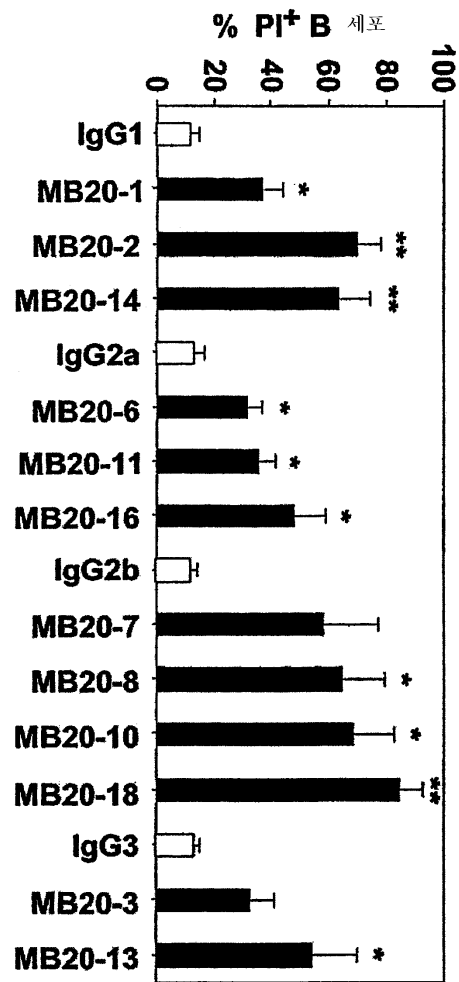


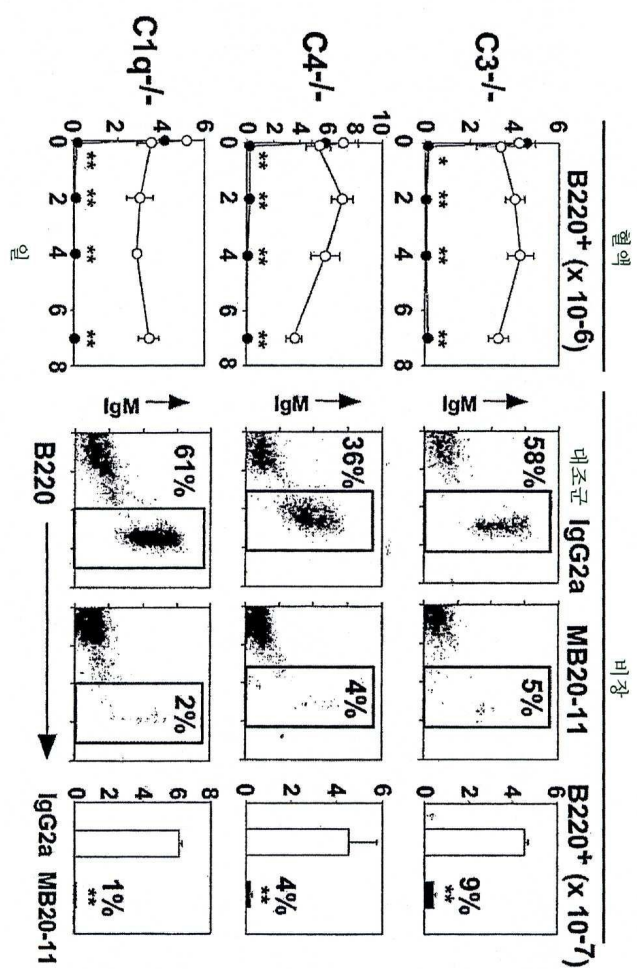


도면8E

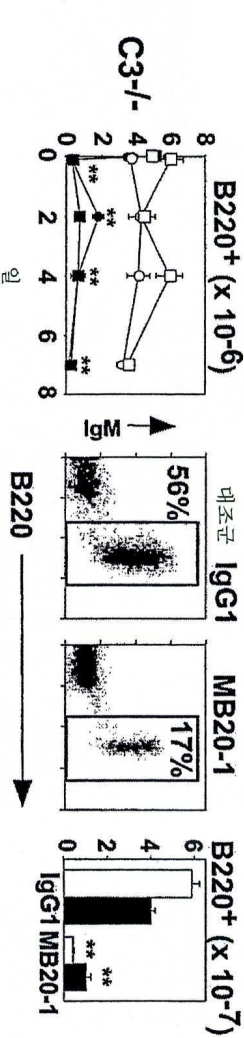


도면9A

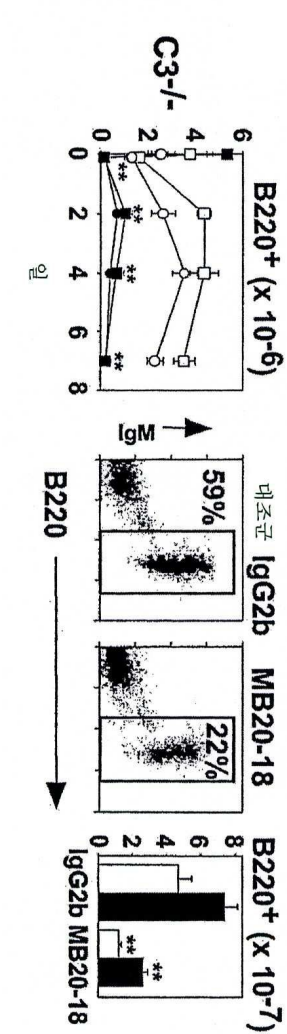




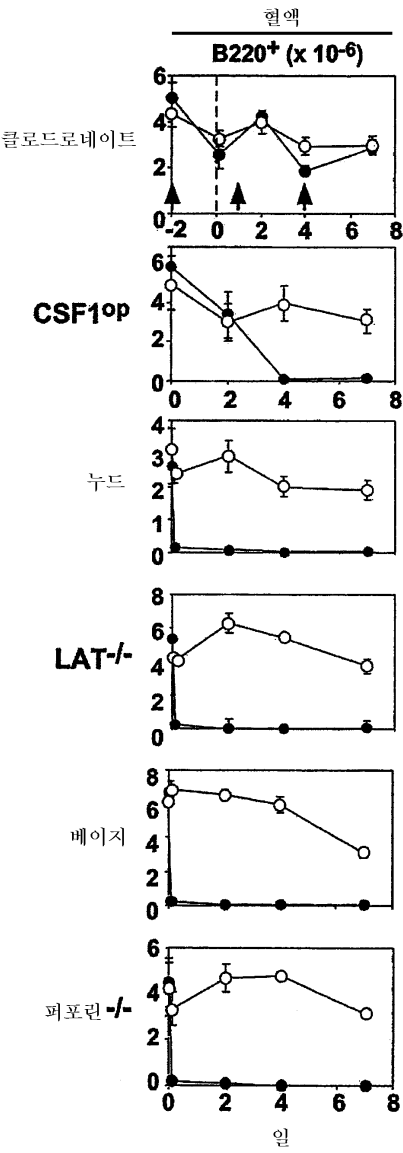
도면9C



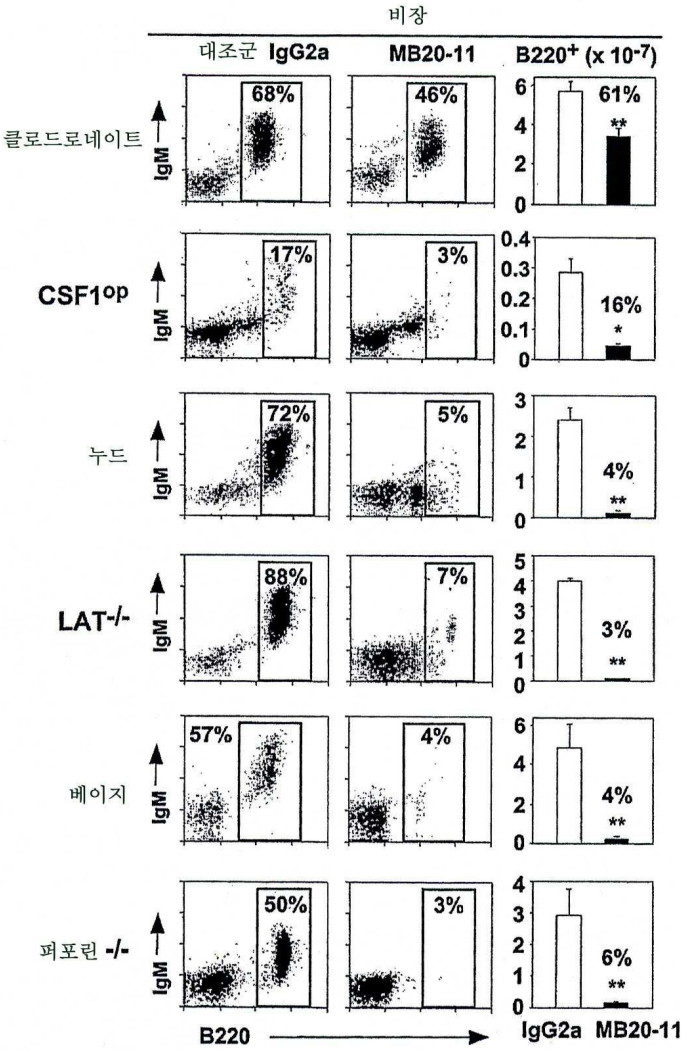
도면9D



도면10A



도면10B



도면11A

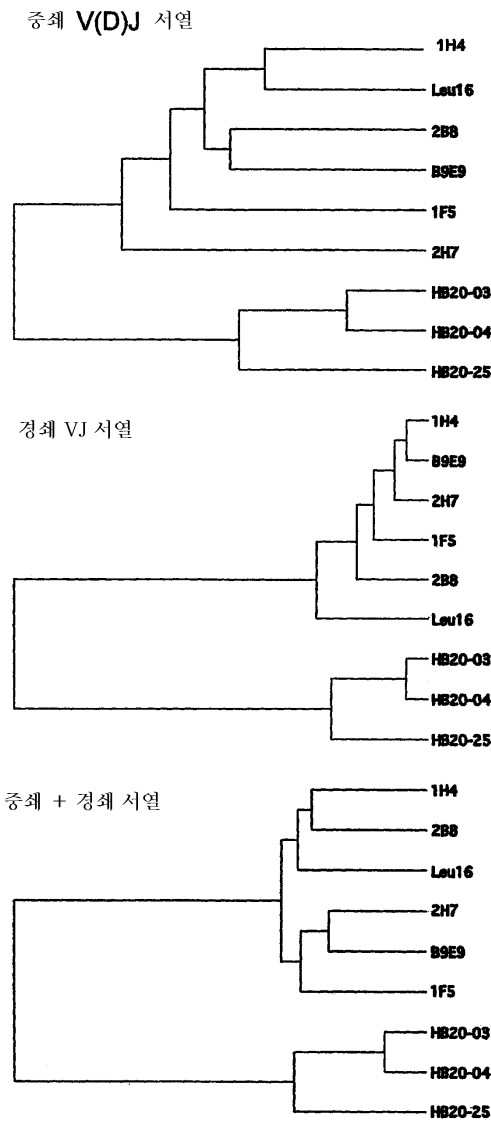
	1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	60	70	80	90	CDR3	
관개	QVQLQQ	GAE	LVEPQASVYM	SCKASGTTT	SYNMHIVKQT	PGQGLMTG	GLYPNGDTSY	NQFKKATL	TAKSSSTAY	MQLSLINSD	SAVTCAR	S	YI..YM.F-DYMGATTV	VS.
2B8		P.....				R.....							T..QG-D.Y..N.....	A
1F5		R.P.....											H.GSN-VDYF.Y.Q..L...	S
1H4		AZ..S.....	R.....										IV..SNS..Y..T.....	S
2H7		V.S.....				R.....							MQLRPN..Y.....	-
B9B9		E.....											N..GSS..F.....	-
1au-16														..S

V_H 서열

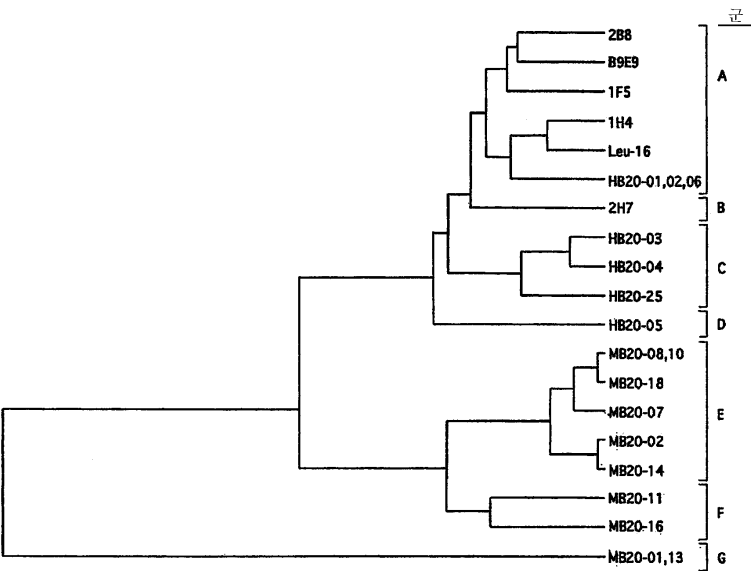
D 서열

J 서열

도면12



도면13



도면14A

1 10 20
E V Q L Q E S G A E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG 60

21 30 40
S C K A S G Y T F T S Y N M H W V K K T
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAG AAG ACA 120

41 50 60
P G Q G L E W I G A I Y P G N G D T S Y
CCT GGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC 180

61 70 80
N Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y
AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240

81 90 100
M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R W
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT ACA AGA TGG GAT 300

101 110 120
Y Y G S S Y V G F F D Y W G Q G T T L T
TAC TAC GGT AGT AGC TAC GTT Ggg Ttt TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA 360

121
V S S (시열: 1)
GTC TCC TCA 369 (시열: 2)

도면14B

```

1      10      20
E V Q L Q E S G A E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG 60

21      30      40
S C K A S G F T F T N Y N M H W L K Q T
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TTC ACA TTT ACC AAT TAC AAT ATG CAC TGG TTA AAG CAG ACG 120

41      50      60
P G Q G L E W I G A I Y P E N G D T S Y
CCT GGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GAA AAT GGT GAT ACT TCC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T A D K A S S T A Y
AAT CAG AAA TTT AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA GCC TCC AGC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M H L S S L T S E D S A V Y F C A R F Y
ATG CAC CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA TTT TAT 300

101      110      120
Y Y G S Y Y G A M D Y W G Q G T S V T V
TAC TAC GGT AGT TAT TAC ggT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC 360

121
S S (서열: 3)
TCC TCA 366 (서열: 4)

```

도면14C

```

1      10      20
E V Q L Q E S G A E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG 60

21      30      40
S C K A S G F T F T N Y N M H W V K Q T
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TTC ACA TTT ACC AAT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAG CAG ACG 120

41      50      60
P G Q G L E W I G A I Y P E N G D T S Y
CCT GGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GAA AAT GGT GAT ACT TCC TAC 180

61      70      80
N Q R F K G K A T L T A D K S S S T A Y
AAT CAG AGG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M H L S S L T S E D T A V Y F C A R F Y
ATG CAC CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA TTT TAT 300

101      110      120
Y Y G S Y Y G A L D Y W G Q G T S V T V
TAT TAC GGT AGT TAT TAC ggT GCT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC 360

121
S S (서열: 5)
TCC TCA 366 (서열: 6)

```

도면14D

```

1      10      20
E V Q L Q E S G A E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG 60

21      30      40
S C K A S G Y T F I S Y N M H W V K Q K
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ATT AGT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAG CAG AAA 120

41      50      60
P G Q G L E W I G A I Y P G N G D T S Y
CCT GGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T R D K S S S T A Y
AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R W D
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TGG GAT 300

101      110      120
Y Y G S S Y V G F L T T G A K A P L V T
TAC TAC GGT AGT AGC TAC GTT ggg ttt TTG ACT ACT GGG GCC AAG GCA CCA CTC GTC ACA 360

121
V S S (서열: 7)
GTC TCC TCA 369 (서열: 8)

```

도면14E

```

1      10      20
E V Q L Q E S G A E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG 60

21      30      40
S C K A S G F R F T N Y N L H W V K Q T
TCC TGC AAG GCT TCT GGC TTC AGA TTT ACC AAT TAC AAT TTG CAC TGG GTA AAA CAG ACA 120

41      50      60
P G Q G L E W I G A I Y P G N G E T S Y
CCT GGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GGA AAT GGT GAA ACT TCC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y
AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGT ACA GCC TAC 240

81      90      100
M Q L R S L T S G D S A V Y Y C A R F Y
ATG CAG CTC AGA AGC CTG ACA TCT GGG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TTT TAT 300

101      110      120
Y Y G S S Y Y G A M D Y W G Q G T S V T V
TAC TAC GGT AGT A gc TAC ggt GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC 360

121
S S (서열: 9)
TCC TCA 366 (서열: 10)

```

도면14F

```

1      10      20
E V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L K L
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60

21      30      40
S C A A S G F T F S D Y G M A W V R Q A
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT GAC TAC GGA ATG GCG TGG GTT CGA CAG GCT 120

41      50      60
P R K G P E W V A F I S N L A Y S I Y Y
CCA AGG AAG GGG CCT GAG TGG GTA GCA TTC ATT AGT AAT TTG GCA TAT AGT ATC TAC TAT 180

61      70      80
A D T V T G R F T I S R E N A K N T L Y
GCA GAC ACT GTG ACG GGC CGA TTC ACC ATC TCT AGA GAG AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC 240

81      90      100
L E M S S L R S E D T A M Y F C T R T G
CTG GAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TTC TGT ACA AGA ACT G 99 300

101      110
Y Y A L D Y W G Q G T S V T V S S (서열: 11)
TAT TAT GCT TGT GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 351 (서열: 12)

```

도면14G

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA 60

21      30      40
S C K A S G Y M F T D Y Y I K W V K Q S
TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ATG TTC ACT GAC TAC TAT ATA AAG TGG GTG AAG CAG AGC 120

41      50      60
H G K S L E W I G D I N P N N G D T I Y
CAT GGA AAG AGT CTT GAG TGG ATT GGA GAT ATT AAT CCT AAT AAT GGT GAT ACT ATC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T V D K S S N T A Y
AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AAC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M D L R S L T S E D S A V Y Y C A R E R
ATG GAC CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA G ag CGG 300

101      110
F A Y W G Q G T L V T V S A (서열: 13)
TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342 (서열: 14)

```

도면14H

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P D L V K P G A S V K I
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA 60

21      30      40
S C K A S G Y M F T D Y Y M K W V K Q S
TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ATG TTC ACT GAC TAC TAC ATG AAG TGG GTG AAG CAG AGC 120

41      50      60
H G K S L E W I G D I N P N N G D T T Y
CAT GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATA GGG GAT ATT AAT CCT AAC AAT GGT GAT ACT ACC TAC 180

61      70      80
N Q K F E G K A T L T V D K S S S T A Y
AAC CAG AAG TTC GAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACG GCC TAC 240

81      90      100
M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R E R
ATG GAG CTT CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA G aa CGG 300

101      110
F A Y W G Q G T L V T V S A (서열: 15)
TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342 (서열: 16)

```

도면14I

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P D L V K P G A S V K I
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAC CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA 60

21      30      40
S C K A S G Y T F T D Y Y M K W V K Q S
TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ACG TTC ACT GAC TAC TAC ATG AAG TGG GTG AAG CAG AGC 120

41      50      60
H G K S L D W I G D I N P N N G D I I Y
CAT GGA AAG AGC CTT GAC TGG ATA GGG GAT ATT AAT CCT AAC AAT GGT GAT ATT ATT TAC 180

61      70      80
N Q K F E G K A T L T V D K S S S T A Y
AAC CAG AAG TTC GAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACG GCC TAC 240

81      90      100
M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R | E R
ATG GAG CTT CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA |G|aa cGG 300

101      110
F A Y W G Q G T L V T V S A ( 서열: 17 )
TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342 ( 서열: 18 )

```

도면14J

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P D L V K P G A S V K I
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAC CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA 60

21      30      40
S C K A S G Y T F T D Y Y M K W V K Q S
TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ACG TTC ACT GAC TAC TAC ATG AAG TGG GTG AAG CAG AGC 120

41      50      60
H G K S L D W I G D I N P N N G D I I Y
CAT GGA AAG AGC CTT GAC TGG ATA GGG GAT ATT AAT CCT AAC AAT GGT GAT ATT ATT TAC 180

61      70      80
N Q K F E G K A T L T V D K S S S T A Y
AAC CAG AAG TTC GAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTG GAC AAG TCC TCC AGC ACG GCC TAC 240

81      90      100
M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R | E R
ATG GAG CTT CGT AGT CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA |G|aa cGG 300

101      110
F A Y W G Q G T L V T V S A ( 서열: 19 )
TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342 ( 서열: 20 )

```

도면14K

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG 60

21      30      40
S C K A S G Y K I T D Y N M H W V K Q S
TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAT AAA ATC ACT GAC TAC AAC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGT 120

41      50      60
H G K S L E W I G Y I A P Y N G G T T Y
CAT GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATT GCC CCT TAC AAT GGT GGT ACT ACC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T V N K S S S T A Y
AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA AAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAT 240

81      90      100
M E L R S L T S E D S A V Y Y C A G A L
ATG GAG CTC CGC AGT CTG ACA TCG GAG GAT TCT GCA GTC TAT TAT TGT GCA GGT GCT TGT 300

101      110
D Y W G Q G T S V T V S S (서열: 21 )
GAC TAT TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCT 339 (서열: 22 )

```

도면14L

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K I
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA 60

21      30      40
S C K A S G Y M F T D Y Y I K W V K Q S
TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ATG TTC ACT GAC TAC TAT ATA AAG TGG GTG AAG CAG AGT 120

41      50      60
H G K S L E W I G D I N P N N G D T I Y
CAT GGA AAG AGT CTT GAG TGG ATT GGA GAT ATT AAT CCT AAT AAT GGT GAT ACT ATC TAC 180

61      70      80
N Q K F K G K A T L T V D K S S N T A Y
AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AAC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M D L R I L T S E D S A V Y Y C A R E R
ATG GAG CTC CGC ATC CTG ACA TCA GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GAG CAG 300

101      110
F A Y W G Q G T L V T V S A (서열: 23 )
TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 342 (서열: 24 )

```

도면14M

```

1      10      20
E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M
GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAA ATG 60

21      30      40
S C K A S G Y T F T D Y N L H W V K Q S
TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAC AAC TTG CAC TGG GTG AAG CAG AGC 120

41      50      60
H G Q S L E W I G Y I N P N N G G A T Y
CAT GGA CAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT ATT AAC CCT AAC AAT GGT GGT GCT ACA TAC 180

61      70      80
N Q K F T G K A T L T V N R S S S T A Y
AAT CAG AAG TTC ACT GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA AAC AGG TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240

81      90      100
M E L R S L T S D D S A V Y Y C A E I Y
ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCG GAC GAT TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA GAA ATC TAT 300

101      110
D G Y Y W G Q G T T L T V S S (서열: 25 )
GAT ggt tAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 345 (서열: 26 )

```

도면14N

1

E

V

Q

L

Q

E

S

G

L

D

L

V

K

P

G

A

S

V

K

I

20

GAG

GTG

CAG

CTG

CAG

GAG

TCT

GGA

CTT

GAC

CTG

GTG

AAG

CCT

GGG

GCT

TCA

GTG

AAG

ATA

60

21

S

C

K

A

S

G

Y

T

F

T

D

Y

Y

M

K

W

V

K

Q

S

40

TCC

TGT

AAG

GCT

TCT

GGA

TAC

ACG

TTC

ACT

GAC

TAC

TAC

ATG

AAG

TGG

GTG

AAA

CAG

AGC

120

41

H

G

K

S

L

D

W

I

G

D

I

N

P

N

N

G

D

I

I

Y

60

CAT

GGA

AAG

AGC

CIT

GAC

TGG

ATA

GGG

GAT

ATT

AAT

CCT

AAC

AAT

GGT

GAT

ATT

ATT

TAC

180

61

N

Q

K

F

E

G

K

A

T

L

T

V

D

K

S

S

S

T

A

Y

80

AAC

CAG

AAG

TTC

GAG

GGC

AAG

GCC

ACA

TTG

ACT

GTA

GAC

AAG

TCC

TCC

AGC

ACG

GCC

TAC

240

81

M

E

L

R

S

L

T

S

E

D

S

A

V

Y

Y

C

A

R

G

E

R

100

ATG

GAG

CTT

CGC

AGC

CTG

ACA

TCT

GAG

GAC

TCT

GCA

GTC

TAT

TAC

TGT

GCA

AGA

G

aa

cGG

300

101

F

A

Y

W

G

Q

G

T

L

V

T

V

S

A

342

(서열: 27)

TTT

GCT

TAC

TGG

GGC

CAA

GGG

ACT

CTG

GTC

ACT

GTC

TCT

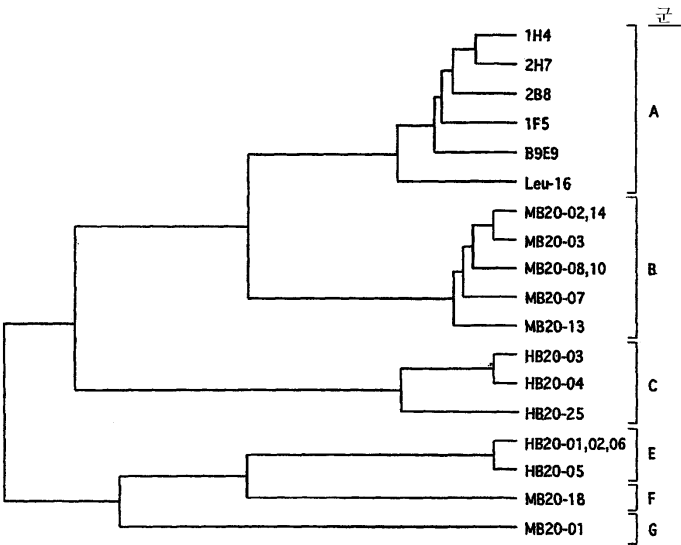
GCA

342

(서열: 28)

	1	10	20	CDR1	40	50	CDR2	60	70	80	90	CDR3																		
관세기스	EVOLOS	GAEI	VPGQ	VPNS	CSKAS	GTYT	STYH	AVYQ	TPGQ	GLBWT	QAT	LYD	KSS	STYV	WOL	SLS	IS	ED	AVY	FC	AR	Y	GS	...	F	DW	Q	TY	W	NS
288	Q...	OP	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1P5	Q...	ROP	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
89S9	Q...	VO	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
14w-16	Q...	Q	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1H4	Q...	OP	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-1, 2, 6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
2H7	QAY	Q...	R	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-03	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-04	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-25	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-05	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-08, 10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-07	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-02	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
HB20-01, 13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

도면16



도면17A

1 10 20
M G I K M E S Q T Q V F V Y M L L W L S
ATG GGC ATC AAG ATG GAG TCA CAG ACC CAG GTC TTT GTA TAC ATG TTG CTG TGG TTG TCT 60

21 30 40
G V D G D I V M T Q S Q K F M S T S V G
GGT GTT GAT GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCA ACA TCA GTT GGA 120

41 50 60
D R V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y
GAC AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT 180

61 70 80
Q Q K L G Q S P K P L I Y S A S Y R N S
CAA CAG AAA CTA GGG CAA TCT CCT AAA CCA CTG ATT TAT TCG GCA TCC TAC CGG AAC AGT 240

81 90 100
G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 300

101 110 120
N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S S P F
AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA TAT AAC AGT TCT CCA TTC 360

121 130
T F G S G T K L E I K R A D A A P T V (서열: 29)
ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 419
(서열: 30)

도면17B

```

1      10      20
M W G S V F N F S I V G A R C D I Q M T
ATG TGG GGA TCT GTT TTC AAT TTT TCA ATT GTA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT 60

21      30      40
Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A
CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT GCA TCT GTG GGG GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA 120

41      50      60
S G N I H N Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q
AGT GGG AAT ATT CAC AAT TAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA TCT CCT CAA 180

61      70      80
L L V Y N A K T L A D G V P S R F S G S
CTC CTG GTC TAT AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGT GTG CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT 240

81      90      100
G S G T Q F S L K I N S L Q P E D F G S
GGA TCA GGA ACA CAA TTT TCT CTC AAG ATC AAC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GGG AGT 300

101     110     120
Y Y C Q H F W S T P W T F G G G T K L E
TAT TAC TGT CAA CAT TTT TGG AGT ACG CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA 360

121     130
I K R A D A A P T V (서열: 31)
ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 392 (서열: 32)

```

도면17C

```

1      10      20
M W G S V F N F S I V G A R C D I Q M T
ATG TGG GGA TCT GTT TTC AAT TTT TCA ATT GTA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT 60

21      30      40
Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A
CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT GCA TCT GTG GGG GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA 120

41      50      60
S G S I H N Y L A W Y Q Q K L G K S P Q
AGT GGG AGT ATT CAC AAT TAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CTG GGA AAA TCT CCT CAA 180

61      70      80
L L V Y N A K T L A D G V P S R F S G S
CTC CTG GTC TAT AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGT GTG CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT 240

81      90      100
G S G T Q F S L K I N S L Q P E D F G S
GGA TCA GGA ACA CAA TTT TCT CTC AAG ATC AAC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GGG AGT 300

101     110     120
Y Y C Q H F W S I P W T F G G G T K L E
TAT TAC TGT CAA CAT TTT TGG AGT ATT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA 360

121     130
I K R A D A A P T V (서열: 33)
ATC AAG CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 392 (서열: 34)

```

도면17D

```

1      10      20
M G I K M E S Q T Q V F V Y M L L W L S
ATG GGC ATC AAG ATG GAG TCA CAG ACC CAG GTC TTT GTA TAC ATG TTG CTG TGG TTG TCT 60

21      30      40
G V D G D I V M T Q S Q K F M S T S V G
GGT GTT GAT GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA 120

41      50      60
D R V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y
GAC AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT 180

61      70      80
Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S
CAA CAG AAA CCA GGG CAA TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TAC CGG TAC AGT 240

81      90      100
G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC 300

101      110      120
N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S S P F
AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA TAT AAC AGC TCT CCA TTC 360

121      130
T F G S G T K L E I K R A D A A P T V (서열: 35)
ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 419
(서열: 36)

```

도면17E

```

1      10      20
M W G S V F N F S I V D A R C D I Q M T
ATG TGG GGA TCT GTT TTC AAT TTT TCA ATT GTA GAT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT 60

21      30      40
Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A
CAG TCT CCA GCC TCC CTG TCT GTA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA 120

41      50      60
S E N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q
AGT GAA AAT ATT TAC AGT AAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA TCT CCT CAG 180

61      70      80
L L V Y A A T N L A D G V P S R F S G S
CTC CTG GTC TAT GCT GCA ACA AAC TTA GCA GAT GGT GTG CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT 240

81      90      100
G S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G S
GGA TCA GGC ACA CAG TAT TCC CTC AAG ATC AAC AGC CTG CAG TCT GAA GAT TTT GGG AGT 300

101      110      120
Y Y C Q H F W G I P W T F G G G T K L E
TAT TAC TGT CAA CAT TTT TGG GGT ATT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA 360

121      130
I K R A D A A P T V (서열: 37)
ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 392 (서열: 38)

```

도면17F

```

1      10      20
M G I K M E S Q T Q V F L S L L L W V S
ATG GGC ATC AAG ATG GAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC CTC TCC CTG CTG CTC TGG GTA TCT 60

21      30      40
G T C G N I M M T Q S P S S L A V S A G
GGT ACC TGT GGG AAC ATT ATG ATG ACA CAG TCG CCA TCA TCT CTG GCT GTG TCT GCA GGA 120

41      50      60
E K V T M R C K S S Q S V L Y S S K R K
GAA AAG GTC ACT ATG AGA TGT ARG TCC AGT CAG AGT GTT TTA TAT AGT TCA AAG CGG AAG 180

61      80      90
N Y L A W Y Q Q K P G K S P T L L I Y W
AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAG TCT CCT ACA TTA TTG ATC TAT TGG 240

81      110      120
A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D
GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT 300

101     140     150
F T L T I T S V Q A E D L A V Y Y C H Q
TTT ACT CTT ACC ATC ACC AGT GTA CAA GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAT CAA 360

121     170     180
Y L S S F T F G G T K L E I K R A D A
TAC CTC TCC TCG TTC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT 420

141
A P T V ( 서열: 39 )
GCA CCA ACT GTA 432 ( 서열: 40 )

```

도면17G

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V I V S
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA GTG TCT 60

21      30      40
N G E I V L T Q S P T T M A A S P G E K
AAT GGA GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG AAG 120

41      50      60
I T I T C S V S S S I R S N Y L H W Y Q
ATC ACT ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA AGG TCC AAT TAT TTA CAT TGG TAT CAG 180

61      70      80
Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S G
CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA 240

81      90      100
V P A R F S G S G S G T S Y S L T V A T
GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA GTT GCC ACC 300

101     110     120
M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P L T
ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG CTC ACG 360

121     130
F G A G T K L E L K R A D A A P T V ( 서열: 41 )
TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 416
( 서열: 42 )

```

도면17H

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V I V ?
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA GTG TNT 60

21      30      40
N G E R I V L T Q S P T T M A A S P G E K
AAT GSA GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGS GAG AAG 120

41      50      60
I T I T C S A S S S I S S N Y L H W Y Q
ATC ACT ATC ACA TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT TAT TTG CAT TGG TAT CAG 180

61      70      80
Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S G
CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAC AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA 240

81      90      100
V P A R F S G S G S G T S Y T L T V A T
GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC ACT CTC ACA GTC GCC ACC 300

101      110      120
M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P L T
ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG CTC ACG 360

121      130
F G A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 43)
TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 416
(서열 44)

```

도면17I

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V S N G
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTG TCT AAT GGA 60

21      30      40
E L V L T Q S P T T K A A S P G E K I T
GAA CTT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC AAG GCT GCA TCT CCC GGS GAG AAG ATC ACT 120

41      50      60
I T C S V S S S I R S N Y L H W Y Q Q R
ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA CGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT CAG CAG AGG 180

61      70      80
P G F S P K L L I Y R T S N L A S G V P
CCA GGA TTC TCC CCT AAG CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA GTC CCA 240

81      90      100
A R F S G S G S G T S Y S L T I G T M E
GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC ATG GAG 300

101      110      120
A E D V A T Y Y C Q Q G S S L P L T F G
GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT TTA CCG CTC ACG TTC GGT 360

121      130
A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 45)
GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 410 (서열 46)

```

도면17J

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V S N G
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTG TCT AAT GGA 60

21      30      40
E I V L T Q S P T T M A A S P G E K I T
GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG AAG ATC ACT 120

41      50      60
I T C S V S S N I R S N Y L H W Y Q Q K
ATC ACC TGT AGT GTC AGT TCA AAT ATA CGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT CAG CAG AAG 180

61      70      80
P G F S P K L L I Y R T S N L A S G V P
CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA GTC CCA 240

81      90      100
A R F S G S G S G T S Y S L T I G T M K
GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC ATG AAG 300

101      110      120
A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P L T F G
GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG CTC ACG TTC GGT 360

121      130
A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 47)
GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 410 (서열 48)

```

도면17K

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V S N G
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTG TCT AAT GGA 60

21      30      40
E I V L T Q S P T T M A A S P G E K I T
GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG AAG ATC ACT 120

41      50      60
I T C S V S S N I R S N Y L H W Y Q Q K
ATC ACC TGT AGT GTC AGT TCA AAT ATC CGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT CAG CAG AAG 180

61      70      80
P G F S P K L L I Y R T S N L A S G V P
CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA GTC CCA 240

81      90      100
A R F S G S G S G T S Y S L T I G T M K
GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC ATG AAG 300

101      110      120
A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P L T F G
GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG CTC ACG TTC GGT 360

121      130
A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 49)
GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 410 (서열 50)

```

도면17L

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V I V S
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA GTG TCT 60

21      30      40
N G E I V L A Q S P T T T A A S P G E K
AAT GGA GAA ATT GTG CTC GCC CAG TCT CCA ACC ACC ACG GCT GCA TCT CCC GGG GAG AAG 120

41      50      60
I T I T C S A S S S I T S N Y L H W Y Q
ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA ACT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT CAG 180

61      70      80
Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S G
CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA 240

81      90      100
V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G T
GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC 300

101      110      120
M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S K T L T
ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT AAA ACA CTC ACG 360

121      130
F G A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 51)
TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 416
(서열 52)

```

도면17M

```

1      10      20
M D L Q V Q I I S F L L I S V T V I V S
ATG GAT TTA CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA GTG TCT 60

21      30      40
N G E I V L T Q S P T T M A A S P G E K
AAT GGA GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG AAG 120

41      50      60
I T I T C S V S S S I R S N Y L H W Y Q
ATC ACT ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA AGG TCC AAT TAT TTA CAT TGG TAT CAG 180

61      70      80
Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S G
CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA 240

81      90      100
V P A R F S G S G S G T S Y S L T V A T
GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA GTT GCC ACC 300

101      110      120
M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P L T
ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG CTC ACG 360

121      130
F G A G T K L E L K R A D A A P T V (서열 53)
TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 416
(서열 54)

```

도면17N

```

1      10      20
M   G   I   K   M   E   S   Q   T   Q   V   F   V   F   L   L   L   C   V   S
ATG GGC ATC AAG ATG GAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC GTA TTT CTA CTG CTC TGT GTG TCT 60

21      30      40
G   A   H   G   S   I   V   M   T   Q   T   P   K   F   L   L   V   S   T   G
GGT GCT CAT GGG AGT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCC AAA TTC CTG CTT GTA TCA ACA GGA 120

41      50      60
D   R   V   T   I   T   C   K   A   S   Q   T   V   T   N   D   L   A   W   Y
GAC AGG GTT ACC ATT ACC TGC AAG GCC AGT CAG ACT GTG ACT AAT GAT TTA GCT TGG TAC 180

61      70      80
Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   L   L   I   Y   Y   A   S   N   R   Y   T
CAA CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT 240

81      90      100
G   V   P   D   R   F   T   G   S   G   Y   G   T   D   F   T   F   T   I   N
GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC AGT GGA TAT GGG ACG GAC TTC ACT TTC ACC ATC AAC 300

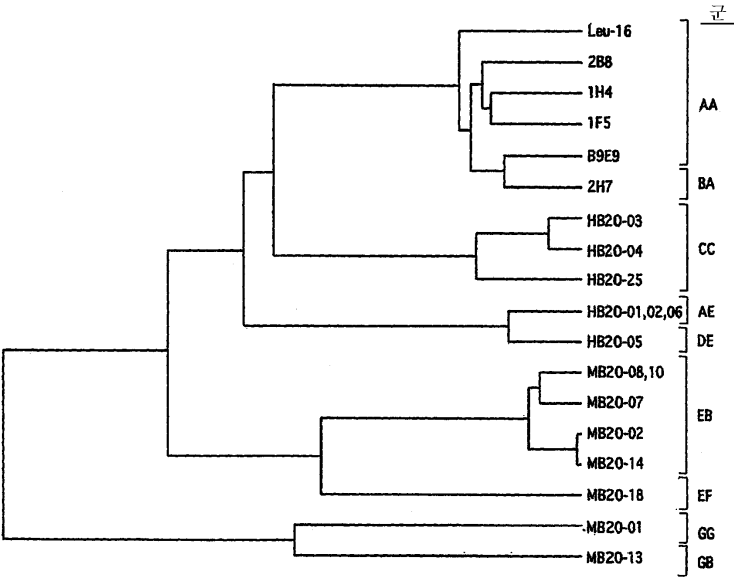
101      110      120
T   V   Q   A   E   D   L   A   V   Y   F   C   Q   Q   D   Y   S   S   P   L
ACT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG GAT TAT AGC TCT CCT CTC 360

121      120
T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R   A   D   A   A   P   T   V   ( 서열 55 )
ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAA CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA 417
( 서열 56 )

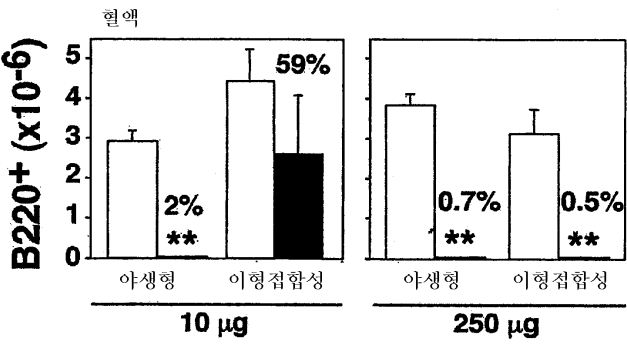
```

[illegible]

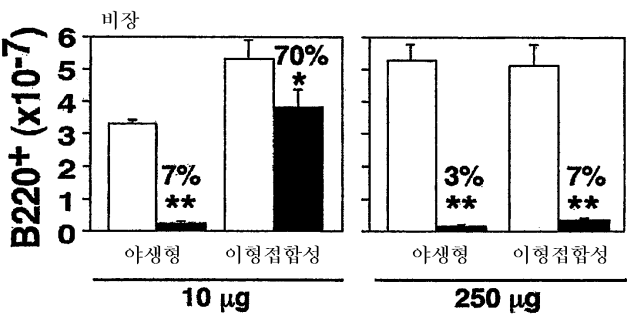
도면19



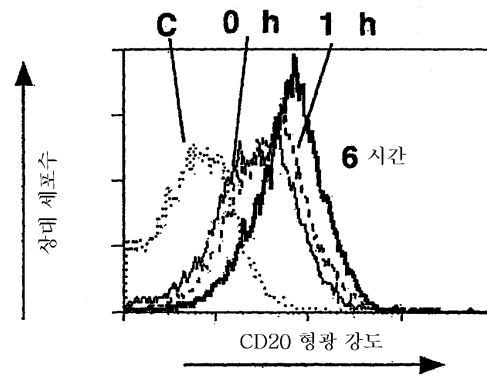
도면20A



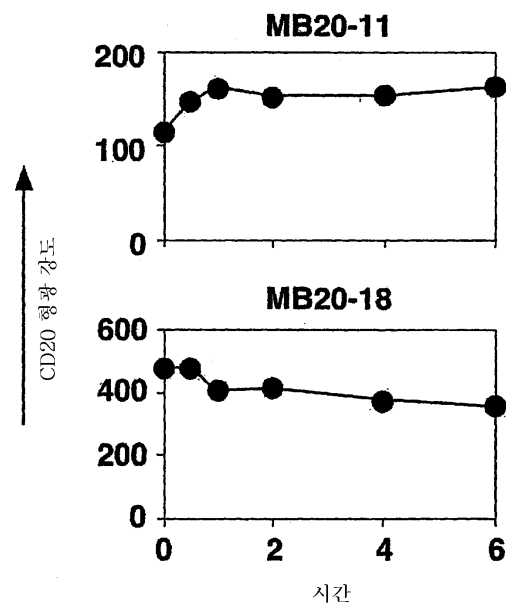
도면20B



도면21A

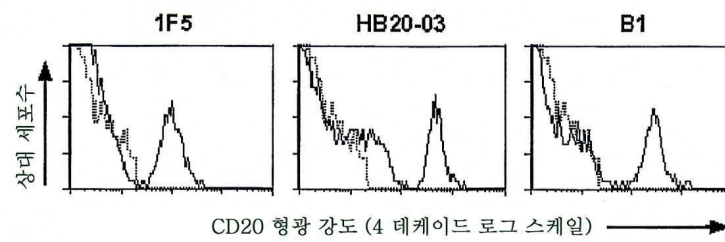


도면21B

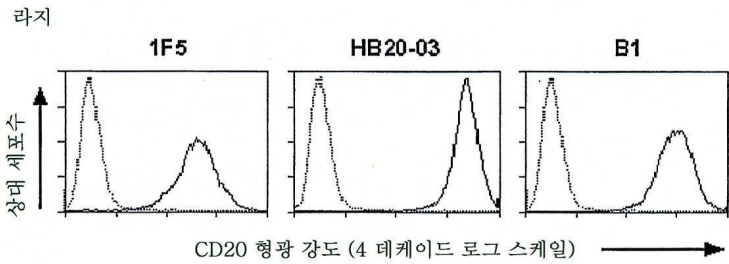


도면22A

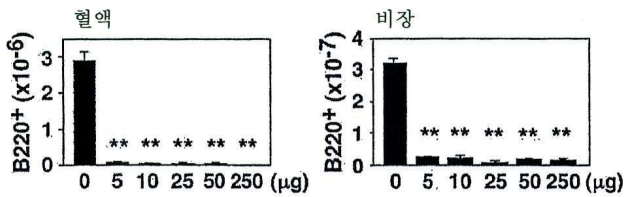
A. 혈액



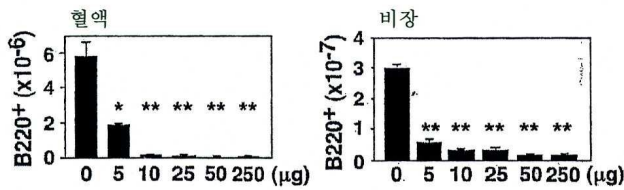
도면22B



도면23A



도면23B



서열 목록

- <110> Duke University
Tedder, Thomas F.
Uchida, Junji
Hamaguchi, Yasuhito
Poe, Jonathan C.
- <120> CD20-SPECIFIC ANTIBODIES AND METHODS EMPLOYING SAME
- <130> 5405.342W0
- <150> US 60/469,451

<151> 2003-05-09

<160> 119

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys 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 Lys Thr Pro Gly 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 Ala 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 Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Trp Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Gly Phe Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 2
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 2
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg ctctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagaagaca 120
 cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag gaaatggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatgggat 300
 tactacggta gtagctacgt tgggtttttt gactactggg gccaaaggcac cactctcaca 360
 gtctcctca 369

<210> 3
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 4
<211> 366
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 4
gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ctcttgctt cacatttacc aattacaata tgcactgggt aaagcagacg 120

cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag aaaatggtga tacttcctac 180

aatcagaaat ttaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aagcctccag cacagcctac 240

atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagattttat 300

tactacggta gttattacgg tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 6
<211> 366
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcttgaagg cttctggett cacatttacc aattacaata tgcactgggt aaagcagacg 120

cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag aaaatggtga tacttcctac 180

aatcagaggt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcacctca gcagcctgac atctgaggac actgcggtct atttctgtgc aagattttat 300

tattacggta gttattacgg tgctttggac tactgggggc aaggaacctc agtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly 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 Ala 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 Tyr Cys
 85 90 95

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

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

<210> 8
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 8
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg ctcttggtta cacatttatt agttacaata tgcactgggt aaagcagaaa 120
 cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag gaaatggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatgggat 300
 tactacggta gtagctacgt tgggtttttg actactgggg ccaaggcacc actcgtcaca 360
 gtctcctca 369

<210> 9
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

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

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

Ala Arg Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 10
<211> 366
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 10
gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ctcttggtt cagatttacc aattacaatt tgcactgggt aaaacagaca 120

cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag gaaatggtga aacttcctac 180

aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag tacagcctac 240

atgcagctca gaagcctgac atctggggac tctgcggtct attactgtgc aagattttat 300

tactacggtg gtagctacgg tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

gaggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacggaa tggcgtgggt tcgacaggct 120

ccaaggaagg ggcctgagtg ggtagcattc attagtaatt tggcatatag tatctactat 180
gcagacactg tgacgggccg attcaccatc tctagagaga atgccaagaa caccctgtac 240
ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtac aagaactggg 300
tactatgctt tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a 351

<210> 13
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

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

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

Tyr Ile Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 14
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 14
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg ctcttgata catgttcact gactactata taaagtgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gtcttgagtg gattggagat attaatccta ataatggtga tactatctac 180
 aaccagaagt tcaagggaagg gccacattg actgtagaca agtcctccaa cacagcctac 240
 atggacctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagagcgg 300
 ttgtcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 15
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 16
<211> 342
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16
gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg ctcttgata catgttact gactactaca tgaagtgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gataggggat attaataccta acaatggtga tactacctac 180

aaccagaagt tcgagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacggcctac 240

atggagcttc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaacgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 17
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 18
<211> 342
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 18
gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg ctcttgata cacgttcact gactactaca tgaagtgggt gaagcagagc 120

catggaaga gccttgactg gataggggat attaataccta acaatggtga tattatttac 180

aaccagaagt tcgagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacggcctac 240

atggagcttc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaacgg 300

tttgcttact ggggccaaagg gactctgggc actgtctctg ca 342

<210> 19
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 20
<211> 342
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg ctcttgata cacgttcact gactactaca tgaagtgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgactg gataggggat attaataccta acaatgggtga tattatttac 180

aaccagaagt tcgagggcaa ggccacattg actgtggaca agtcctccag cacggcctac 240

atggagcttc gtagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaacgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
	35						40					45			

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

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

Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

85

90

95

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

Ser

<210> 22
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 22
gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ctcttgata taaaatcact gactacaaca tgcactgggt gaagcagagt 120

catggaaaga gccttgagtg gattggatac attgccctt acaatggtgg tactacctac 180

aaccagaagt tcaagggaac ggccacattg actgtaaaca agtcctccag cacagcctat 240

atggagctcc gcagtcgac atcggaggat tctgcagtct attattgtgc aggtgctttg 300

gactattggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctct 339

<210> 23
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

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

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

Tyr Ile Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 24
<211> 342
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 24
gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg ctcttgata catgttcact gactactata taaagtgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gtcttgagtg gattggagat attaatccta ataatggtga tactatctac 180

aaccagaagt tcaaggga ggccacattg actgtagaca agtcctcaa cacagcctac 240

atggacctcc gcatctgac atcagaggac tctgcagtct attactgtgc aagagagcgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 25
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

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

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

Asn Leu His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Glu Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 26

gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaaatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaact tgcactgggt gaagcagagc 120

catggacaga gccttgagtg gattggatat attaacccta acaatgggtg tgctacatac 180

aatcagaagt tcactggcaa ggccacattg actgtaaaca ggtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atcggacgat tctgcagtct attactgtgc agaaatctat 300

gatggttact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Leu Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 28
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 28
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggacttgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg ctcttgata cacgttcact gactactaca tgaagtgggt gaaacagagc 120
 catggaaaga gccttgactg gataggggat attaatccta acaatggtga tattatttac 180
 aaccagaagt tcgagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacggcctac 240
 atggagcttc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaacgg 300
 ttigtcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 29
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 29

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
 1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
 20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
 35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu

50

55

60

Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Asn Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Tyr Asn Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 30
<211> 419
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 30
atgggcatca agatggagtc acagaccag gtctttgtat acatgttgct gtggttgctc 60

ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaat tcatgtcaac atcagttgga 120

gacagggtca gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactaatgt agcctggat 180

caacagaaac tagggcaatc tcctaaacca ctgatttatt cggcatccta ccggaacagt 240

ggagtccttg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc 300

aatgtgcagt ctgaagactt ggcagagtat tctgtgcagc aatataacag ttctccattc 360

acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatc 419

<210> 31
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31

Met Trp Gly Ser Val Phe Asn Phe Ser Ile Val Gly Ala Arg Cys Asp
 1 5 10 15

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu
 20 25 30

Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu
 35 40 45

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
 50 55 60

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
 85 90 95

Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp Thr
 100 105 110

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 115 120 125

Thr Val
 130

<210> 32
 <211> 392
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 32
atgtgggat ctgttttcaa tttttcaatt gtaggtgcca gatgtgacat ccagatgact 60

cagtcctcag cctccctatc tgcactctgtg ggggaaactg tcaccatcac atgtcgagca 120

agtgggaata ttcaacaatta ttttagcatgg tatcagcaga aacagggaaa atctcctcaa 180

ctcctggtct ataatgcaaa aaccttagca gatggtgtgc catcaaggtt cagtggcagt 240

ggatcaggaa cacaattttc tctcaagatc aacagcctgc agcctgaaga ttttgggagt 300

tattactgtc aacatTTTTG gactacgccg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 360

atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta tc 392

<210> 33
<211> 130
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Met Trp Gly Ser Val Phe Asn Phe Ser Ile Val Gly Ala Arg Cys Asp
1 5 10 15

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu
20 25 30

Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr Leu
35 40 45

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
50 55 60

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
65 70 75 80

Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
85 90 95

Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Trp Thr
100 105 110

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
115 120 125

Thr Val
130

<210> 34
<211> 392
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 34
atgtgggat ctgttttcaa tttttcaatt gtaggtgcca gatgtgacat ccagatgact 60

cagtctccag cctccctatc tgcatctgtg ggggaaactg tcaccatcac atgtcgagca 120

agtgggagta ttcacaatta tttagcatgg tatcagcaga aactgggaaa atctcctcaa 180

ctcctggtct ataatgcaaa aaccttagca gatggtgtgc catcaaggtt cagtggcagt 240

ggatcaggaa cacaattttc tctcaagatc aacagcctgc agcctgaaga ttttgggagt 300

tattactgtc aacatttttg gagtattccg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 360

atcaagcggg ctgatgctgc accaactgta tc 392

<210> 35
<211> 139
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Tyr Asn Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 36
<211> 419
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 36
atgggcatca agatggagtc acagaccag gtctttgtat acatgttgct gtggttgtct 60

ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga 120

gacagggtca gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactaatgt agcctggtat 180

caacagaaac cagggaac tcctaaagca ctgatttact cggcatccta cgggtacagt 240

ggagtccttg atcgcttcac aggcagtggg tctgggacag atttactct caccatcagc 300

aatgtgcagt ctgaagactt ggcagagtat ttctgtcagc aatataacag ctctccattc 360

acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatc 419

<210> 37
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Met Trp Gly Ser Val Phe Asn Phe Ser Ile Val Asp Ala Arg Cys Asp
 1 5 10 15

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu
 20 25 30

Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu
 35 40 45

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
 50 55 60

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu
 85 90 95

Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ile Pro Trp Thr

100 105 110

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
115 120 125

Thr Val
130

<210> 38
<211> 392
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 38
atgtggggat ctgttttcaa tttttcaatt gtagatgcca gatgtgacat ccagatgact 60

cagtcctccag cctccctgtc tgtatctgtg ggagaaactg tcaccatcac atgtcgagca 120

agtgaataaata tttacagtaa tttagcatgg taccagcaga aacagggaaa atctctcag 180

ctcctgggtct atgtcgcaac aaacttagca gatgggtgtgc catcaagggt cagtggcagt 240

ggatcaggca cacagtattc cctcaagatc aacagcctgc agtctgaaga ttttgggagt 300

tattactgtc aacatttttg gggatttccg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 360

atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta tc 392

<210> 39
<211> 144
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro

20 25 30

Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys
35 40 45

Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Lys Arg Lys Asn Tyr Leu Ala
50 55 60

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Trp
65 70 75 80

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
85 90 95

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp
100 105 110

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Phe Thr Phe Gly
115 120 125

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

<210> 40
<211> 432
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 40
atgggcatca agatggagtc acagaccag gtcttcctct ccctgctgct ctgggtatct 60

ggtagctgtg ggaacattat gatgacacag tcgcatcat ctctggctgt gtctgcagga 120

gaaaaggta ctatgagatg taagtccagt cagagtgttt tatatagttc aaagcggaag 180

aactacttgg cctggtacca gcagaaacca gggaagtctc ctacattatt gatctattgg 240

gcattccacta gggaatctgg tgtccctgat cgtttcacag gcagtggatc tgggacagat 300
 ttactcttta ccatcaccag tgtacaagct gaagacctgg cagtttatta ctgtcatcaa 360
 tacctctcct cgttcacgtt cggagggggg accaaactgg aaataaaacg ggctgatgct 420
 gcaccaactg ta 432

<210> 41
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 41

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
 1 5 10 15

Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr
 20 25 30

Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser
 35 40 45

Ser Ser Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

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

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Val Ala Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 42
<211> 416
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 42
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt catagtgtct 60

aatggagaaa ttgtgtcac ccagttcca accaccatgg ctgcatctcc cggggagaag 120

atcactatca cctgcagtgt cagctcaagt ataaggcca attatttaca ttggtatcag 180

cagaagccag gattctcccc taaactcttg atttatagga catccaatct ggcttctgga 240

gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac agttgccacc 300

atggaggctg aagatgttgc cacttactac tgccagcagg gtagtagtat accgctcacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatc 416

<210> 43
<211> 137
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Ile Val Asn Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met
20 25 30

Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser

35

40

45

Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe
50 55 60

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Val Ala Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 44
<211> 416
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 44
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt catagtgtnt 60

aatggagaaa ttgtgctcac ccagcttcca accaccatgg ctgcatctcc cggggagaag 120

atcactatca catgcagtgc cagctcaagt ataagttcca attatttgca ttggtatcag 180

cagaagccag gattctcccc taaactcttg atttacagga catccaatct ggcttctgga 240
 gtcccagctc gcttcagtgagg cagtgggtct gggacctctt acactctcac agtcgccacc 300
 atggaggctg aagatgttgc cacttactac tgccagcagg gtagtagtat accgctcacg 360
 ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatc 416

<210> 45
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
 1 5 10 15

Val Ser Asn Gly Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Lys Ala
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser
 35 40 45

Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Phe Ser
 50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

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

115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 46
<211> 410
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 46
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt gtctaatagga 60

gaacttgtgc tcacccagtc tccaaccacc aaggctgcat ctcccgggga gaagatcact 120

atcacctgca gtgtcagctc aagtatacgt tccaattact tgcattggta tcagcagagg 180

ccaggattct ccctaagct ctgtatttat aggacatcca atctggcttc tggagtccca 240

gtcgccttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaattgg caccatggag 300

gctgaagatg ttgccactta ctactgccag cagggtagta gtttaccgct cacgttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

<210> 47
<211> 136
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Asn Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Asn

35

40

45

Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Gly Thr Met Lys Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 48
<211> 410
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 48
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt gtctaatagga 60

gaaattgtgc tcacccagtc tccaaccacc atggctgcat ctcccgggga gaagatcact 120

atcacctgta gtgtcagttc aaatatacgt tccaattact tgcattggta tcagcagaag 180

ccaggattct ccctaaact ctgattttat aggacatcca atctggcttc tggagtccca 240

gtcgcgttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaattgg caccatgaag 300

gtgaagatg ttgccactta ctactgccag cagggtagta gtataccgt caggttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

<210> 49
<211> 136
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Asn Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Asn
35 40 45

Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Gly Thr Met Lys Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 50
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 50
 atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt gtctaatagga 60

 gaaattgtgc tcacccagtc tccaaccacc atggctgcat ctcccgggga gaagatcact 120

 atcacctgta gtgtcagttc aaatatccgt tccaattact tgcattggta tcagcagaag 180

 ccaggattct cccctaaact cttgatttat aggacatcca atctggcttc tggagtccca 240

 gctcgtttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaattgg caccatgaag 300

 gctgaagatg ttgccactta ctactgccag cagggtagta gtataccgct cacgttcggt 360

 gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

<210> 51
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 51

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
 1 5 10 15

Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val Leu Ala Gln Ser Pro Thr Thr
 20 25 30

Thr Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Ile Thr Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

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

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Gln Gly Ser Ser Lys Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210>	52
<211>	416
<212>	DNA
<213>	Mus musculus

<400> 52	
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgtcacagt catagtgtct	60
aatggagaaa ttgtgctcgc ccagttctcca accaccacgg ctgcatctcc cggggagaag	120
atcactatca cctgcagtgc cagctcaagt ataaacttcca attacttgca ttggtatcag	180
cagaagccag gattctcccc taaactcttg atttatagga catccaatct ggcttctgga	240
gtccagctc gcttcagtgg cagtggatct gggacctctt actctctcac aattggcacc	300
atggaggctg aagatgttgc cacttactac tgccagcagg gtagtagtaa aacactcacg	360
ttcggtgctg ggaccaagct ggagttgaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatc	416

<210> 53

<211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 53

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
 1 5 10 15

Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr
 20 25 30

Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser
 35 40 45

Ser Ser Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

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

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Val Ala Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

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

Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 130 135

<210> 54
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 54
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaata ggtcacagt catagtgtct 60

aatggagaaa ttgtgtcac ccagttcca accacatgg ctgcatctcc cggggagaag 120

atcactatca cctgcagtgt cagctcaagt ataaggtcca attatttaca ttggtatcag 180

cagaagccag gattctcccc taaactcttg atttatagga catccaatct ggcttctgga 240

gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac agttgccacc 300

atggaggctg aagatgttgc cacttactac tgccagcagg gtagtagtat accgctcacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagttgaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatc 416

<210> 55
<211> 139
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Cys Val Ser Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro
20 25 30

Lys Phe Leu Leu Val Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
35 40 45

Ala Ser Gln Thr Val Thr Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Phe Thr Ile Asn Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130 135

<210> 56
<211> 417
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 56
atgggcatca agatggagtc acagaccag gtcttcgtat ttctactgct ctgtgtgtct 60

gggtgctcatg ggagtattgt gatgaccag actcccaaat tcctgcttgt atcaacagga 120

gacagggtta ccattacctg caaggccagt cagactgtga ctaatgattt agcttggtac 180

caacagaagc cagggcagtc tcctaaactg ctgataact atgcatcaa tcgtacact 240

ggagtccttg atcgcttcac tggcagtgga tatgggacgg acttcacttt caccatcaac 300

actgtgcagg ctgaagacct ggcagtttat ttctgtcagc aggattatag ctctcctctc 360

acgttcggtg ctgggaccaa gctggaactg aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 57

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 58

Asn Tyr Asn Met His
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 59

Asn Tyr Asn Leu His
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 60

Asp Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

Asp Tyr Tyr Ile Lys
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

Asp Tyr Tyr Met Lys
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 63

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 64

Asp Tyr Asn Leu His
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 65

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

Gly

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 66

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

Gly

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 67

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

Gly

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 69

Phe	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Thr
1			5					10						15	

Gly

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 70

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

Gly

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 72

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 73

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

Gly

<210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 74

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

1 5 10 15

Gly

<210> 75
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 75

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

<210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 76

Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 77

Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 78
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 78

Trp Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Gly Phe Leu Thr Thr
1 5 10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Thr Gly Tyr Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

Glu Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Ala Leu Asp Tyr
1

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 83

Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 85

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 86

Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 87

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 88

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Lys Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 89
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 89

Ser Val Ser Ser Ser Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Ser Val Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Thr Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

Lys Ala Ser Gln Thr Val Thr Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

Ser Ala Ser Tyr Arg Asn Ser
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 95

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 97

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 98

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 101

Gln Gln Tyr Asn Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 102

Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 103

Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Trp Thr
 1 5

<210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 104

Gln His Phe Trp Gly Ile Pro Trp Thr
 1 5

<210> 105
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 105

His Gln Tyr Leu Ser Ser Phe Thr
 1 5

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 106

Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr
 1 5

<210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 107

Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 108

Gln Gln Gly Ser Ser Lys Thr Leu Thr
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 109

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 110
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 110
 gggaattcga ggtagcagctg caggagtctg g

<210> 111
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 111
 gagggggaag acatttgga aggactg 27

<210> 112
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 112
 gagttccagg tcactgtcac tggc 24

<210> 113
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 113
 gtgaattcag gcggccgcta a 21

<210> 114
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 114
actggatggg gggaagatg 19

<210> 115
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Consensus CDR3 region sequence

<400> 115

Tyr Tyr Gly Ser
1

<210> 116
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 116
atgagtgtgc tctctcaggt cctggsgttg 30

<210> 117
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 117
atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc 30

<210> 118
<211> 31

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 118
atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g 31

<210> 119
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide primer

<400> 119
atgtggggay ctktttycmm tttttcaatt g 31