



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월02일
(11) 등록번호 10-1335798
(24) 등록일자 2013년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7030580(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년02월15일
심사청구일자 2012년11월22일
(85) 번역문제출일자 2012년11월22일
(65) 공개번호 10-2013-0001334
(43) 공개일자 2013년01월03일
(62) 원출원 특허 10-2007-7020064
원출원일자(국제) 2006년02월15일
심사청구일자 2011년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/005676
(87) 국제공개번호 WO 2006/089133
국제공개일자 2006년08월24일
(30) 우선권주장
60/653,587 2005년02월15일 미국(US)
60/702,063 2005년07월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06306393 B1
전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자
듀크 유니버시티
미합 노쓰 캐롤라이나 27708-0083 더럼 박스
90083 리서치 드라이브 노쓰 빌딩 230
(72) 발명자
테드테르, 토마스 에프.
미국, 노쓰 캐롤라이나 27705, 더햄, 화일드 메도
우 드라이브 3000
하마구치, 야수히토
일본, 이취카와 920-8641, 카나자와, 타카라마치
13-1, 카나자와 유니버시티 하스피털
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이경민, 강명구

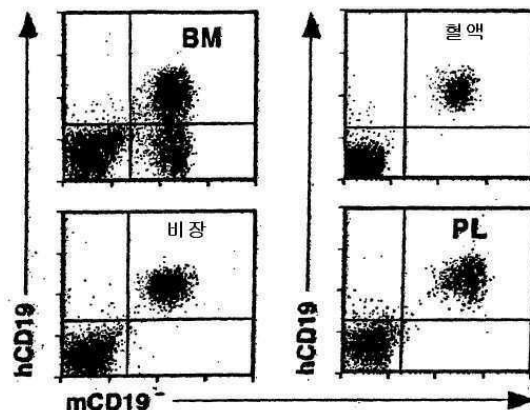
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 항-CD19 항체 및 종양학에서 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 CD19 항원에 결합하는 치료 항체, 바람직하게는, 인간 ADCC를 매개하는 치료 항체를 이용하여, B 세포 악성종양과 같은 인간 개체에서 B 세포 질환을 치료하기 위한 면역치료 조성물과 방법에 관계한다. 본 발명은 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 적절하게는, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아이소타입의 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

그론, 한네

미국, 노쓰 캐롤라이나 27707, 더햄, 윈드롭 코트
5

야자와, 노리히토

일본, 도쿄 113-0001, 분쿄, 하쿠산 1-37-9-602

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

인간 항원-의존성-세포-매개된-세포독성(ADCC)을 조정하는 항-CD19 항체를 순환하는 B 세포를 고갈시키는데 충분한 양으로 포함하는 인간의 자가면역 질환 또는 장애 치료용 조성물에 있어서,

이때 항-CD19 항체는 서열 번호: 2의 아미노산 33 내지 37에 최소한 90% 동일성을 가진 서열, 서열 번호: 2의 아미노산 51 내지 68에 최소한 90% 동일성을 가진 서열, 서열 번호: 2의 아미노산 101 내지 115에 최소한 90% 동일성을 가진 서열 그리고 서열 번호: 16의 아미노산 43 내지 58에 최소한 85% 동일성을 가진 서열, 서열 번호: 16의 아미노산 74 내지 80에 최소한 85% 동일성을 가진 서열, 서열 번호: 16의 아미노산 113 내지 121에 최소한 85% 동일성을 가진 서열, 또는 서열 번호: 4의 아미노산 51 내지 68에 최소한 90% 동일성을 가진 서열, 서열 번호: 4의 아미노산 101 내지 114에 최소한 90% 동일성을 가진 서열, 그리고 서열 번호: 18의 아미노산 74 내지 80에 최소한 85% 동일성을 가진 서열 및 서열 번호: 18의 아미노산 113 내지 121에 최소한 85% 동일성을 가진 서열을 포함하는, 조성물,

청구항 3

청구항 2에 있어서, 항-CD19 항체는 인간 또는 인간화(humanized) 항체인, 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 항-CD19 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 인간 아이소타입인, 조성물.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 자가면역 질환 또는 장애는 상기 조성물의 투여전 치료되는, 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 사전 치료는 스테로이드, 화학요법, 방사능면역요법, 독소 요법, 프로드럭-활성화 효소 요법, 항체 요법, 단핵구 또는 대식세포 강화 요법, 면역조절 요법, 외과술 치료, 또는 이의 임의의 조합이 되는, 조성물.

청구항 7

청구항 2에 있어서, 자가면역 질환 또는 장애는 조성물 투여후 항-CD19 항체 요법 이외의 치료법으로 치료되는, 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 후속 치료는 스테로이드, 화학요법, 방사능면역요법, 독소 요법, 프로드럭-활성화 효소 요법, 항체 요법, 단핵구 또는 대식세포 강화 요법, 면역조절 요법, 외과술 치료, 또는 이의 임의의 조합이 되는, 조성물

청구항 9

전술한 임의의 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 장애는 초기 단계의 질환 또는 장애인, 조성물.

청구항 10

전술한 임의의 한 항에 있어서, 인간은 자가면역 질환 또는 장애 치료를 기존에 받은 적이 없었던 환자인, 조성물.

청구항 11

전술한 임의의 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 장애는 CD19 양성인, 조성물.

청구항 12

전술한 임의의 한 항에 있어서, 인간 환자는 dl당 적어도 1의 단핵구 총수를 보유하는, 조성물.

청구항 13

전술한 임의의 한 항에 있어서, 항-CD19 항체는 최소한 4 내지 7일의 반감기를 보유한, 조성물.

청구항 14

전술한 임의의 한 항에 있어서, 조성물은 장관외, 복막내, 근육내, 정맥내 또는 피하내 경로로 투여되는, 조성물.

청구항 15

전술한 임의의 한 항에 있어서, 항-CD19 항체는 약 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 의 투약량으로 투여되거나 또는 약 $37.5\text{mg}/\text{m}^2$ 의 투약량으로 피하 경로로 투여되는, 조성물.

청구항 16

전술한 임의의 한 항에 있어서, 순환하는 B 세포의 최소한 75%를 고갈시키는데 충분한 양으로 투여되는, 조성물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 순환하는 B 세포의 고갈은 최소한 7일, 최소한 30일 또는 최소한 6개월 기간 동안 관찰되는, 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 the National Cancer Institute of the National Institutes of Health에 의해 위탁된 연구 과제 CA81776, CA105001, CA96547 및 the National Institute of Allergy and Infectious Disease of the National Institutes of Health에 의해 위탁된 연구 과제 AI56363 하에, 부분적으로 정부 지원을 받았다.

[0002] 본 출원은 35 U. S. C. § 119(e) 하에, 2005년 2월 15일자 제출된 U.S. 가출원 제60/653,587호 및 2005년 7월 22일자 제출된 U.S. 가출원 제60/702,063호에 우선권을 주장한다.

[0003] 도입

[0004] 본 발명은 인간 CD19 항원에 결합하는 치료 항체를 이용하여, B 세포 악성종양을 비롯한 인간 개체에서 B 세포 질환 또는 질병의 치료를 위한 방법에 관계한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 치료 항-CD19 항체는 가급적, 인간 항원-의존성-세포-매개된-세포독성(ADCC)을 매개한다. 또한, 본 발명은 IgG1 및/또는 IgG3 인간 아이소타입(isotype)의 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 및/또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명에는 단클론 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체 역시 포함된다.

배경기술

[0005] B 세포 표면 마커(surface marker)는 B 세포 질환이나 질병, 자가면역 질환, 이식거부반응의 치료를 위한 표적으로서 널리 제안되었다. B 세포 표면 마커의 실례는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86 백혈구 표면 마커이다. 이들 중에서 특정 마커에 특이적으로 결합하는 항체가 개발되었고, 일부는 질병과 질환의 치료에 시험되었다.

- [0006] 가령, 성숙 B 세포와 이들의 악성 대응물에 특이적인 CD20 세포 표면 분자에 대한 키메라 또는 방사성표지된 단클론 항체(mAb)-기초된 요법은 비-호지킨 림프종에 대한 효과적인 생체내 치료인 것으로 밝혀졌다(Tedder et al., *Immunol. Today* 15:450-454 (1994); Press et al., *Hematology*, 221-240 (2001); Kaminski et al., *N. Engl. J. Med.*, 329:459-465 (1993); Weiner, *Semin. Oncol.*, 26:43-51 (1999); Onrust et al., *Drugs*, 58:79-88 (1999); McLaughlin et al., *Oncology*, 12:1763-1769 (1998); Reff et al., *Blood*, 83:435-445 (1994); Maloney et al., *Blood*, 90:2188-2195 (1997); Maloney et al., *J. Clin. Oncol.*, 15:3266-3274 (1997); Anderson et al., *Biochem. Soc. Transac.*, 25:705-708 (1997)). 항-CD20 단클론 항체 요법은 또한, 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 특발성 혈소판감소성 자반증(idiopathic thrombocytopenic purpura), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia) 및 다른 면역-매개된 질환의 증상(manifestation)을 개선하는 것으로 밝혀졌다(Silverman et al., *Arthritis Rheum.*, 48:1484-1492 (2002); Edwards et al., *Rheumatology*, 40:1-7 (2001); De Vita et al., *Arthritis Rheumatism*, 46:2029-2033 (2002); Leandro et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 61:883-888 (2002); Leandro et al., *Arthritis Rheum.*, 46:2673-2677 (2001)). 항-CD22 단클론 항체 LL-2는 화학요법 치료를 받는 급격히 진행되는 재발성 림프종 환자를 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다(Goldenberg U.S. Patent No: 6,134,982, 6,306,393). 항-CD20(IgG1) 항체, RITUXAN™는 성인 면역성 혈소판 감소성 자반증(adult immune thrombocytopenic purpura), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia)과 같은 특정 질환의 치료에 성공적으로 이용되고 있다(Cured et al., WO 00/67796). 이러한 요법의 효능에도 불구하고, 대부분의 급성 림프성 백혈병(ALL) 및 여러 다른 B 세포 악성종양은 CD20을 발현하지 않거나, CD20을 낮은 수준으로 발현하거나, 또는 CD20 면역요법 이후 CD20 발현을 상실하였다(Smith et al., *Oncogene*, 22:7359-7368 (2003)). 게다가, CD20의 발현은 비-호지킨 림프종 환자의 절반 정도만 CD20-지향된 면역요법에 반응하기 때문에, 항-CD20 요법에 대한 반응의 전조가 되지 못한다.
- [0007] 인간 CD19 분자는 전구-B 세포, 초기 발달 단계에서 B 세포(즉, 미성숙 B 세포), 형질 세포로의 말단 분화(terminal differentiation)가 진행된 성숙 B 세포, 악성 B 세포를 비롯한 인간 B 세포의 표면에서 발현된 구조적으로 상이한 세포 표면 수용체이다. CD19는 대부분의 전구-B 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 비-호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 전림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 통상적인 급성 림프구성 백혈병, 일부 무-급성 림프아구성 백혈병에 의해 발현된다(Nadler et al., *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983); Loken et al., *Blood*, 70:1316-1324 (1987); Uckun et al., *Blood*, 71:13-29 (1988); Anderson et al., 1984. *Blood*, 63:1424-1433 (1984); Scheuermann, *Leuk. Lymphoma*, 18:385-397(1995)). 형질 세포에서 CD19의 발현은 CD19가 다발성 골수종, 형질구종, 발덴스트롬 종양(Waldenstrom's tumor)과 같은 분화된 B 세포 종양에서도 발현될 수 있음을 암시한다(Grossbard et al., *Br. J. Haematol.*, 102:509-15(1998); Treon et al., *Semin. Oncol.*, 30:248-52(2003)). CD20과 달리, CD19 항원은 항-CD19 항체가 결합하는 경우에, 더욱 높은 수준으로 발현되고 세포에 의해 내재화되는 것으로 생각되었다.
- [0008] CD19 항원은 또한, 면역요법을 위한 여러 제안된 표적 중의 하나이다. 하지만, 세포 내재화(cellular internalization)로 인한 표적으로서 인지된 이용불가능성은 인간 개체에서 성공적으로 이용될 수 있는 치료 프로토콜(therapeutic protocol)의 개발에 장애를 유발하는 것으로 생각되었다. CLB-CD19 항체(항-CD19 무린 IgG2a mAb)는 무흉선(athymic) 생쥐 내에 이식된 인간 종양의 성장을 저해하는 것으로 밝혀졌다(Hooijberg et al., *Cancer Research*, 55:840-846 (1995)). 다른 연구에서, 단클론 무린 항체 FMC63(IgG2a)은 인간 IgG1 Fc 영역을 이용하여 키메라화시켰다. 인간 B 세포 림프종을 보유하는 SCID 생쥐(이종간 이식 모형(xenotransplantation model))에 이러한 키메라 항체의 투여는 보체-매개된 세포독성(complement-mediated cytotoxicity) 또는 ADCC를 유도하지 않으면서, 이식된 종양 세포의 현저한 사멸을 결과하였다(Geoffrey et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 41:53-60 (1995)).
- [0009] 종양 이식의 이종간 이식 생쥐 모형을 이용하여 획득된 이들 결과는 인간 환자에서 무린 항-CD19 항체를 이용한 연구로 이어졌다. 무린 CLB-CD19 항체는 기존의 통상적인 요법(화학요법 또는 방사선요법)에 실패한, 진행성 비-호지킨 림프종으로 진단된 6명의 환자에 투여되었다. 이들 환자들은 225 내지 1,000 mg 범위의 전체 항체 용량이 제공되었다(Hekman et al., *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 32:364-372 (1991)). 항체 주입 이후 2명의 환자에서 순환 종양 세포가 일시적으로 감소했지만, 1명의 환자만 2회 주기의 항체 치료 이후 부분적인 완화를 달성하였다. 이런 소규모의 난치성 환자로부터 치료 효능에 관한 결론을 도출할 수는 없었다.
- [0010] 이후, 이들 연구자들은 이종간 이식 모형에서, 공역되지 않은 CD20 mAb의 항-종양 효과가 CD19 mAb의 항-종양 효과보다 훨씬 뛰어나다는 것을 입증하였다(Hooijberg et al., *Cancer Res.*, 55:840-846 (1995); Hooijberg et

al., *Cancer Res.*, 55:2627-2634 (1995)). 더 나아가, 이들은 CD19와 CD20 mAb를 조합으로 이용하는 경우에, 종양 발생에 대한 부가적인 또는 상승적인 효과를 발견하지 못하였다(Hooijberg et al., *Cancer Res.*, 55:840-846 (1995)). 이러한 이종간 이식 동물 모형이 인간 개체에서 효능에 대한 불량한 전조 지시자인 것으로 인정되긴 했지만, 이들 동물 연구에서 달성된 부정적인 결과는 나신 항-CD19 항체를 이용한 치료에 대한 흥미를 반감시켰다.

[0011] 항-CD19 항체-기초된 면역독소(immunotoxin)의 이용은 동등하게 비관적인 결과를 산출하였다. 초기 임상 시험에서, B4 항-CD19 항체(뮤린 IgG1 mAb)는 식물 독소 리신(ricin)에 공액되고, 기존의 통상적인 요법에 실패한 다발성 골수종(Grossbard et al., *British Journal of Haematology*, 102:509-515(1998)), 진행된 비-호지킨 림프종(Grossbard et al., *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)), 난치성 B 세포 악성종양(Grossbard et al., *Blood*, 79:576-585 (1992))을 앓는 인간 환자에 투여되었다. 이들 시험은 전체적으로, 인간에 B4-리신 공액체를 투여하는 안정성을 증명하였다; 하지만, 결과가 엇갈렸고, 반응 비율이 RITUXAN™을 이용한 임상 시험에 비하여 비관적이었다(Grossbard et al., *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)). 이에 더하여, 상당수의 환자에서 인간 항-생쥐 항체(HAMA) 반응 또는 인간 항-리신 항체(HARA) 반응이 발생하였다.

[0012] 다른 시험에서, 기존의 통상적인 요법으로 치료를 받은 7명의 저등급 비-호지킨 림프종 환자를 저용량 인터루킨-2의 연속 주입과 조합으로 뮤린 CLB-CD19 항체로 치료하였다(Vlasveld et al., *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 40:37-47 (1995)). 1명의 백혈병 환자에서 부분적인 완화가 관찰되고, 순환 B 세포의 50% 이상의 감소가 관찰되었다. 순환 B 세포 총수는 평가된 5명의 나머지 환자 중에 4명에서 변화가 없었다. 따라서, 인간에서 뮤린 항-CD19 항체와 항-CD19 항체-기초된 면역독소의 치료 평가는 효능을 평가할 수 없는 일화(逸話) 데이터를 산출하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 요약

[0014] 본 발명은 인간 CD19 항원에 결합하는 치료 항체, 바람직하게는, 인간 ADCC를 매개하는 치료 항체를 이용하여, B 세포 악성종양과 같은 인간 개체에서 B 세포 질환을 치료하기 위한 면역치료 조성물과 방법에 관계한다. 본 발명은 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 적절하게는, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아이소타입의 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 단클론 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다.

[0015] 치료 제제(formulation)와 처방(regimen)은 급성 림프성 백혈병(ALL), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 다발성 골수종, 여포성 림프종, 외투 세포(mantle cell) 림프종, 전림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 통상적인 급성 림프구성 백혈병, 일부 무-급성 림프아구성 백혈병을 비롯한, B 세포와 이들의 전구체로부터 유래되는 B 세포 악성종양으로 진단된 인간 개체를 치료하는데 적용된다.

[0016] 본 발명의 방법은 예로써, 인간 개체에서 CD19-지향된 면역요법을 평가하기 위한 유전자도입 생쥐 모형을 이용하여 실증된다.

[0017] 한 구체예에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 내에 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물을 제시한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 내에 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 키메라 항-CD19 항체의 치료 효과량을 함유하는 약학적 조성물을 제시한다. 관련된 구체예에서, IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 키메라 항-CD19 항체의 치료 효과량은 1 mg/환자 체중 kg 이하이다. 다른 관련된 구체예에서, IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 키메라 항-CD19 항체의 치료 효과량은 2 mg/환자 체중 kg 이상이다.

[0018] 한 측면에 따라, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 내에, 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체의 치료 효과량을 함유하는 약학적 조성물을 제시한다. 다른 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 내에, 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 및/또는 아포토시스 활성을 매개하는 단클론 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물을 제시한다.

[0019] 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 순환 B 세포를 고갈시킬 만큼 충분한 양으로, IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한, 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 순환 B 세포를 고갈시킬 만큼 충분한 양으로, 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0020] 한 구체예에서, 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양에 기인하는 초기 단계 질병을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 인간 환자는 이러한 악성 종양에 대한 치료를 이전에 받은 적이 없다. 본 발명의 또 다른 구체예는 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 B 세포 악성종양은 CD19 양성이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 환자에서 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 인간 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 단클론 항-CD19 항체의 치료 효과적 처방을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 인간 환자는 순환 혈액 dL당 적어도 1의 단핵구 총수를 보유한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 인간 CD19 항원에 결합하는 치료 항체, 바람직하게는, 인간 ADCC를 매개하는 치료 항체를 이용하여, B 세포 악성종양과 같은 인간 개체에서 B 세포 질환을 치료하기 위한 면역치료 조성물과 방법에 관계한다. 본 발명은 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 적절하게는, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아이소타입의 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 단클론 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다.

발명의 효과

[0022] 대부분의 미성숙과 성숙 B 세포 역시 $TG-1^{+/+}$, $TG-1^{+/-}$ 또는 $TG-2^{+/+}$ 생쥐의 골수 내에서 고갈된다. 따라서, hCD19를 낮은 수준으로 발현하는 전구-B 세포를 비롯한 대부분의 hCD19⁺ 세포는 CD19 항체 치료에 의해 골수로부터 고갈된다. 예상치 않게, 검출되지 않은 만큼 낮은 수준으로 hCD19를 발현하는 대량의 mCD19⁺ 전구-B 세포 역시 골수로부터 고갈되었다. 이와 일목상통하게, FMC63, HB12a, HB12b, B4, HD237 항체는 대부분의 골수 B220⁺ 세포를 고갈시켰다. 도 10A-10C에서는 항-CD19 항체 치료이후 B 세포 고갈의 지속 기간과 용량 반응(dose response)을 예증한다. 도 10A에서는 0일에 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 FMC63 또는 아이소타입-대조 항체 치료이후, 혈액 B220⁺ B 세포와 Thy-1⁺ T 세포의 총수를 도시한다. 수치는 각 군에서 6마리 생쥐로부터 평균(\pm SEM) 결과를 나타낸다. 이들 결과는 순환 B 세포가 13주 동안 고갈되고, 이어지는 13주 동안 혈액-기원 B 세포가 점진적으로 회복된다는 것을 입증한다. Thy-1⁺ T 세포 표현은 항-CD19 치료의 결과로서 변화되지 않았다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1A-1E에서는 hCD19TG 생쥐 세포주에 의한 CD19 발현을 예시한다. 도 1A에서는 hCD19TG($TG-1^{+/-}$) 생쥐로부터 B 세포에 의한 인간과 생쥐 CD19 발현을 도시한다. 도 1B에서는 hCD19TG 생쥐로부터 CD19⁺ 혈액 B 세포에 의한 인간과 생쥐 CD19 발현의 상대적 평균 밀도(relative mean density)를 도시한다. 도 1C에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐 조직으

로부터 $CD19^{+}$ B 세포에 의한 hCD19와 mCD19 발현의 상대적 밀도를 도시한다. 도 1D에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐로부터 생쥐 혈액과 비장 $B220^{+}$ B 세포에서 CD19 항체 결합 밀도(binding density)를 도시한다. 도 1E에서는 hCD19 cDNA-형질감염된 300.19 세포에 항-CD19 항체 결합을 도시한다.

도 2A-2D에서는 hCD19TG 생쥐에서 혈액, 비장, 림프절 B 세포 고갈을 도시한다. 도 2A에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 항-CD19 또는 아이소타입-합치된 대조(CTL) 항체 치료이후 7일 시점에, 혈액, 비장, 림프절로부터 전형적인 B 세포 고갈을 예증한다. 도 2B에서는 항-CD19 항체에 의한 순환 B 세포 고갈의 시간 과정(time course)을 도시한다. 도 2C와 도 2D에서는 지정된 용량에서 항-CD19(채워진 막대) 또는 대조(빈 막대) 항체로 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 치료이후, 각각 비장과 림프절 B 세포 총수(\pm SEM)를 도시한다.

도 3A-3F에서는 항-CD19 항체 치료이후 골수 B 세포 고갈을 도시한다. 도 3A에서는 유세포분석(flow cytometry analysis)에서 4색 면역형광 염색으로 평가된, $TG-1^{+/-}$ 골수 B 세포 부차집단에 의한 전형적인 hCD19와 mCD19 발현을 도시한다. 도 3B에서는 유세포분석에서 2색 면역형광 염색으로 평가된 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g) 치료이후 7일 시점에, hCD19TG 생쥐의 골수에서 $hCD19^{+}$ 세포의 고갈을 도시한다. 도 3C에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 항-CD19 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g) 치료이후 7일 시점에 골수에서 전형적인 $B220^{+}$ B 세포 고갈을 도시한다. 도 3D에서는 3색 면역형광 염색으로 평가된, $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g) 치료이후 7일 시점에 전형적인 B 세포 부분집합 고갈을 도시한다. IgM $^{+}$ $B220^{+}$ 프로-/전구-B 세포는 CD43 발현에 기초하여 더욱 세분하였다(아래쪽 패널). 도 3E에서는 2색 면역형광 염색으로 평가된, hCD19TG 생쥐 세포주의 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g) 치료이후 7일 시점에, $CD25^{+}B220^{+}$ 전구-B 세포의 전형적인 고갈을 도시한다. 도 3F에서는 ≥ 3 의 한배 새끼 쌍(littermate pair)의 FMC63(달린 막대) 또는 대조(열린 막대) 항체 치료이후 7일 시점에, 양측 대퇴골(bilateral femur) 내에서 프로-B, 전구-B, 미성숙, 성숙 B 세포의 총수(\pm SEM)를 나타내는 막대를 도시한다.

도 4A-4C에서는 복강 B 세포가 항-CD19 항체 치료에 민감하다는 것을 예증한다. 도 4A에서는 복강 $CD5^{+}B220^{+}$ B1a와 $CD5^{-}B220^{hi}$ B2(통상적인) B 세포에 의한 인간과 생쥐 CD19 발현을 도시한다. 도 4B에서는 CD19(250 μ g에서 HB12a, HB12b, FMC63; 50 μ g에서 B4와 HD237) 항체 또는 대조 항체(250 μ g)로 치료된 $TG-1^{+/-}$ 생쥐로부터 복강 $B220^{+}$ 세포의 고갈을 도시한다. 도 4C에서는 hCD19TG 생쥐의 항-CD19 항체 또는 대조 항체 치료이후 7일 시점에, $CD5^{+}B220^{+}$ B1a와 $CD5^{-}B220^{hi}$ B2 B 세포의 전형적인 고갈을 도시한다.

도 5A에서는 HB12a 항-CD19 항체의 중쇄 V_H -D- J_H 접합 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO:1) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO:2) 서열을 도시한다. 도 5B에서는 HB12b 항-CD19 항체의 중쇄 V_H -D- J_H 접합 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO:3) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO:4) 서열을 도시한다.

도 6A에서는 HB12a 항-CD19 항체의 경쇄 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO: 15) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO: 16) 서열을 도시한다. 도 6B에서는 HB12b 항-CD19 항체의 경쇄 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO: 17) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO: 18) 서열을 도시한다.

도 7A-7B에서는 공개된 생쥐 항-(인간) CD19 항체의 아미노산 서열 정렬을 도시한다. 도 7A에서는 일치 서열(SEQ ID NO:5), HB12a(SEQ ID NO:2), 4G7(SEQ ID NO:6), HB12b(SEQ ID NO:4), HD37(SEQ ID NO:7), B43(SEQ ID NO:8), FMC63(SEQ ID NO:9)을 보유하는 중쇄 V_H -D- J_H 접합 서열에 대한 서열 정렬을 도시한다. 도 7B에서는 항-CD19 항체의 경쇄 V_K 아미노산 서열 분석 결과를 도시한다. 일치 서열(SEQ ID NO:10), HB12a(SEQ ID NO:16), HB12b(SEQ ID NO:18), HD37(SEQ ID NO:11), B43(SEQ ID NO:12), FMC63(SEQ ID NO:13), 4G7(SEQ ID NO:14)이 정렬된다.

도 8A-8C에서는 CD19 밀도가 생체내에서 항-CD19 항체에 의한 B 세포 고갈의 효율에 영향을 준다는 것을 예증한다. hCD19TG 생쥐에서 전형적인 혈액과 비장 B 세포 고갈은 HB12b(도 8A) 또는 FMC63(도 8B) 항체 치료(7일, 250 μ g/생쥐)이후 관찰된다. 도 8C에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐로부터 혈액 $B220^{+}$ B 세포 상에서 상대적인 항-CD19와 항-CD20 항체-결합 밀도를 도시한다. 도 8D에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐로부터 비장 $B220^{+}$ B 세포 상에서 상대적인 항-

CD19와 항-CD20 항체-결합 밀도를 도시한다.

도 9A-9D에서는 항-CD19 항체 치료이후 B 세포 고갈이 FcR γ -과 단핵구-의존성이라는 것을 예증한다. 도 9A에서는 hCD19 TG-1^{+/-} FcR γ ^{+/-} 또는 TG-1^{+/-} FcR γ ^{-/-} 한배 새끼의 항-CD19 또는 아이소타입-대조 항체 치료이후 7일 시점에 전형적인 혈액과 비장 B 세포 고갈을 도시한다. 도 9B에서는 0일에 FcR γ ^{-/-} 한배 새끼의 항체 치료이후 7일 시점에 혈액과 조직 B 세포 고갈을 도시한다. 도 9C에서는 단핵구-고갈된 hCD19TG-1^{+/-} 생쥐에서 전형적인 B 세포 총수를 도시한다. 도 9D에서는 항체 치료이후 7일 시점에, 혈액과 조직 B 세포 고갈을 도시한다.

도 10A-10D에서는 항-CD19 항체 치료이후 B 세포 고갈의 지속 기간과 용량 반응(dose response)을 예증한다. 도 10A에서는 0일에 TG-1^{+/-} 생쥐의 FMC63 또는 아이소타입-대조 항체 치료이후, 혈액 B220⁺ B 세포와 Thy-1⁺ T 세포의 총수를 도시한다. 도 10B-C에서는 항체 치료이후 11, 16, 30주 시점에, 도 10A에 도시된 생쥐에서 전형적인 조직 B 세포 고갈을 도시한다. 도 10D에서는 혈액, 골수와 비장 B 세포 고갈에 대한 항-CD19 항체 용량 반응을 도시한다.

도 11A-11C에서는 CD19가 생체내에서 항체 결합이후 내재화(internalization)되지 않는다는 것을 예증한다. 생체내에서 HB12a(도 11A), HB12b(도 11B), FMC63(도 11C) 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g)로 치료된 TG-1^{+/-} 생쥐에서 세포 표면 CD19 발현 및 B 세포 제거.

도 12A-12C에서는 생체내에서 항-CD19 항체 결합이후 CD19 포화를 예증한다. 도 12A에서는 생체내에서 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μ g)로 치료된 TG-1^{+/-} 생쥐에서 B 세포 제거를 도시한다. 도 12B에서는 FMC63 항체 치료(250 μ g)가 1시간 투여 이내에 hCD19 상에서 항체-결합 부위를 포화시킨다는 것을 예증한다. 도 12C에서는 HB12b 항-CD19 항체 치료(250 μ g)가 도 12B에서 평가된 바와 같이, 1시간 투여 이내에 hCD19 상에서 항체-결합 부위를 포화시킨다는 것을 예증한다.

도 13A-13B에서는 항-CD19 항체 치료가 TG-1^{+/-} 생쥐에서 혈청 면역글로불린과 자기항체(autoantibody) 수준을 감소시킨다는 것을 예증한다. 도 13A에서는 항-CD19 항체 치료이후, 혈청 면역글로불린 수준을 도시하고, 도 13B에서는 항-dsDNA, 항-ssDNA, 항-히스톤 자기항체 수준을 도시한다.

도 14A-14B에서는 항-CD19 항체 치료가 TG-1^{+/-} 생쥐에서 체액 면역 반응을 차단한다는 것을 예증한다. 항체-치료된 생쥐는 도 14A: TNP-LPS, 도 14B: DNP-Ficoll, 도 14C-14D: DNP-KLH로 면역접종(immunization)하였다. 한배 새끼는 0일에 일차 면역접종이전 7일 시점(A-C) 또는 0일에 일차 면역접종이후 14일 시점(D)에 FMC63(단원) 또는 대조(열린 원) 항체(250 μ g)로 치료하였다.

도 15에서는 동시적 항-CD19와 항-CD20 항체 치료가 부가적임을 예증한다.

도 16에서는 항-CD19 항체의 피하(s.c), 복강내(i.p.), i.v. 투여가 생체내에서 순환과 조직 B 세포를 효과적으로 고갈시킨다는 것을 예증한다.

도 17A-17B에서는 항-CD19 항체 치료가 생체내에서 hCD19⁺ 림프종 성장을 예방(도 17A)하고, 생존율(survival rate)을 증가(도 17B)시킨다는 것을 예증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 명세서에서, “항체(면역글로불린)”는 단클론 항체(전장 단클론 항체), 다클론 항체, 적어도 2개의 완전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체(가령, 이중특이적 항체), 인간 항체, 인간화 항체, 카멜화(camelised) 항체, 키메라 항체, 단일-사슬 Fv(scFv), 단일-사슬 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 원하는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편, 이황화결합-연결된 Fv(scFv), 항-이디오타입(항-Id) 항체(예로써, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함), 인트라바디(intrabody), 이들의 에피토프-결합 단편을 의미한다. 특히, 항체에는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 다시 말하면, 항원-결합 부위를 보유하는 분자가 포함된다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(가령, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, IgY), 분류(가령, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2) 또는 하위분류일 수 있다.

- [0026] 일반적으로, 고유 항체는 2개의 동일한 경쇄(L)와 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성되는, 대략 150,000 달톤의 헤테로사량체(heterotetrameric) 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 이황화결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 이황화결합 연쇄의 총수는 상이한 면역글로불린 아이소타입의 중쇄 사이에 변한다. 각 중쇄와 경쇄는 또한, 규칙적으로 이격된 사슬내 이황화결합을 보유한다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인(VH)을 보유하고, 이후 다수의 불변 도메인을 순차적으로 보유한다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인(VL) 및 다른 말단에 불변 도메인을 보유한다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 접촉면(interface)을 형성하는 것으로 생각된다. 이들 항체는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 토끼, 개, 고양이, 생쥐 등을 비롯한 임의의 포유동물로부터 유래된다.
- [0027] “가변”은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 간에 서열에서 광범위하게 상이하고, 특정 항원에 대한 각 특정 항체의 결합 특이성(binding specificity)을 주도한다는 것을 지시한다. 하지만, 가변성(variability)은 항체의 가변 도메인 전체에 균등하게 분포되지 않는다. 이는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)이라고 하는 분절(segment)에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 골격 영역(framework region, FR)이라 한다. 고유 중쇄와 경쇄의 가변 도메인은 각각, 4개의 FR 영역을 포함하고, β -시트 구조를 연결하고 특정한 경우에 이의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된 β -시트 배열(configuration)을 상당 부분 채택한다. 각 사슬 내에서 CDR은 이들 FR 영역에 의해 근접하게 유지되고, 다른 사슬로부터 CDR과 함께, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(참조: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 불변 도메인은 항원 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 항원 결합 친화성에 영향을 주고 ADCC에서 항체의 참가와 같은 다양한 작동체(effector) 기능을 보인다.
- [0028] 본 명세서에서, “초가변(hypervariable) 영역”은 항원에 대한 결합을 주도하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 영역은 “상보성 결정 영역” 또는 “CDR”으로부터 아미노산 잔기(가령, 경쇄 가변 도메인 내에서 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인 내에서 31-35(H1), 50-65(H2), 95-102(H3); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) 및/또는 “초가변 루프”로부터 잔기(가령, 경쇄 가변 도메인 내에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인 내에서 26-32(H1), 53-55(H2), 96-101(H3); Chothia and Lesk, J. Mol Biol, 196:901-917(1987))를 포함한다. “골격” 또는 “FR” 잔기는 본 명세서에서 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이고, 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디어바디(diabody), 백신바디(vaccibody), 선형 항체, 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0029] 본 명세서에서, “단클론 항체”는 실질적으로 상동한 항체의 개체군으로부터 획득되는 항체를 의미한다. 다시 말하면, 이러한 개체군을 구성하는 개별 항체는 사소한 양으로 존재하는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단클론 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원성 부위를 지향한다. 더 나아가, 상이한 결정부위(에피토프)에 대한 상이한 항체를 전형적으로 보유하는 통상적인(다클론) 항체 제조물과 대조적으로, 각 단클론 항체는 항원 상에서 단일 결정부위를 지향한다. 단클론 항체는 이러한 특이성 이외에, 다른 면역글로불린 생산 세포에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 세포에 의해 합성된다는 이점이 있다. 대안으로, 단클론 항체는 이러한 단클론 항체를 인코딩하는 중쇄와 경쇄 유전자로 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염된 세포에 의해 생산될 수도 있다.
- [0030] 수식어 “단클론”은 항체의 실질적으로 상동한 개체군으로부터 획득되는 항체 특성을 지시하고, 임의의 특정한 방법으로 항체의 가공을 요구하는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서에서, “단클론”은 항체를 가공하는 방법이 아닌, 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 비롯한 세포의 클론 개체군으로부터 유래되는 항체를 의미한다. 가령, 본 발명에 이용되는 단클론 항체는 Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)에서 처음 기술된 하이브리도마 방법으로 만들어지거나, 또는 예로써, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)과 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)에 기술된 기술을 이용한 파지 항체 라이브러리(phage antibody library)로부터 분리를 비롯한 임의의 재조합 DNA 방법(참조: U.S. Patent No. 4,816,567)으로 만들어진다. 이들 방법은 단클론 포유동물, 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디어바디, 백신바디, 선형 항체, 이중특이적 항체를 생산하는데 이용될 수 있다.
- [0031] “키메라” 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 적어도 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동하고, 사슬의 적어도 하나의 다른 부분이 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에

상동한 항체 및 원하는 생물학적 활성을 보이는 이들 항체의 단편을 의미한다(U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81:6851-6855 (1984)). 본 명세서에서 목적하는 키메라 항체는 비인간 영장류(가령, 비비(baboon), 붉은털원숭이(rhesus) 또는 필리핀원숭이(cynomolgus monkey)와 같은 구세계 원숭이(Old World Monkey))로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 “영장류화(primatized)” 항체이다(U.S. Patent No. 5,693,780).

[0032] 비인간(가령, 뮤린) 항체의 “인간화” 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래되는 최소 서열을 보유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터 잔기가 비인간 중(공여자 항체), 예를 들면, 생쥐, 쥐, 토끼, 또는 원하는 특이성, 친화성, 수용력을 보유하는 비인간 영장류의 초가변 영역으로 치환된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 골격 영역(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 치환된다. 더 나아가, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 관찰되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이들 변형은 항체 능력을 더욱 가다듬기 위하여 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로, 2개의 가변 도메인의 거의 전체를 포함하는데, 여기서 초가변 루프의 전체 또는 거의 전체가 비인간 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고, FR의 전체 또는 거의 전체가 인간 면역글로불린 서열의 FR에 상응한다. 특정 구체예에서, 인간화 항체는 면역글로불린, 전형적으로, 인간 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함한다. 더욱 상세한 내용은 Jones et al., *Nature*, 321 :522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)을 참조한다.

[0033] “인간 항체”는 인간으로부터 유래된 항체 또는 항원 공격에 대한 반응으로 특정 인간 항체를 생산하도록 “조작된” 유전자도입 생물체로부터 획득된 항체이고, 당분야에 공지된 임의의 방법으로 생산될 수 있다. 바람직한 기술에 따라, 인간 중쇄와 경쇄 좌위(locus)의 구성요소가 내생적 중쇄와 경쇄 좌위의 표적된 파괴를 보유하는 배아 줄기 세포주로부터 유래된 생물체의 균주 내로 도입된다. 이러한 유전자도입 생물체는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있고, 상기 생물체는 인간 항체-분비 하이브리도마를 생산하는데 이용될 수 있다. 인간 항체는 중쇄와 경쇄가 인간 DNA의 하나이상의 공급원으로부터 유래된 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 항체일 수도 있다. 완전 인간 항체는 유전자 또는 염색체 형질감염 방법, 파지 전사(phage display) 기술, 또는 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 형성될 수 있는데, 이들 모두 당분야에 공지되어 있다.

[0034] “CD19” 항원은 예로써, HD237 또는 B4 항체에 의해 동정된 대략 90 kDa의 항원을 지칭한다(Kiesel et al., *Leukemia Research II*, 12:1119 (1987)). CD19는 줄기 세포 단계에서부터 형질 세포로의 말단 분화까지 B-계통 세포의 전체 분화 과정에서 세포, 예를 들면, 전구-B 세포, B 세포(미경험 B 세포, 항원-자극된 B 세포, 기억 B 세포, 형질 세포, B 림프구), 여포성 수상돌기 세포에서 관찰된다. CD19는 인간 태아 조직 내에 B 세포에서도 관찰된다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체에 의해 표적되는 CD19 항원은 인간 CD19 항원이다.

[0035] “항체-의존성 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)”과 “ADCC”는 비-특이적인 세포독성 세포(가령, 자연 킬러(NK) 세포, 호중구, 대식세포)가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고 상기 표적 세포의 용해(lysis)를 유도한다는 것을 의미한다. 바람직한 구체예에서, 이들 세포는 인간 세포이다. 특정 작용 이전에 한정됨 없이, ADCC를 매개하는 세포독성 세포는 일반적으로, Fc 수용체(FcR)를 발현한다. ADCC를 매개하는 일차 세포, NK 세포는 Fc γ RIII를 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및/또는 Fc γ RIV를 발현한다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991)에 개괄된다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, U.S. Patent No. 5,500,362 또는 5,821,337에 기술된 바와 같은 시험관내 ADCC 측정법이 수행된다. 이들 측정법에 유용한 작동체 세포(effector cell)는 말초혈 단핵 세포(PBMC)와 자연 킬러(NK) 세포이다. 대안으로, 또는 부가적으로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들면, Clynes et al., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998)에 기술된 바와 같은 동물 모형에서 평가될 수 있다.

[0036] “보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity)” 또는 “CDC”는 보체의 존재에서 보체 활성화를 개시하고 표적을 용해시키는 분자의 능력을 의미한다. 보체 활성화 경로(complement activation pathway)는 동계 항원(cognate antigen)과 복합된 분자(가령, 항체)에 보체 체계(complement system)의 첫 번째 구성요소(C1q)의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예로써, Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996)에 기술된 CDC 측정이 수행된다.

[0037] “작동체 세포”는 하나이상의 FcR를 발현하고 작동체 기능을 수행하는 백혈구이다. 적절하게는, 세포는 적어도 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및/또는 Fc γ RIV를 발현하고 ADCC 작동체 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 실례는 말초혈 단핵 세포(PBMC), 자연 킬러(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포, 호중구이고, PBMC와

NK 세포가 선호된다. 바람직한 구체예에서, 작동체 세포는 인간 세포이다.

[0038] “Fc 수용체” 또는 “FcR”은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 지시한다. 바람직한 FcR은 고유 서열 인간 FcR이다. 게다가, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하는 수용체인데, 여기에는 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, Fc γ RIV 하위분류의 수용체 및 이들 수용체의 대립형질 변이체(allelic variant)와 택일적으로 절단 접합된 형태(alternatively spliced form)가 포함된다. Fc γ RII 수용체에는 Fc γ RIIA(“활성화 수용체”)와 Fc γ RIIB(“저해 수용체”)가 포함되는데, 이들은 세포질 도메인에서 일차적으로 구별되는 유사한 아미노산 서열을 보유한다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기초된 활성화 모티프(ITAM)를 보유한다. 저해 수용체 Fc γ RIIB는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기초된 저해 모티프(ITIM)를 보유한다(참조: Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcR은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995)). 앞으로 확인될 것들을 비롯한 다른 FcR은 본 명세서에서 “FcR”에 의해 포괄된다. 상기 용어에는 모계 IgG의 태아로의 전달을 주도하는 신생아 수용체, FcRn이 포함된다(Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976); Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[0039] “Fv”는 완전한 항원-인식과 결합 부위를 보유하는 최소 항체 단편이다. 상기 영역은 탄탄하게 비-공유 또는 공유 연결된 하나의 중쇄와 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 배열에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에서 항원-결합 부위(antigen-binding site)를 한정한다. 집합적으로, 6개의 CDR은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 공여한다. 하지만, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반) 역시 비록 전체 결합 부위보다 친화성이 덜하긴 하지만, 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 보유한다.

[0040] 본 명세서에 기술된 치료에 이용되는 에피토프에 대한 항체의 “친화성”은 당분야에서 널리 공지된 용어이고, 에피토프에 대한 항체의 결합 정도 또는 강도를 의미한다. 친화성은 평균 해리 상수(equilibrium dissociation constant)(KD 또는 Kd), 겉보기 평균 해리 상수(apparent equilibrium dissociation constant)(KD' 또는 Kd'), IC50(경쟁 측정에서 50% 저해를 달성하는데 필요한 양)을 비롯한 당분야에 공지된 다양한 방법으로 측정되고 및/또는 표현된다. 본 발명에서, 친화성은 에피토프에 결합하는 특정한 항체 개체군에 대한 평균 친화성이다. μ l 당 IgG mg 또는 mg/ml의 관점에서 본 명세서에 보고된 KD' 수치는 혈청(또는 혈장) μ l 당 Ig mg을 지시한다. 항체 친화성이 본 명세서에 기술된 치료 방법의 적용 또는 본 명세서에 기술된 치료 방법의 선택을 위한 기초로서 이용되는 경우에, 항체 친화성은 치료 이전에 및/또는 치료 동안 측정될 수 있고, 획득된 수치는 인간 환자가 치료에 적합한 후보인 지를 평가할 때 임상 의에 의해 이용될 수 있다.

[0041] “에피토프”는 당분야에 널리 공지된 용어이고, 항체에 특이적인 결합을 나타내는 임의의 화학적 모이어티(moiety)를 의미한다. 또한, “에피토프”는 에피토프를 보유하고, 따라서 항체에 특이적으로 결합하는 모이어티 또는 분자인 항원을 형성할 수 있다.

[0042] 본 명세서에서, “B 세포 표면 마커”는 여기에 결합하는 항원으로 표적될 수 있는 B 세포의 표면 상에 발현된 항원이다. 전형적인 B 세포 표면 마커는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86 백혈구 표면 마커이다. 특히 주목되는 B 세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B 세포 조직과 비교하여 B 세포 상에서 우선적으로 발현되고, 전구 B 세포와 성숙 B 세포 모두에서 발현된다. 한 구체예에서, 바람직한 마커는 CD19인데, 이는 프로/전구-B 세포 단계에서부터 말단 분화된 형질 세포 단계까지 B-계통 세포의 전체 분화 과정에서 B 세포 상에서 관찰된다.

[0043] 본 명세서에서, “항체 반감기”는 투여이후 항체 분자의 평균 생존 시간(mean survival time)의 척도인 항체의 약동학적 특성을 의미한다. 항체 반감기는 예로써, 혈청 또는 다른 조직에서 측정된, 환자의 신체 또는 이의 특정 구획으로부터 공지된 양의 면역글로불린의 50%를 제거하는데 필요한 시간, 다시 말하면, 순환 반감기(circulating half-life)로서 표시될 수 있다. 반감기는 각 면역글로불린 또는 각 면역글로불린 분류마다 상이하다. 전체적으로, 항체 반감기에서 증가는 투여된 항체에 대한 순환 동안 평균 체류 시간(MRT)에서 증가를 결과한다.

[0044] “아이소타입”은 항체의 범주를 의미한다. 항체의 불변 도메인은 항원에 대한 결합에 관여하지 않지만, 다양한 작동체 기능을 나타낸다. 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 특정한 항체 또는 면역글로불린은 면역글로불린의 5가지 주요한 분류 중의 하나로 지정될 수 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. 이들 분류는 하위분류(아이소타입), 예를 들면, IgG1(감마 1), IgG2(감마 2), IgG3(감마 3), IgG4 (감마 4), IgA1, IgA2로 더욱

세분된다. 상이한 분류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각, α , δ , ϵ , γ , μ 로 불린다. 상이한 종류의 면역글로불린의 구조와 3차원 배열은 널리 공지되어 있다. 다양한 인간 면역글로불린 분류 중에서, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM만 보체를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 인간 IgG1과 IgG3은 인간에서 ADCC를 매개하는 것으로 알려져 있다.

[0045] 본 명세서에서, “면역원성(immunogenicity)”은 화합물이 면역 반응(특정 항체의 생산 및/또는 특정 T 세포의 증식 촉진)을 촉진할 수 있다는 것을 의미한다.

[0046] 본 명세서에서, “항원성(antigenicity)”은 화합물이 항체에 의해 인식되거나, 또는 항체에 결합하고 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 의미한다.

[0047] 본 명세서에서, “결합 활성(avidity)”은 항체가 항원에 결합하는 전체 결합 강도(즉, 양쪽 항체 전투(antibody arms))의 척도이다. 항체 결합 활성은 당분야에 공지된 임의의 수단을 이용하여, 예를 들면, Gray et al., *J. Virol. Meth.*, 44:11-24. (1993)에 의해 기술된 바와 같은 간접적인 형광 항체의 변형으로, 항원 과잉(antigen excess)에서 항원-항체 결합의 해리를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0048] “치료”(또는 문법적으로 균등한 용어)는 개체의 질환의 심각도가 감소되거나, 적어도 부분적으로 향상되거나 또는 완화되고 및/또는 적어도 하나의 임상적 증상에서 상당한 완화, 경감 또는 감소가 달성되고 및/또는 질환의 진행에서 저해 또는 지연 및/또는 질병이나 질환의 발병의 예방 또는 지연이 달성된다는 것을 의미한다. 따라서, “치료”(또는 문법적으로 균등한 용어)는 예방과 치료 처방을 모두 의미한다.

[0049] 본 명세서에서, 특정한 결과를 달성할 만큼 “충분한 양”은 원하는 효과, 선택적으로, 치료 효과(즉, 치료 효과량의 투여에 의한)를 유도하는데 효과적인, 본 발명의 항체 또는 조성물의 양을 의미한다. 가령, “충분한 양”은 B 세포를 고갈시키는데 효과적인 양이다.

[0050] 본 명세서에서, “치료 효과량”은 개체에 상당한 향상 또는 이익을 제공하는 양이다. 대안으로, “치료 효과량”은 적어도 하나의 임상 증상에서 상당한 완화, 경감 및/또는 감소를 제공하는 양이다. 본 발명의 방법으로 치료될 수 있는 질환과 연관된 임상 증상은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 더 나아가, 당업자는 상당한 이익이 개체에게 제공되는 한, 이들 치료 효과가 완전하거나 치료 효능이 있을 필요가 없다.

[0051] 본 발명은 인간 CD19 항원에 결합하는 치료 항체, 바람직하게는, 인간 ADCC를 매개하는 치료 항체를 이용하여, B 세포 악성종양과 같은 인간 개체에서 B 세포 질환과 질병을 치료하기 위한 면역치료 조성물과 방법에 관계한다. 본 발명은 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 적절하게는, 본 발명은 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 당분야에 공지된 수단으로 생산될 수 있는 단클론 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물에 관계한다.

[0052] 치료 제제(formulation)와 처방(regimen)은 급성 림프성 백혈병(ALL), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 다발성 골수종, 여포성 림프종, 외투 세포(mantle cell) 림프종, 전림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 통상적인 급성 림프구성 백혈병, 일부 무-급성 림프아구성 백혈병을 비롯한, B 세포와 이들의 전구체로부터 유래되는 B 세포 악성종양으로 진단된 인간 개체를 치료하는데 적용된다.

[0053] 1. 항-CD19 항체의 생성

[0054] 1.1. 다클론 항-CD19 항체

[0055] 적절하게는, 다클론 항체는 유관한 항원과 어쥬번트의 복수 피하(sc) 또는 복강내(i.p.) 주입에 의해 동물 내에서 생성된다. 이는 이중기능성 또는 유도체와 작용제, 예를 들면, 말레이미도베르조일 설포숙신이미드 에스테르(maleimidobertzoyl sulfosuccinimide ester)(시스테인 잔기를 통한 공액), N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide)(리신 잔기를 통한 공액), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 숙신산 무수물(succinic anhydride), SOCl_2 를 이용하여, 면역접종되는 종 내에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린(bovine thyroglobulin), 또는 콩 트립신 저해물질(soybean trypsin inhibitor)에 이러한 유관한 항원을 공액하는데 유용하다.

[0056] 동물은 예로써, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 공액체(각각, 토끼 또는 생쥐에 대한)를 3 볼륨(volume)의 Freund 완전 어쥬번트와 혼합하고 생성 용액을 복수 부위에 피내 주입함으로써 항원, 면역원성 공액체, 또는 유도체에 대하여 면역접종한다. 1개월후, 이들 동물은 Freund 불완전 어쥬번트에 담긴 초기량의 1/5 내지 1/10의

펩티드 또는 공액체로 복수 부위에 피하 주입에 의해 추가 면역한다. 7 내지 14일후, 이들 동물은 채혈하고, 혈청은 항체 역가(antibody titer)를 측정한다. 동물은 역가 고원기(titer plateau)까지 추가 면역한다. 적절하게는, 동물은 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교-결합 시약(cross-linking reagent)을 통하여 동일한 항원의 공액체로 더욱 면역한다. 공액체는 또한, 재조합 세포 배양액 내에서 단백질 융합체로서 만들어질 수도 있다. 또한, 면역 반응을 향상시키기 위하여 명반(alum)과 같은 응집제(aggregating agent)가 적절히 사용된다.

[0057] 1.2. 단클론 항-CD19 항체

[0058] 본 발명의 단클론 항-CD19 항체는 인간 CD19 항원에 결합 특이성을 나타내고, 가급적, 인간 ADCC를 매개할 수 있다. 이들 항체는 하이브리도마, 재조합, 파지 전사 기술, 또는 이들의 조합의 이용을 비롯한 당분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 산출할 수 있다. 항체는 단일 항원 부위에 고도로 특이적이고 이를 지향한다. 더 나아가, 전형적으로, 상이한 결정부위(에피토프)를 지향하는 상이한 항체를 포함하는 통상적인(다클론) 항체 제조물과 대조적으로, 각 단클론 항체는 인간 CD19 항원 상에서 단일 결정부위를 지향한다. 가령, 본 발명에 이용되는 단클론 항체는 Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)에 최초로 기술된 하이브리도마 방법으로 생산되는데, 이는 뮤린 항체(또는 다른 비인간 포유동물, 예를 들면, 쥐, 염소, 양, 말, 낙타 등으로부터 유래된 항체), 또는 유전자도입 동물로부터 유래된 인간 항체를 산출하는데 이용될 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,075,181, 6,114,598, 6,150,584, 6,657,103). 대안으로, 단클론 항체는 재조합 DNA 방법(참조: U.S. Patent No. 4,816,567)에 의해 생산될 수 있는데, 여기에는 키메라와 인간화 항체가 포함된다. “단클론 항체”는 예로써, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)과 Marks et al., *J. Mol Biol*, 222:581-597 (1991)에 기술된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다.

[0059] 조작된 항-CD19 항체는 당분야에 공지된 임의의 수단으로 생산될 수 있는데, 여기에는 아래에 기술된 기술 및 이들 기술에서 개량된 기술이 포함된다. 대규모 고수율 생산은 전형적으로, 조작된 항-CD19 항체를 생산하는 숙주 세포를 배양하고 숙주 세포 배양액으로부터 항-CD19 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0060] 1.3. 하이브리도마 기술

[0061] 단클론 항체는 당분야에 공지되고, 예로써 Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)에서 교시된 것들을 비롯한 하이브리도마 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 가령, 하이브리도마 방법에서, 생쥐 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들면, 햄스터 또는 마카쿠 원숭이(macaque monkey)는 면역접종되어, 면역접종에 이용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안으로, 림프구는 시험관내에서 면역접종될 수도 있다. 이후, 림프구는 적절한 융합제(fusing agent), 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0062] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포는 가급적, 융합되지 않은 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적절한 배양 배지 내에 접종되고 배양된다. 가령, 부모 골수종 세포에서 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 전이효소(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase)(HGPRT 또는 HPRT)가 결핍되면, 이들 하이브리도마에 대한 배양 배지는 전형적으로, HGPRT-결합 세포의 성장을 예방하는 물질인 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin), 티미딘(thymidine)(HAT 배지)을 포함한다.

[0063] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정적이고 높은 수준의 생산을 뒷받침하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다. 이들 중에서, 선호되는 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들면, the SaIk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA로부터 입수가 가능한 MOPC-21과 MPC-11 생쥐 종양 및 the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8.653 세포로부터 유래된 것들이다. 인간 단클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종과 생쥐-인간 헤테로골수종 세포주 역시 보고되었다(Kozbor, *J Immunol*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0064] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 인간 CD19 항원을 지향하는 단클론 항체의 생산을 검사한다. 적절하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단클론 항체의 결합 특이성은 면역침전(immunoprecipitation) 또는 시험관내에서 결합 측정, 예를 들면, 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 측정법

(enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA)으로 결정된다.

- [0065] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인되면, 이들 클론은 회식 절차를 제한함으로써 서브클론되고 표준 방법으로 성장된다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 이런 목적에 적합한 배양 배지는 예로써, D-MEM 또는 RPMI 1640 배지이다. 이에 더하여, 하이브리도마 세포는 동물 내에서 복수(ascite) 종양으로서 생체내에서 성장된다.
- [0066] 이들 서브클론에 의해 분리된 단클론 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들면, 단백질 A-세파로오스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화력 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수, 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0067] 1.4. 재조합 DNA 기술
- [0068] 본 발명의 항-CD19 항체를 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여(가령, 항-CD19 항체의 중쇄와 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용하여) 편의하게 분리되고 염기서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이런 DNA의 선호되는 공급원으로서 기능한다. 일단 분리된 DNA는 발현 벡터 내로 위치되고, 상기 벡터는 대장균(*E. coli*) 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역글로불린을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염되어 재조합 숙주 세포 내에서 항-CD19 항체의 합성을 달성한다.
- [0069] 파지 전시(phage display) 방법에서, 기능적 항체 도메인은 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 운반하는 파지 입자의 표면 상에서 전시된다. 특히, V_H 와 V_L 도메인을 인코딩하는 DNA 서열은 동물 cDNA 라이브러리(가령, 병든 조직의 인간 또는 뮤린 cDNA 라이브러리)로부터 증폭된다. V_H 와 V_L 도메인을 인코딩하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재조합되고 파지미드 벡터(phagemid vector) 내로 클론된다. 상기 벡터는 대장균(*E. coli*) 내로 전기천공되고, 상기 대장균(*E. coli*)은 보조 파지(helper phage)로 감염된다. 이들 방법에 이용된 파지는 전형적으로, fd와 M13을 비롯한 섬유성 파지(filamentous phage)이고, V_H 와 V_L 도메인은 일반적으로, 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합 방식으로 융합된다. 특정 항원에 결합하는 항원-결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들면, 표지된 항원, 또는 고체 표면이나 비드(bead)에 결합되거나 포획된 항원을 이용하여 선별되거나 확인될 수 있다. 본 발명의 항체를 만드는데 이용될 수 있는 파지 전시 방법의 실례에는 Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames et al., 1995, *J Immunol. Methods*, 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene*, 187:9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology*, 57:191-280; International Application No. PCT/GB91/01134; International Publication No. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, WO97/13844; U.S. Patent No. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743, 5,969,108).
- [0070] 상기 참고문헌에서 기술된 바와 같이, 파지 선별이후, 상기 파지로부터 항체 코딩 영역은 분리되고 인간 항체를 비롯한 전체 항체, 또는 임의의 다른 원하는 항원-결합 단편을 산출하는데 이용되며, 예로써 아래에 기술된 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 세균을 비롯한 임의의 원하는 숙주 내에서 발현될 수 있다. 예로써, PCT Publication No. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques*, 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI*, 34:26-34; Better et al., 1988, *Science*, 240:1041-1043에 기술된 것들과 같은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 Fab, Fab', F(ab')₂ 단편을 재조합 방식으로 생산하는 기술 역시 당분야에 공지되어 있다.
- [0071] 다른 구체예에서, 항체는 McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)에 기술된 기술을 이용하여 산출된 항체 파지 라이브러리로부터 분리된다. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)과 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)에서는 각각, 파지 라이브러리를 이용하여 뮤린과 인간 항체의 분리를 기술한다. 사슬 셔플링(chain shuffling)이 높은 친화성(nM 범위) 인간 항체의 생산에 이용될 수 있고(Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), 조합 감염(combinatorial infection)과 in vivo 재조합이 대규모 파지 라이브러리를 작제하기 위한 전략으로서 이용될 수 있다(Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). 따라서, 이들 기술은 항-CD19 항체의 분리를 위한 전통적인 단클론 항체 하이브리도마 기술에 실행가능한 대안이다.

- [0072] 전체 항체를 산출하기 위하여, V_H 또는 V_L 뉴클레오타이드 서열을 보유하는 PCR 프라이머, 제한 부위(restriction site) 및 상기 제한 부위를 보호하는 측면 서열이 scFv 클론 내에서 V_H 또는 V_L 서열을 증폭하는데 이용될 수 있다. 당업자에게 공지된 클로닝 기술을 이용하여, PCR 증폭된 V_H 도메인은 V_H 불변 영역, 예를 들면, 인간 감마 4 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 클론될 수 있고, PCR 증폭된 V_L 도메인은 V_L 불변 영역, 예를 들면, 인간 카파 또는 람다 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 클론될 수 있다. 적절하게는, V_H 또는 V_L 도메인을 발현하는 벡터는 EF-1 α 프로모터, 분비 신호(secretion signal), 가변 도메인에 대한 클로닝 부위, 불변 도메인 및 네오마이신과 같은 선택 마커(selection marker)를 포함한다. 이들 V_H 와 V_L 도메인은 필요한 불변 영역을 발현하는 하나의 벡터 내로 클론될 수도 있다. 중쇄 전환 벡터와 경쇄 전환 벡터는 이후, 당업자에게 공지된 기술을 이용하여, 세포주 내로 동시-형질감염되고 전장 항체, 예를 들면, IgG를 발현하는 안정적인 또는 일시적인 세포주를 산출한다.
- [0073] DNA는 예로써, 상동한 류린 서열 대신에 인간 중쇄와 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써(U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 연결함으로써 변경될 수도 있다.
- [0074] 1.5. 키메라 항체
- [0075] 본 명세서에 명시된 항-CD19 항체에는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 일치하거나 이에 상동하고, 또는 특정 항체 분류 또는 하위분류에 속하고, 사슬의 다른 부분이 다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 일치하거나 이에 상동하고, 또는 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 키메라 항체(면역글로불린) 및 원하는 생물학적 활성을 보인다는 조건에서 이들 항체의 단편이 포함된다(U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). 목적하는 키메라 항체에는 비인간 영장류(가령, 비비(baboon), 붉은털원숭이(rhesus) 또는 필리핀원숭이(cynomolgus monkey)와 같은 구세계 원숭이(Old World Monkey))로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 “영장류화(primatized)” 항체가 포함된다(U.S. Patent No. 5,693,780).
- [0076] 1.6. 인간화 항체
- [0077] 인간화 항체는 CDR-이식(grafting)(참조: European Patent No. EP 239,400; International Publication No. WO 91/09967; U.S. Patent No. 5,225,539, 5,530,101, 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)(참조: European Patent No. EP 592,106 & EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973), 사슬 셔플링(chain shuffling)(참조: U.S. Patent No. 5,565,332) 및 예로써, U.S. Patent No. 6,407,213, U.S. Patent No. 5,766,886, International Publication No. WO 9317105, Tm et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994)에 개시된 기술이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 당분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 종종, 항원 결합을 변화, 바람직하게는, 향상시키기 위하여 골격 영역 내에 골격 잔기가 CDR 공여자 항체로부터 상응하는 잔기로 치환된다. 이들 골격 치환은 당분야에 널리 공지된 방법, 예를 들면, 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하는 CDR과 골격 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 예외적인 골격 잔기를 확인하는 서열 비교에 의해 확인된다(참조: Queen et al., U.S. Patent No. 5,585,089; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323).
- [0078] 인간화 항-CD19 항체는 비인간 출처로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종, “수입” 잔기로 지칭되는데, 이들 잔기는 전형적으로, “수입” 가변 도메인으로부터 유래된다. 따라서, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린 분자로부터 하나 이상의 CDR 및 인간으로부터 골격 영역을 포함한다. 항체의 인간화(humanization)는 당분야에 널리 공지되어 있고, 본질적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써, 다시 말하면, CDR-이식(EP 239,400; PCT Publication No. WO 91/09967; U.S. Patent No. 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640)으로, Winter 등의 방법(Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et

al., *Science*, 239:1534-1536 (1988))에 따라 수행될 수 있다. 이런 인간화 키메라 항체에서, 완전한 인간 가변 도메인의 극히 일부가 비인간 종으로부터 상응하는 서열로 치환된다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 일부 CDR 잔기 및 아마도, 일부 FR 잔기가 설치류 항체에서 유사한 부위로부터 잔기로 치환된 인간 항체이다. 항-CD19 항체의 인간화는 베니어링(veneeding) 또는 리서페이싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., *PNAS*, 91 :969-973 (1994)), 또는 사슬 셔플링(chain shuffling)(U.S. Patent No. 5,565,332)에 의해 달성될 수 있다.

[0079] 인간화 항체를 만드는데 이용되는 경쇄와 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키기 위한 것이다. 소위 “최적-적합” 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대하여 스크리닝된다. 설치류의 서열에 가장 가까운 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 골격(FR)으로서 수용된다(Sims et al., *J. Immunol*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol Biol*, 196:901 (1987)). 다른 방법에서는 경쇄 또는 중쇄의 특정 부분집합의 전체 인간 항체의 일치 서열로부터 유래된 특정 골격을 이용한다. 여러 상이한 인간화 항-CD19 항체에 대하여 동일한 골격이 이용될 수도 있다(Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Vresta et al., *J. Immunol*, 151:2623 (1993)).

[0080] 항-CD19 항체는 CD19에 대한 높은 친화성 및 다른 긍정적인 생물학적 특성을 유지하면서 인간화될 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, 인간화 항체는 부모 서열과 인간화 서열의 3차원 모형을 이용한 부모 서열과 다양한 개념적 인간화 산물의 분석 과정으로 제조된다. 3차원 면역글로불린 모형은 편의하게 구입가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선별된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 전시하는 컴퓨터 프로그램은 입수가능하다. 이들 전시의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능 역할의 분석, 다시 말하면, CD19에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 원하는 항체 특성, 예를 들면, CD19에 대한 증가된 친화성이 달성되도록 수용자와 수인 서열로부터 선별되고 결합될 수 있다. 일반적으로, 이들 CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 주는데 직접적으로 현저하게 관여한다.

[0081] “인간화” 항체는 원래 항체와 유사한 항원 특이성, 다시 말하면, 본 발명에서, 인간 CD19 항원에 결합하는 능력을 유지한다. 하지만, 특정한 인간화 방법을 이용하는 경우에, 인간 CD19 항원에 대한 항체의 결합의 친화성 및/또는 특이성은 Wu et al., *J. Mol. Biol*, 294:151 (1999)에 기술된 바와 같이 “지향된 진화(directed evolution)”를 이용함으로써 증가된다.

[0082] 1.7. 인간 항체

[0083] 인간에서 항체의 생체내 이용의 경우에, 인간 항체를 이용하는 것이 바람직하다. 완전 인간 항체는 인간 개체의 치료 처리에 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용한 앞서 기술된 과거 전시 방법을 비롯한 당분야에 공지된 여러 방법 및 이들 방법의 개선된 방법으로 만들 수 있다 (참조: U.S. Patent No. 4,444,887과 4,716,111; PCT publications WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 91/10741). 인간 항체는 또한, 중쇄와 경쇄가 인간 DNA의 하나 이상의 출처로부터 유래된 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 항체일 수 있다.

[0084] 인간 항-CD19 항체는 또한, 기능적 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 유전자도입 생쥐를 이용하여 생산될 수도 있다. 가령, 인간 중쇄와 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체가 무작위로 또는 상동성 재조합(homologous recombination)으로 생쥐 배아 줄기 세포 내로 도입된다. 대안으로, 인간 가변 영역, 불변 영역, 다양성(diversity) 영역이 인간 중쇄와 경쇄 유전자 이외에 생쥐 배아 줄기 세포 내로 도입된다. 생쥐 중쇄와 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의한 인간 면역글로불린 좌위의 도입으로, 개별적으로 또는 동시에 비-기능화된다. 가령, 키메라 생쥐와 생식세포계 변이 생쥐에서 항체 중쇄 연결 영역(J_H) 유전자의 동종접합성 결실(homozygous deletion)은 내인성 항체 생산의 완전한 저해를 유도하는 것으로 보고되었다. 변형된 배아 줄기 세포는 키메라 생쥐를 생산하기 위하여 증폭되고 배반포(blastocyst) 내로 미세주입된다. 이후, 키메라 생쥐는 교배하여 인간 항체를 발현하는 동종접합성 자손을 산출한다. 이들 유전자도입 생쥐는 선별된 항원, 다시 말하면, 본 발명의 폴리펩티드의 전체 또는 일부분으로 통상적인 방식으로 면역접종된다. 인간 CD19 항원을 지향하는 항-CD19 항체는 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여, 면역접종된 유전자도입 생쥐로부터 획득될 수 있다. 이들 유전자도입 생쥐가 보유하는 인간 면역글로불린 도입유전자(transgene)는 B 세포 분화 동안 재정렬되고, 클래스 전환(class switching)과 체세포 돌연변이(somatic mutation)가 진행된다. 따라서, 이런 기술을 이용함으로써, IgG1(감마 1)과 IgG3을 비롯한 치료에 유용한 IgG, IgA, IgM, IgE 항체를 생산하는 것이 가능하다. 인간 항체를 생산하기 위한 이러한 기술의 개관은 Lonberg and

Huszar, *Int. Rev. Immunol*, 13:65-93 (1995)을 참조한다. 인간 항체와 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 기술 및 이들 항체를 생산하기 위한 프로토콜의 상세한 논의는 예로써, PCT Publication No. WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735 및 U.S. Patent No. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318, 5,939,598을 참조한다. 이에 더하여, Abgenix, Inc.(Freemont, CA)와 Genpharm(San Jose, CA)와 같은 기업은 앞서 기술된 것과 유사한 기술을 이용하여, 선별된 항원을 지향하는 인간 항체를 제공할 수 있다. 항원 공격 이후 인간 항체의 생산을 결과하는, 생식세포계 변이 생쥐 내에 인간 생식세포계 면역글로불린 유전자 어레이의 전달에 관한 구체적인 논의는 Jakobovits et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol*, 7:33 (1993); Duchosal et al., *Nature*, 355:258 (1992)를 참조한다.

[0085] 인간 항체는 또한, 파지-전사 라이브러리로부터 유래될 수 있다(Hoogenboom et al., *J. Mol Biol*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol Biol*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al., *Nature Biotech.*, 14:309 (1996)). 파지 전사 기술(McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990))은 번역되지 않은 공여자로부터 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터, 시험관내에서 인간 항체와 항체 단편을 생산하는데 이용될 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 섬유성 박테리오파지, 예를 들면, M13 또는 fd의 메이저 또는 마이너 외피 단백질 유전자 내로 인-프레임(in-frame) 클론되고 파지 입자의 표면 상에서 기능적 항체 단편으로서 전사된다. 섬유성 입자가 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 사본을 보유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선별 역시 이들 특성을 나타내는 항체를 인코딩하는 유전자의 선별을 결과한다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성 중에서 일부를 모방한다. 파지 전사는 다양한 양식으로 수행될 수 있다: 이들의 개관을 위하여, 예로써 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)를 참조한다. 파지 전사를 위하여 V-유전자 분절의 여러 출처가 이용될 수 있다. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)에서는 번역되지 않은 생쥐의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합 라이브러리(combinatorial library)로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 분리하였다. 본질적으로, Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), 또는 Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)에 기술된 방법에 따라, 번역되지 않은 인간 공여자로부터 V 유전자의 레퍼토리가 작제될 수 있고, 항원의 다양한 어레이(자기-항원 포함)에 대한 항체가 분리될 수 있다(참조: U.S. Patent No. 5,565,332와 5,573,905).

[0086] 인간 항체는 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 산출될 수도 있다(참조: U.S. Patent 5,567,610와 5,229,275). 인간 항체는 Roder et al., *Methods Enzymol*, 121:140-167 (1986)에 기술된 것과 같은 하이브리도마 기술을 이용하여 시험관내에서 산출될 수도 있다.

[0087] 1.8. 변형된/변이 항체

[0088] 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 변이 항체일 수 있다. 본 명세서에서, “항체 변이체” 또는 “변형된 항체”는 항-CD19 항체의 하나이상의 아미노산 잔기가 변형된 항-CD19 항체의 아미노산 서열 변이체를 의미한다. 항-CD19 항체의 아미노산 서열의 변형에는 항원에 대한 항체의 친화성 또는 결합 활성을 향상시키는 서열 변형 및/또는 작동체 기능을 향상시키는 항체의 Fc 부분 변형이 포함된다. 이들 변형은 임의의 공지된 항-CD19 항체 또는 본 명세서에 기술된 바와 같이 확인된 항-CD19 항체에서 달성된다.

[0089] 이들 변형된 항체는 필연적으로, 공지된 항-CD19 항체와 100% 이하의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 바람직한 구체예에서, 변형된 항체는 항-CD19 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 또는 75%, 더욱 바람직하게는, 적어도 80%, 더욱 바람직하게는, 적어도 85%, 더욱 바람직하게는, 적어도 90%, 가장 바람직하게는, 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 보유한다. 바람직한 구체예에서, 변형된 항체는 항-CD19 항체의 중쇄 CDR1, CDR2, 또는 CDR3의 아미노산 서열과 적어도 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 또는 75%, 더욱 바람직하게는, 적어도 80%, 더욱 바람직하게는, 적어도 85%, 더욱 바람직하게는, 적어도 90%, 가장 바람직하게는, 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 보유한다. 바람직한 구체예에서, 변형된 항체는 인간 CD19 결합 능력을 유지한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 HB12a의 중쇄에 상응하는 SEQ ID NO:2(도 5A)의 아미노산 서열에 대략 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상 동일한 중쇄를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 HB12b의 중쇄에 상응하는 SEQ ID NO:4(도 5B)의 아미노산 서열에 대략 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상 동일한 중쇄를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 HB12a의 경쇄에 상응하는 SEQ ID NO:16(도 6A)의 아미노산 서열에 대략 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상 동일한 경쇄를 포함한다. 특정 구체예

에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 HB12b의 경쇄에 상응하는 SEQ ID NO:18(도 6B)의 아미노산 서열에 대략 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상 동일한 경쇄를 포함한다. HB12a와 HB12b 항-CD19 항체를 생산하는 하이브리도마는 ATCC 수탁 번호 PTA-6580과 PTA-6581 하에 기탁되었다.

[0090] 상기 서열과 관련한 동일성 또는 유사성은 최대 서열 동일성 비율을 달성하기 위하여 후보 서열 내에 아미노산 잔기와 항-CD19 항체 잔기를 정렬하고, 필요한 경우에 갭(gap)을 도입한 이후, 항-CD19 항체 잔기에 동일한 잔기 또는 유사한 잔기(즉, 동일한 측쇄 특성에 기초한 동일한 군으로부터 아미노산 잔기, 하기 참조)의 비율로서 정의된다. N-말단, C-말단, 또는 가변 도메인의 외부에서 내부 신장, 결실 또는 항체 서열 내로 삽입은 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 주는 것으로 간주되지 않는다.

[0091] 당분야에서, “동일성 %”는 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드를 비교함으로써 결정되는, 이들 두 서열 사이의 상관관계의 척도이다. 일반적으로, 비교되는 2개의 서열은 이들 서열 사이에 최대 상관관계를 제공하도록 정렬된다. 이들 두 서열의 정렬은 검사하고, 이들 사이에 아미노산 또는 뉴클레오티드가 정확하게 일치하는 위치의 총수를 결정하고, 이를 정렬의 전체 길이로 나누고 여기에 100%를 곱하여 동일성 % 수치를 얻는다. 이러한 동일성 % 수치는 동일하거나 매우 유사한 길이를 보유하고 매우 동일한 서열에서는 비교되는 서열의 전장에서 결정되고, 불균형 길이를 보유하거나 상동성 수준이 낮은 서열에서는 더욱 짧은 정의된 길이에서 결정된다.

[0092] 가령, 서열은 “.aln” 확장자를 갖는 파일을 산출하는 Unix 하의 소프트웨어 clustalw로 정렬될 수 있고, 상기 파일은 .aln 파일을 여는 Bioedit 프로그램(Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98) 내로 불러올 수 있다. Bioedit 윈도우에서, 개별 서열(한번에 2개)을 선택하고 이들을 정렬할 수 있다. 이러한 방법은 전체 서열의 비교가 가능하다.

[0093] 2개 이상의 서열의 동일성을 비교하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 가령, Wisconsin Sequence Analysis Package, 버전 9.1(Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) 프로그램이 이용가능하다. 두 서열 사이에서 동일성 비율의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 가령, 프로그램 BESTFIT와 GAP을 이용하여 2개의 폴리뉴클레오티드 사이에 동일성 % 및 2개의 폴리펩티드 서열 사이에 동일성 %를 결정할 수 있다. BESTFIT는 Smith and Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2:482-489, 1981)의 “국소 상동성(local homology)” 알고리즘을 이용하고 두 서열 사이에 유사성의 최적 단일 영역을 찾는다. BESTFIT는 길이가 상이한 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 서열을 비교하는데 더욱 적합하며, 상기 프로그램은 짧은 서열이 긴 서열의 일부라고 가정한다. 이에 비하여, GAP은 2개의 서열을 정렬하여 Needleman과 Wunsch(J. Mol. Biol., 48:443-354, 1970)의 알고리즘에 따라 “최대 유사성”을 찾는다. GAP은 대략적으로 동일한 길이를 보유하고 전체 길이에서 정렬이 예상되는 서열을 비교하는데 더욱 적합하다. 적절하게는, 각 프로그램에 이용되는 “갭 가중(Gap Weight)”과 “길이 가중(Length Weight)”은 각각, 폴리뉴클레오티드의 50과 3이고 폴리펩티드의 경우에 12와 4이다. 적절하게는, 동일성 %와 유사성 %는 비교되는 두 서열이 최적으로 정렬될 때 측정된다.

[0094] 서열 사이에 동일성 및/또는 유사성을 결정하는 다른 프로그램은 당분야에 공지되어 있는데, 예를 들면, BLAST 계열의 프로그램(Karlin & Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268; Karlin & Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877; the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA; the NCBI의 홈페이지: www.ncbi.nlm.nih.gov)이다. 이들 프로그램은 두 서열의 비교에 이용되는 수학적 알고리즘의 바람직한 무-제한적 실례이다. 이런 알고리즘은 Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410의 NBLAST와 XBLAST 프로그램으로 통합된다. NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드길이(wordlength) = 12로 BLAST 뉴클레오티드 검색을 수행하여 본 발명의 항-CD19 항체의 전체 또는 일부를 인코딩하는 핵산 분자에 상동한 뉴클레오티드 서열을 획득할 수 있다. XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드길이 = 3으로 BLAST 단백질 검색을 수행하여 본 발명의 단백질 분자에 상동한 아미노산 서열을 획득할 수 있다. 비교 목적으로 갭(gap)이 있는 정렬을 획득하기 위하여, Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402에 기술된 바와 같이 Gapped BLAST를 이용할 수 있다. 대안으로, PSI-Blast를 이용하여 분자 사이에 원연 관계(distant relationship)를 검출하는 반복 검색(iterated search)을 수행할 수 있다. BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast 프로그램을 이용하는 경우에, 개별 프로그램(가령, XBLAST와 NBLAST)의 디폴트 파라미터(default parameter)가 이용될 수 있다(참조: http://www.ncbi.nlm.nih.gov). 서열 비교에 이용되는 수학적 알고리즘의 다른 바람직한 무-제한적 실례는 Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17의 알고리즘이다. 이런 알고리즘은 GCG

서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)으로 통합된다. 아미노산 서열을 비교하기 위하여 ALIGN 프로그램을 이용하는 경우에, PAM120 가중 잔기 테이블(weight residue table), 12의 갭 길이 페널티(gap length penalty), 4의 갭 페널티(gap penalty)가 이용될 수 있다.

[0095] 당분야에 공지된, 서열 사이에 동일성 및/또는 유사성을 결정하기 위한 프로그램의 다른 무-제한적 실례는 FASTA(Pearson W.R. and Lipman D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988; Wisconsin Sequence Analysis Package의 일부)이다. 적절하게는, BLOSUM62 아미노산 치환 매트릭스(Henikoff S. and Henikoff J.G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992)가 폴리펩티드 서열 비교에 이용되는데, 여기서 뉴클레오티드 서열은 비교에 앞서 아미노산 서열로 번역된다.

[0096] 아미노산 서열 사이에 동일성 및/또는 유사성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 프로그램의 또 다른 무-제한적 실례는 SeqWeb 소프트웨어(GCG Wisconsin Package에 웹-기초된 인터페이스: Gap 프로그램)인데, 이는 상기 프로그램의 디폴트 알고리즘과 파라미터 설정: blosum62, 갭 가중(gap weight) 8, 길이 가중(length weight) 2로 이용된다. 두 서열 사이에 동일성 %는 갭을 허용하거나 허용하지 않는, 앞서 기술된 것들과 유사한 기술을 이용하여 결정될 수 있다. 동일성 %를 산정함에 있어, 전형적으로 정확한 정합(match)이 계산된다.

[0097] 적절하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 조회(query) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 동일성 %를 결정하는데 프로그램 BESTFIT가 이용되는데, 상기 조회 서열과 참고 서열은 최적으로 정렬되고 상기 프로그램의 파라미터는 디폴트 수치로 설정된다.

[0098] 변형된 항체를 산출하기 위하여, 하나 이상의 아미노산 변형(가령, 치환)이 종-의존성 항체의 하나 이상의 추가변 영역 내에 도입된다. 대안으로, 또는 부가적으로, 골격 영역 잔기의 하나 이상의 변형(가령, 치환)이 항-CD19 항체 내에 도입되는데, 여기서 이들은 두 번째 포유동물 종으로부터 항원에 대한 이러한 항체 변이체의 결합 친화성을 향상시킨다. 변형되는 골격 영역 잔기의 실례는 항원에 비-공유적으로 직접 결합하는 골격 영역 잔기(Amit et al., *Science*, 233:747-753 (1986)); CDR의 배열과 상호작용하거나 이에 영향을 주는 골격 영역 잔기(Chothia et al., *J. Mol Biol*, 196:901-917 (1987)); 및/또는 VL-VH 인터페이스(EP 239 400B1)에 참여하는 골격 영역 잔기이다. 특정 구체예에서, 이와 같은 하나 이상의 골격 영역 잔기의 변형은 두 번째 포유동물 종으로부터 항원에 대한 이러한 항체 변이체의 결합 친화성을 향상시킨다. 가령, 대략 1 내지 5개의 골격 잔기가 본 발명의 이러한 구체예에서 변형된다. 때때로, 이는 추가변 영역 잔기 중에서 어느 것도 변형되지 않은 경우에도 전임상 시험에서 이용하기 적합한 항체 변이체를 산출하는데 충분하다. 하지만, 통상적으로, 변형된 항체는 부가적인 추가변 영역 변형을 포함한다.

[0099] 변형되는 추가변 영역 잔기는 무작위로 변형되는데, 특히, 두 번째 포유동물 종으로부터 항원에 대한 항-CD19 항체의 출발 결합 친화성은 이런 무작위로 변형되고 생산된 항체가 용이하게 스크리닝될 수 있도록 한다.

[0100] 이런 변형된 항체를 산출하는데 유용한 한가지 절차는 “알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis)” (Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989))이라 한다. 여기서, 하나 이상의 추가변 영역 잔기는 이들 아미노산과 두 번째 포유동물 종으로부터 항원의 상호작용에 영향을 주기 위하여 알라닌 또는 폴리알라닌 잔기로 대체된다. 이들 치환에 기능적 감수성(functional sensitivity)을 나타내는 이들 추가변 영역 잔기는 치환 부위에 부가적인 또는 다른 돌연변이를 도입함으로써 개량된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되는 반면, 돌연변이의 성격은 미리 결정될 필요가 없다.

[0101] 이런 변형된 항체를 산출하기 위한 다른 절차는 파지 전시를 이용한 친화성 성숙(affinity maturation)이다 (Hawkins et al., *J. Mol Biol*, 254:889-896 (1992); Lowman et al., *Biochemistry*, 30(45):10832-10837 (1991)). 간단히 말하면, 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 산출하기 위하여 여러 개의 추가변 영역 부위(가령, 6-7개 부위)가 돌연변이된다. 이렇게 산출된 항체 변이체는 각 입자 내에서 포장된 M13의 유전자 III 산물에 융합체로서 섬유성 파지 입자로부터 일가 방식으로 전시된다. 이들 파지-전시된 변이체는 이후, 본 명세서에 기술된 바와 같이 그들의 생물학적 활성(가령, 결합 친화성)을 스크리닝한다.

[0102] 항체 서열 내에서 돌연변이에는 치환, 내부 결실을 비롯한 결실, 융합 산물을 산출하는 부가를 비롯한 부가, 또는 아미노산 서열 내에서 및/또는 아미노산 서열에 인접하여 “침묵” 변화(이러한 변화는 기능적으로 균등한 항-CD19 항체를 생산한다)를 결과하는 아미노산 잔기의 보존성 치환이 포함된다. 보존성 아미노산 치환은 관련되는 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친화성에서 유사성에 기초하여 달성된다. 가령, 비-극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루이신, 이소루이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌 등이 포함된다; 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민 등이 포

함된다; 양으로 하전된(염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신, 히스티딘 등이 포함된다; 음으로 하전된(음성) 아미노산에는 아스파라긴산과 글루타민산이 포함된다. 이에 더하여, 글리신과 프롤린은 사슬 방향(chain orientation)에 영향을 줄 수 있는 잔기이다. 비-보존성 치환은 이들 중에서 한 분류의 구성원을 다른 분류로의 교체에 관계할 것이다. 더 나아가, 원하는 경우에, 비-고전적인 아미노산 또는 화학적 아미노산 유도체가 치환 또는 부가로서 항체 서열 내에 도입될 수 있다. 비-전통적 아미노산에는 통상적인 아미노산의 D-이성질체, α -아미노 이소부티릭산(isobutyric acid), 4-아미노부티릭산, Abu, 2-아미노 부티릭산, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6-아미노 헥사논산(hexanoic acid), Aib, 2-아미노 이소부티릭산, 3-아미노 프로피온산(propionic acid), 오르니틴(ornithine), 노르루이신(norleucine), 노르발린(norvaline), 하이드록시프롤린, 사르코신(sarcosine), 시트룰린(citrulline), 시스테인산(cysteic acid), t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, β -알라닌, 플루오르-아미노산, 디자인어 아미노산(designer amino acid), 예를 들면, β -메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, N α -메틸 아미노산, 일반적인 아미노산 유사체 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0103] 다른 구체예에서, 변형에 선택되는 부위는 파지 전시를 이용하여 친화성 성숙된다(상기 참조).

[0104] 항체 서열 내에서 아미노산 치환을 달성하거나, 또는 조작을 더욱 용이하게 하기 위한 제한 부위를 발생/결실시킬 목적으로, DNA 서열 내에서 개별 뉴클레오타이드를 변형하기 위하여 당분야에 공지된 임의의 돌연변이유발 기술이 이용될 수 있다. 이런 기술에는 화학적 돌연변이유발, 시험관내 부위 직접 돌연변이유발(Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488 (1985); Hutchinson, C. et al., *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978)), 올리고뉴클레오타이드-직접 돌연변이유발(Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-463 (1985); Hill et al., *Methods Enzymol.*, 155:558-568 (1987)), PCR-기초된 오버랩 신장(Ho et al., *Gene*, 77:51-59 (1989)), PCR-기초된 메가프라이머 돌연변이유발(Sarkar et al., *Biotechniques*, 8:404-407 (1990)), 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 변형은 이중-가닥 디데옥시 DNA 염기서열분석에 의해 확증될 수 있다.

[0105] 본 발명의 특정 구체예에서, 항-CD19 항체는 융합 단백질, 다시 말하면, 이종성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드에 융합된 항체 또는 단편을 생산하기 위하여 변형될 수 있다. 특정 구체예에서, 항-CD19 항체의 일부분에 융합된 단백질은 ADEPT의 효소 성분이다. 항-CD19 항체와의 융합 단백질로서 가공될 수 있는 다른 단백질이나 폴리펩티드의 실례에는 리신(ricin), 아브린(abrin), 리보뉴클레아제(ribonuclease), DNase I, 포도상구균 장독소(*Staphylococcal enterotoxin*)-A, 섬자리공(pokeweed) 항-바이러스 단백질, 젤로닌(gelonin), 디프테리아 독소(diphtherin toxin), 슈도모나스 외독소(*Pseudomonas exotoxin*), 슈도모나스 내독소(*Pseudomonas endotoxin*)와 같은 독소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(참조: Pastan et al., *Cell*, 47:641 (1986); Goldenberg et al., *Cancer Journal for Clinicians*, 44:43 (1994)). 이용될 수 있는 효소 활성 독소와 이의 단편에는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신(modeccin) A 사슬, 알파-사르신(alpha-sarcin), 유동(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 미국자리공(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, PAP-S), 모모르디카 차란티아(*Momordica charantia*) 저해물질, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotonin), 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 저해물질, 젤로닌(gelonin), 미토젤린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin), 트리코테센(tricothecene) 등이 포함된다(참조: 1993년 10월 28일자 공개된 WO 93/21232).

[0106] 다른 융합 단백질은 유전자-셔플링(gene-shuffling), 모티프-셔플링(motif-shuffling), 엑손-셔플링(exon-shuffling) 및/또는 코돈-셔플링(codon-shuffling)(집합적으로, "DNA 셔플링")의 기술을 통하여 산출될 수 있다. DNA 셔플링은 SYNAGIS또는 이의 단편(가령, 더욱 높은 친화성 및 더욱 낮은 해리 속도를 보유하는 항체 또는 이의 단편)의 활성을 변화시키는데 이용된다(참조: U.S. Patent No. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; 5,837,458; Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.*, 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, *J. Mol. Biol.*, 287:265-76; Lorenzo and Blasco, 1998, *Biotechniques*, 24(2):308-313). 이러한 항체는 U.S. Publication 20030118592, U.S. Publication 200330133939, PCT Publication WO 02/056910(Ledbetter et al.)에 기술된 바와 같이 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질일 수 있다.

[0107] 1.9. 도메인 항체

[0108] 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 도메인 항체, 예를 들면, 인간 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 영역에 상응하는, 항체의 소형 기능적 결합 단위를 보유하는 항체일 수 있다. . 도메인 항체의 실례에는 치료 표적에 특이적인, Domantis Limited(Cambridge, UK)와 Domantis Inc.(Cambridge, MA, USA)로부터 구입가능

한 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(참조: W004/058821; W004/003019; U.S. Patent No. 6,291,158; 6,582,915; 6,696,245; 6,593,081).

[0109] 도메인 항체의 상업적으로 구입가능한 라이브러리는 항-CD19 도메인 항체를 확인하는데 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 CD19 기능적 결합 단위 및 Fc 감마 수용체 기능적 결합 단위를 포함한다.

[0110] 1.10. 디어바디(diabody)

[0111] “디어바디”는 2개의 항원-결합 부위를 보유하는 소형 항체 단편을 의미하는데, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬(VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 너무 짧아 동일한 사슬 내에서 2개의 도메인 사이에 접합(pairing)이 형성되지 않는 링커를 이용함으로써, 이들 도메인은 다른 사슬의 상보적 도메인과 짝을 형성하여 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다. 디어바디는 예로써, EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0112] 1.11. 백신바디(vaccibody)

[0113] 본 발명의 특정 구체예에서, 항-CD19 항체는 백신바디이다. 백신바디는 이량체 폴리펩티드이다. 백신바디의 각 단량체는 힌지 영역과 C γ 3 도메인을 통하여 두 번째 scFv에 연결된 APC 상에 표면 분자에 대한 특이성을 갖는 scFv로 구성된다. 본 발명의 다른 구체예에서, scFv의 항-CD19 항체 단편 중에서 하나를 보유하는 백신바디는 파괴되는 B 세포 및 ADCC를 매개하는 작동체 세포를 병치하는데 이용된다(참조: Bogen et al., U.S. Patent Application Publication No. 20040253238).

[0114] 1.12. 선형 항체

[0115] 본 발명의 특정 구체예에서, 항-CD19 항체는 선형 항체(linear antibody)이다. 선형 항체는 한 쌍의 항원-결합 영역을 형성하는 한 쌍의 직렬식 Fd 단편(V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1})을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다(참조: Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)).

[0116] 1.13. 부모 항체

[0117] 본 발명의 특정 구체예에서, 항-CD19 항체는 부모 항체이다. “부모 항체”는 본 명세서에 기술된 변형된/변이 항체와 비교하여 하나이상의 초가변 영역 내에서 또는 인접하여 하나이상의 아미노산 잔기가 부재하는 또는 이들 잔기가 불완전한 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 따라서, 부모 항체는 본 명세서에 기술된 항체 변이체의 상응하는 초가변 영역보다 짧은 초가변 영역을 보유한다. 부모 폴리펩티드는 자연 서열(즉, 자연 발생) 항체(자연 발생 대립형질 변이체 포함), 또는 자연 발생 서열의 선재(pre-existing) 아미노산 변형(가령, 다른 삽입, 결실 및/또는 치환)을 보유하는 항체를 포함한다. 적절하게는, 부모 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다.

[0118] 1.14. 항체 단편

[0119] “항체 단편”은 전장 항체의 일부분, 일반적으로, 이의 항원 결합이나 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 실례는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편; 디어바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자; 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 등이다.

[0120] 전통적으로, 이들 단편은 본래 항체의 단백분해 절단(proteolytic digestion)을 통하여 유래되었다(참조: Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992); Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). 하지만, 이들 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 가령, 항체 단편은 앞서 언급된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 대안으로, Fab'-SH 단편은 대장균(*E. coli*)으로부터 직접적으로 회수되고 화학적으로 결합되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접적으로 분리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 구체예에서, 선택되는 항체는 단일-사슬 Fv 단편(scFv)이다(참조: WO 93/16185). 특정 구체예에서, 항체는 Fab 단편이 아니다.

[0121] 1.15. 이중특이적 항체

[0122] 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 전형적인 이중특이적 항체는 B 세포 표면 마커의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 이와 같은 다른 항체는 첫 번째 B 세포 마커에 결합하고, 이후 두 번째 B 세포 표면 마커에 결합한다. 대안으로, 항-B 세포 마커 결합 팔(binding arm)은 B 세포에 세포 방어 기전(cellular defense mechanism)을 집중시키기 위하여, 백혈구 상에 유인 분자(triggering molecule), 예를 들면, T 세포 수용체 분자(가령, CD2 또는 CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(Fc γ R)에 결합하는 팔과 합쳐진다. 이중특이적 항체는 또한, 세포독성제를 B 세포에 위치시키는데 이용될 수 있다. 이들 항체는 B 세포 마커-결합 팔 및 세포독성제(가령, 사포린(saporin), 항-인터페론-*, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 리신 A 사슬, 메톨라-엑세이트(methola-exate) 또는 방사성 동위원소 합텐(hapten))에 결합하는 팔을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(가령, F(ab')) 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0123] 이중특이적 항체를 만드는 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983); Traunecker et al., *EMBO J*, 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986); Kostelny et al., *J. Immunol*, 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol*, 152:5368 (1994); U.S. Patent No. 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920, 5,601,81, 95,731,168, 4,676,980, 4,676,980; WO 94/04690; WO 91/00360; WO 92/200373; WO 93/17715; WO 92/08802; EP 03089). 본 발명의 특정 구체예에서, 조성물과 방법은 Daniel et al., *Blood*, 92:4750-4757 (1998)에 기술된 이중특이적 항체와 같은 T 세포 수용체의 인간 CD19와 CD3 입실론 사슬(epsilon chain)에 대한 특이성을 갖는 이중특이적 무린 항체를 포함하지 않는다. 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체가 이중특이적인 바람직한 구체예에서, 항-CD19 항체는 인간 또는 인간화 항체이고, 인간 CD19 및 T 세포 상에 에피토프에 대한 특이성을 갖거나, 또는 예로써, 세포 사멸을 실행하는 단핵구/대식세포 및/또는 자연 킬러 세포와 같은 인간 작동체 세포에 결합할 수 있다.

[0124] 1.16. 작동체 기능 조작

[0125] 작동체 기능과 관련하여 본 발명의 항-CD19 항체를 변형하여 예로써, B 세포 악성종양의 치료에서 상기 항체의 효능을 강화시키는 것이 바람직하다. 가령, 시스테인 잔기를 Fc 영역 내에 도입하여 상기 영역 내에서 사슬간 이황화결합이 형성되도록 한다. 이렇게 산출된 동종이량체 항체는 향상된 내재화 능력(internalization capability) 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸(complement-mediated cell killing) 및/또는 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 갖는다(참조: Caron et al., *J. Exp Med*, 176:1191-1195 (1992); Shopes, B., *J. Immunol*, 148:2918-2922 (1992)). 또한, 강화된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체가 Wolff et al., *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993)에 기술된 바와 같이, 이중이중기능성 교차-링커(cross-linker)를 이용하여 제조될 수 있다. 대안으로, 항체는 이중 Fc 영역을 보유하고, 따라서, 강화된 보체 용해와 ADCC 능력을 갖도록 조작될 수 있다(참조: Stevenson et al., *anti-Cancer Drug Design*, 3 :219-230 (1989)).

[0126] 작동체 기능을 변화시키기 위하여 항체의 Fc 영역을 조작하는 다른 방법은 당분야에 공지되어 있다(가령, FC γ RIIA에 대한 결합 친화성에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 결합 친화성을 강화시키는 Fc 영역의 변형을 기술하는, U.S. Patent Publication No. 20040185045와 PCT Publication No. WO 2004/016750, Koenig et al.; 참조: PCT Publication No. WO 99/58572, Armour et al.; WO 99/51642, Idusogie et al.; U.S. 6,395,272, Deo et al.). Fc γ RIIB에 대한 결합 친화성을 감소시키는 Fc 영역의 변형 방법 역시 당분야에 공지되어 있다(가령, U.S. Patent Publication No. 20010036459와 PCT Publication No. WO 01/79299, Ravetch et al.). 야생형 Fc 영역과 비교하여 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIB에 대한 강화된 결합 친화성을 갖는 변이 Fc 영역을 보유하는 변형된 항체 역시 보고되었다(가령, PCT Publication No. WO 2004/063351, Stavenhagen et al.).

[0127] 당분야에 공지된 시험관내 측정법을 이용하여 섹션 “인간 ADCC 작동체 기능을 위한 항체의 스크리닝”에 기술된 것들과 같은, 본 발명의 조성물과 방법에 이용된 항-CD19 항체가 ADCC를 매개할 수 있는 지를 결정할 수 있다.

[0128] 1.17. 변이 Fc 영역

[0129] 본 발명은 변이 Fc 영역, 다시 말하면, 비-자연 발생 Fc 영역, 예를 들면, 하나이상의 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 단백질의 제제를 제시한다. 또한, 본 발명의 변이 Fc 영역에는 아미노산 결실, 부가 및/또는 변형을 보유하는 Fc 영역이 포함된다.

[0130] 당업자가 인지하는 바와 같이, 본 명세서에서 Fc 영역은 첫 번째 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 보유한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD, IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역

글로불린 도메인 또는 IgE와 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 면역글로불린 도메인 및 이들 도메인의 N-말단에 유연성 힌지를 지칭한다. IgA와 IgM의 경우에, Fc는 J 사슬을 보유한다. IgG의 경우에, Fc는 면역글로불린 도메인 Cgamma2와 Cgamma3(C γ 2와 C γ 3) 및 Cgamma1(C γ 1)과 Cgamma2(C γ 2) 사이에 힌지를 포함한다. Fc 영역의 경계가 변할 수 있긴 하지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로, 카르복시-말단에 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 한정되는데, 여기서 넘버링(numbering)은 Kabat et al., 1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA에서처럼 EU 인덱스에 따른다. “Kabat에 열거된 EU 인덱스”는 Kabat et al. supra에 기술된 바와 같은, 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링(residue numbering)을 지칭한다. Fc는 분리되거나, 또는 항체, 항체 단편 또는 FC 융합 단백질 내에서 상기 영역을 지칭한다. Fc 변이 단백질은 항체, Fc 융합체, 또는 Fc 영역을 포함하는 임의의 단백질이나 단백질 도메인이다. 특히, 변이 Fc 영역을 포함하는 단백질이 바람직한데, 이들은 Fc의 비-자연 발생 변이체이다. 주의: Kabat 270, 272, 312, 315, 356, 358을 비롯한 다수의 Fc 위치에서 다형성(polymorphism)이 관찰되었고, 따라서, 제시된 서열과 기존 서열 사이에 약간의 차이가 존재할 수 있다.

[0131] 본 발명에는 비교 단백질(가령, 야생형 Fc 영역을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 보유하는 단백질)과 비교하여 Fc 리간드(가령, Fc 수용체, Clq)에 대한 변형된 결합 특성을 갖는 Fc 변이 단백질이 포함된다. 결합 특성의 실험에는 결합 특이성, 평형 해리 상수(equilibrium dissociation constant)(KD), 해리와 결합 속도(각각, Koff와 Kon), 결합 친화성 및/또는 결합 활성이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일반적으로, 낮은 KD를 갖는 결합 분자(가령, 항체와 같은 Fc 변이 단백질)는 높은 KD를 갖는 결합 분자보다 선호된다. 하지만, 일부 경우에, kon 또는 koff의 수치가 KD의 수치보다 더욱 타당할 수도 있다. 당업자는 어떤 동력학적 파라미터(kinetic parameter)가 소정의 항체 적용에 가장 중요한 지를 결정할 수 있다.

[0132] 리간드에 대한 Fc 도메인의 친화성과 결합 특성은 Fc-Fc γ R 상호작용, 다시 말하면, Fc γ R에 Fc 영역의 특이적인 결합을 측정하기 위한 당분야에 공지된 다양한 시험관내 측정법(생화학적 또는 면역학적 기초된 측정법), 예를 들면, 평형 방법(가령, 효소-연결된 면역흡착 측정법(ELISA), 또는 방사선면역측정법(RIA)), 또는 반응속도(가령, BIACORE분석) 및 간접적인 결합 측정법, 경쟁 저해 측정법(competitive inhibition assay), 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET), 겔 전기영동(gel electrophoresis), 크로마토그래피(가령, 겔 여과(gel filtration))를 비롯한 다른 방법으로 결정된다. 이들 방법은 검사되는 하나 이상의 성분에서 라벨(label)을 이용하고 및/또는 발색(chromogenic), 형광(fluorescent), 발광(luminescent, 또는 동위원소(isotopic) 라벨을 비롯한 다양한 검출 방법을 이용한다. 결합 친화성과 반응속도에 관한 상세한 설명은 항체-면역원 상호작용에 중심하는 Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)에서 확인할 수 있다.

[0133] 한 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여, 하나 이상의 Fc 리간드에 대한 강화된 결합을 나타낸다. 다른 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 적어도 2 배, 또는 적어도 3 배, 또는 적어도 5 배, 또는 적어도 7 배, 또는 적어도 10 배, 또는 적어도 20 배, 또는 적어도 30 배, 또는 적어도 40 배, 또는 적어도 50 배, 또는 적어도 60 배, 또는 적어도 70 배, 또는 적어도 80 배, 또는 적어도 90 배, 또는 적어도 100 배, 또는 적어도 200 배 높은, Fc 리간드에 대한 친화성을 갖는다. 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 Fc 수용체에 대한 강화된 결합을 나타낸다. 다른 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 Fc 수용체 Fc γ RIIIA에 대한 강화된 결합을 나타낸다. 또 다른 구체예에서, Fc 변이 단백질은 Fc 수용체 FcRn에 대한 강화된 결합을 나타낸다. 또 다른 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 Clq에 대한 강화된 결합을 나타낸다. Fc 영역을 포함하는 단백질의 혈청 반감기(serum half-life)는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성을 증가시킴으로써 증가된다. 한 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 강화된 혈청 반감기를 갖는다.

[0134] “항체-의존성 세포-매개된 세포독성” 또는 “ADCC”는 특정 세포독성 세포(가령, 자연 킬러(NK) 세포, 호중구, 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 작동체 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고, 이후 상기 표적 세포를 세포독소(cytotoxin)로 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성의 한가지 형태를 지칭한다. 표적 세포의 표면을 지향하는 특이적인 고-친화성 IgG 항체는 세포독성 세포를 무장시키고 이런 사멸에 절대적으로 필요하다. 표적 세포의 용해는 세포외에서 진행되고, 직접적인 세포-세포 접촉을 필요로 하며, 보체가 관여하지 않는다. 항체 이외에, Fc 영역을 포함하는 다른 단백질, 구체적으로, 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 Fc 융합 단백질이 세포-매개된 세포독성을 달성할 수 있을 것으로 생각된다. 간편하게 하기 위하여, Fc 융합 단백질의 활성에 기인하는 세포-매개된 세포독성 역시, 본 명세서에서 ADCC 활성으로 지칭된다.

[0135] ADCC로 표적 세포의 용해를 매개하는 임의의 특정 Fc 변이 단백질의 능력을 검사할 수 있다. ADCC 활성을 평가

하기 위하여, 목적하는 Fc 변이 단백질은 표적 세포의 세포용해를 유도하는 항원-항체 복합체에 의해 활성화되는 면역 작동체 세포와 조합으로, 표적 세포에 부가된다. 세포용해는 일반적으로, 용해된 세포로부터 라벨(가령, 방사성 물질, 형광 염료 또는 천연 세포내 단백질)의 방출에 의해 검출된다. 이런 검사에 유용한 작동체 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC)와 자연 킬러(NK) 세포이다. 시험관내 ADCC 측정법의 구체적인 실례는 Wisecarver et al., 1985 79:277-282; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166:1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258:183-191; Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184:29-38에 기술된다. 대안으로, 또는 부가적으로, 목적하는 Fc 변이 단백질의 ADCC 활성은 예로써, Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652-656에 기술된 바와 같은 동물 모형 내에서 평가될 수도 있다.

[0136] 한 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 강화된 ADCC 활성을 나타낸다. 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 적어도 2 배, 또는 적어도 3 배, 또는 적어도 5 배 또는 적어도 10 배 또는 적어도 50 배 또는 적어도 100 배 높은 ADCC 활성을 갖는다. 다른 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 강화된 결합 및 강화된 ADCC 활성을 나타낸다. 다른 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 강화된 ADCC 활성 및 강화된 혈청 반감기를 갖는다.

[0137] “보체 의존성 세포독성”과 “CDC”는 보체의 존재에서 표적 세포의 용해를 지칭한다. 보체 활성화 경로(complement activation pathway)는 임의의 분자, 예를 들면, 동계 항원과 복합된 항체에 대한 보체계(complement system)(C1q)의 첫 번째 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예로써 Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202:163에 기술된 CDC 검사가 수행된다. 한 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 강화된 CDC 활성을 갖는다. 특정 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 적어도 2 배, 또는 적어도 3 배, 또는 적어도 5 배 또는 적어도 10 배 또는 적어도 50 배 또는 적어도 100 배 높은 CDC 활성을 갖는다. 다른 구체예에서, Fc 변이 단백질은 비교 분자와 비교하여 강화된 CDC 활성 및 강화된 혈청 반감기를 갖는다.

[0138] 한 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역이 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334에서 선택되는 하나이상의 위치에서 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 제제를 제시한다. 선택적으로, Fc 영역은 당업자에게 공지된 부가적인 및/또는 대안적인 위치에서 비-자연 발생 아미노산을 포함할 수도 있다(참조: U.S. Patent 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publication WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 05/040217).

[0139] 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc 변이 단백질 제제를 제시하는데, 여기서 Fc 영역은 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 234D, 234E, 234N, 234Q5 234T, 234H, 234Y, 2341, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 2351, 235V, 235F, 236E5 239D5 239E5 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A에서 선택되는 적어도 하나의 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함한다. 선택적으로, Fc 영역은 당업자에게 공지된 부가적인 및/또는 대안적인 비-자연 발생 아미노산을 포함할 수도 있다(참조: U.S. Patent 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publication WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 05/040217).

[0140] 다른 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역이 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 239, 330, 332에서 선택되는 하나이상의 위치에서 적어도 하나의 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 Fc 변이 단백질 제제를 제시한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역이 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 239D, 330L, 332E에서 선택되는 적어도 하나의 비-자연 발생 아미노산을 포함하는 Fc 변이 단백질 제제를 제시한다. 선택적으로, Fc 영역은 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 252, 254, 256에서 선택되는 하나이상의 위치에서 부가적인 비-자연 발생 아미노산을 더욱 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 Fc 영역이 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 239D, 330L, 332E에서 선택되는 적어도 하나의 비-자연 발생 아미노산을 포함

하는 Fc 변이 단백질 제제를 제시하는데, 하나이상의 위치에서 적어도 하나의 비-자연 발생 아미노산은 Kabat에 열거된 EU 인덱스에 의한 넘버링에 따라 252Y, 254T, 256E에서 선택된다.

[0141] 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 변이체는 Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); U.S. Patent No. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; U.S. Patent Publication No. 2004/0002587과 PCT Publication WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351에 기술된 것들과 같은 다른 공지된 Fc 변이체와 합쳐진다. 또한, 본 발명에는 결실, 부가 및/또는 변형을 보유하는 Fc 영역이 포함된다. Fc 도메인의 다른 변형/치환/부가/결실은 당업자에게 명백할 것이다.

[0142] 비-자연 발생 Fc 영역을 산출하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 가령, 아미노산 치환 및/또는 결실은 부위 직접 돌연변이유발(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), PCR 돌연변이유발(Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)), 카세트 돌연변이유발(cassette mutagenesis)(Wells et al., Gene 34:315-323 (1985))을 비롯한 돌연변이유발 방법에 의해 달성될 수 있다. 적절하게는, 부위 직접 돌연변이유발은 오버랩-신장 PCR 방법(Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989))에 의해 수행된다. 대안으로, 오버랩-신장 PCR 기술(Higuchi, ibid.)은 표적 서열(출발 DNA) 내로 원하는 돌연변이를 도입하는데 이용될 수 있다. 가령, 오버랩-신장 방법에서 첫 번째 PCR은 외부 프라이머(프라이머 1)와 내부 돌연변이유발 프라이머(프라이머 3) 및 이와 별개로, 두 번째 외부 프라이머(프라이머 4)와 내부 프라이머(프라이머 2)로 표적 서열을 증폭하여 2개의 PCR 분절(분절 A와 B)을 산출하는 과정을 수반한다. 내부 돌연변이유발 프라이머(프라이머 3)는 원하는 돌연변이를 열거하는 표적 서열에 미스매치(mismatch)를 보유하도록 설계된다. 두 번째 PCR에서, 첫 번째 PCR의 산물(분절 A와 B)은 2가지 외부 프라이머(프라이머 1과 4)를 이용한 PCR로 증폭된다. 생성된 전장 PCR 분절(분절 C)은 제한 효소로 절단되고, 생성된 제한 단편은 적절한 벡터 내로 클론된다. 돌연변이유발의 첫 번째 단계로서, 출발 DNA(가령, Fc 융합 단백질, 항체 또는 단순히, Fc 영역을 인코딩)가 돌연변이유발 벡터 내로 작동가능하게 클론된다. 프라이머는 원하는 아미노산 치환을 반영하도록 설계된다. 변이 Fc 영역의 산출에 이용되는 다른 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: U.S. Patent No. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; U.S. Patent Publication No. 2004/0002587과 PCT Publication WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351).

[0143] 일부 구체예에서, Fc 변이 단백질은 하나이상의 조작된 단백당형(glycoform), 다시 말하면, Fc 영역을 포함하는 분자에 공유 부착된 탄수화물 조성물을 포함한다. 조작된 단백당형은 작동체 기능을 강화시키거나 감소시키는 것을 비롯하여 다양한 목적에 유용하다. 조작된 단백당형은 당업자에게 공지된 임의의 방법으로, 예를 들면, 조작된 또는 변이 발현 균주를 이용함으로써, 하나이상의 효소, 예를 들면, DI N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제(acetylglucosaminyltransferase) III(GnTIII)과의 공동-발현으로, 다양한 생물체 또는 다양한 생물체로부터 세포주 내에서 Fc 영역을 포함하는 분자를 발현함으로써, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 이후 탄수화물을 변화시킴으로써 산출된다. 조작된 단백당형을 산출하는 방법은 당분야에 공지되어 있는데, 여기에는 Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) U.S. Pat. No. 6,602,684; U.S. Ser. No. 10/277,370; U.S. Ser. No. 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; Potillegent™ 기술(Biowa, Inc. Princeton, N. J.); GlycoMAb™ 당화 조작 기술(glycosylation engineering technology)(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)에 기술된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(참조: WO 00061739; EA01229125; US

20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49).

1.18. 항체의 당화(glycosylation)

다른 구체예에서, 본 발명에 이용되는 항체의 당화가 변형된다. 가령, 당화없는 항체가 만들어질 수 있다(즉, 상기 항체는 당화가 부재한다). 당화는 예로써, 표적 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위하여 변형될 수 있다. 이런 탄수화물 변형은 예로써, 항체 서열 내에서 하나 이상의 당화 부위를 변형함으로써 달성될 수 있다. 가령, 하나 이상의 가변 영역 골격 당화 부위를 제거하여 상기 부위에서 당화를 배제하는 하나 이상의 아미노산 치환이 달성될 수 있다. 이런 당화없음(aglycosylation)은 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킨다. 이런 접근법은 U.S. Patent No. 5,714,350과 6,350,861에서 더욱 상세하게 기술된다. 대안으로, Fc 영역 내에 존재하는 당화 부위(가령, IgG의 아스파라긴 297)를 제거하는 하나 이상의 아미노산이 만들어질 수 있다. 더 나아가, 당화된 항체는 필요한 당화 기구(glycosylation machinery)가 부재하는 세균 세포 내에서 생산될 수도 있다.

부가적으로, 또는 대안으로, 변형된 유형의 당화를 갖는 항체, 예를 들면, 감소된 양의 푸코실(fucosyl) 잔기를 보유하는 하이포푸코실화(hypofucosylated) 항체 또는 증가된 이등분(bisecting) GlcNAc 구조를 보유하는 항체가 만들어질 수 있다. 이런 변형된 당화 패턴은 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이런 탄수화물 변형은 예로써, 변형된 당화 기구를 보유하는 숙주 세포 내에서 항체를 발현함으로써 달성될 수 있다. 변형된 당화 기구를 보유하는 세포는 기존 문헌에서 보고되었고, 본 발명의 재조합 항체를 발현하여 변형된 당화를 갖는 항체를 생산하는 숙주 세포로서 이용될 수 있다(참조: Shields, R.L. et al. (2002) J Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1; European Patent No: EP 1,176,195; PCT Publication WO 03/035835; WO 99/54342).

2. 항-CD19 항체의 제조

원하는 항-CD19 항체가 조작되면, 이러한 항-CD19 항체는 항체의 대규모 제조를 위한 당분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 상업적 규모로 생산될 수 있다. 가령, 이는 아래에 기술된 것들을 비롯한 재조합 발현 시스템을 이용하여 달성될 수 있다.

2.1. 재조합 발현 시스템

본 발명의 항체 또는 이의 변이체의 재조합 발현은 일반적으로, 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 작제를 필요로 한다. 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 일부분(바람직하게는, 중쇄와 경쇄 가변 도메인을 보유)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 획득되면, 상기 항체 분자의 생산을 위한 벡터는 당분야에 널리 공지된 기술을 이용한 재조합 DNA 기술로 생산될 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,331,415). 따라서, 항체 인코딩 뉴클레오티드 서열을 보유하는 폴리뉴클레오티드를 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 당업자에게 널리 공지된 방법을 이용하여 항체 코딩 서열 및 적절한 전사와 번역 통제 신호를 보유하는 발현 벡터를 작제할 수 있다. 이들 방법에는 예로써, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 생체내 유전자 재조합이 포함된다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 항체 분자; 항체의 중쇄 또는 경쇄; 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 이의 일부분; 또는 중쇄 또는 경쇄 CDR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능 벡터를 제시한다. 이들 벡터는 항체 분자의 불변 영역(참조: International Publication No. WO 86/05807과 WO 89/01036; U.S. Patent No. 5,122,464)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄와 경쇄의 발현을 위하여 상기 벡터 내로 클론된다.

대안적 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 항-CD19 항체의 전체 또는 일부를 산출하는 표적된 상동성 재조합(targeted homologous recombination)을 이용하여 만들어질 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,063,630, 6,187,305, 6,692,737). 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 항-CD19 항체의 전체 또는 일부를 산출하는 무작위 재조합 기술(random recombination technique)을 이용하여 만들어질 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,361,972, 6,524,818, 6,541,221, 6,623,958). 항-CD19 항체는 또한, Cre-매개된 부위-특이적 상동성 재조합을 이용하여, 변형된 면역글로불린 좌위를 포함하는 세포의 게놈 서열로부터 항체를 발현하는 세포 내에서 생산될 수도 있다(참조: U.S. Patent No. 6,091,001). 인간 항체 생산이 요망되는 경우에, 숙주 세포는 인간 세포주이어야 한다. 유익하게는, 이들 방법은 항체 분자를 영구적으로 발현하는 안정적인 세포주를 조작하는데 이용된다.

발현 벡터가 통상적인 기술에 의해 숙주 세포에 전달되면, 형질감염된 세포는 통상적인 기술에 의해 배양되고 본 발명의 항체를 생산한다. 따라서, 본 발명에는 이질성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 항체 또

는 이의 단편, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 일부분, 또는 본 발명의 단일-사슬 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 보유하는 숙주 세포가 포함된다. 이중-사슬 항체의 발현을 위한 바람직한 구체예에서, 중쇄와 경쇄를 모두 인코딩하는 벡터는 아래에 상세하게 기술된 바와 같이, 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위하여 숙주 세포 내에서 공동-발현된다.

[0153] 항-CD19 항체의 조작과 산출에 이용될 수 있는 본 발명의 항-CD19 항체 또는 이의 일부를 발현하는데 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다(참조: U.S. Patent No. 5,807,715). 가령, 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는 인간 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)로부터 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께, 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al., Gene, 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology, 8:2 (1990)). 이에 더하여, 삽입된 항체 서열의 발현을 조절하거나, 또는 원하는 특정한 방식으로 항체 유전자 산물을 변형시키고 처리하는 숙주 세포 군주가 선택된다. 단백질 산물의 이런 변형(가령, 당화)과 처리(가령, 절단)는 단백질의 기능에 중요하다. 서로 다른 숙주 세포는 단백질과 유전자 산물의 번역후 처리와 변형을 위한 특징적이고 특이적인 기전을 보유한다. 발현되는 항체 또는 이의 일부분의 정확한 변형과 처리를 담보하기 위하여 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위하여, 일차 전사체의 적절한 처리, 당화, 유전자 산물의 인산화를 위한 세포 기구(cellular machinery)를 보유하는 진핵 숙주 세포가 이용된다. 이런 포유동물 숙주 세포에는 CHO, VERY, BHK, HeIa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NSO(면역글로불린 사슬을 내인성으로 생산하지 않는 무린 골수종 세포주), CRL7030, HsS78Bst 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0154] 바람직한 구체예에서, 인간 림프구를 영속화시킴으로써 발달된 인간 세포 세포주는 단클론 인간 항-CD19 항체를 제조할 방식으로 생산하는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 단클론 인간 항-CD19 항체를 제조할 방식으로 생산하기 위하여 인간 세포주 PER.C6.(Crucell, Netherlands)이 이용될 수 있다.

[0155] 세균 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 가급적, 발현되는 항체 분자의 의도된 목적에 맞춰 선택된다. 가령, 이런 항체가 다량으로 생산되는 경우에, 항-CD19 항체를 함유하는 약학적 조성물의 산출을 위하여, 쉽게 정제되는 용합 단백질 산물의 높은 수준의 발현을 유도하는 벡터가 바람직하다. 이런 벡터에는 대장균(*E. coli*) 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., EMBO, 12:1791 (1983))이 포함되는데, 여기서 항체 코딩 서열은 벡터 내에 개별적으로 lac Z 코딩 영역과 인 프레임(in frame)으로 결합되어 용합 단백질이 생산된다; pIN 벡터(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989)) 등. pGEX 벡터 역시 글루타티온 5-트랜스퍼라아제(glutathione 5-transferase, GST)와의 용합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현하는데 이용된다. 일반적으로, 이런 용합 단백질은 가용성이고, 매트릭스 글루타티온 아가로오스 비드(matrix glutathione agarose bead)에 흡수와 결합 및 이후, 유리 글루타티온의 존재에서 용리에 의해, 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클론된 표적 유전자 산물이 GST 모이어티(moiety)로부터 방출될 수 있도록 트롬빈(thrombin) 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 보유하도록 설계된다.

[0156] 곤충 시스템에서, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병(nuclear polyhedrosis) 바이러스(AcNPV)는 외래 유전자를 발현하는 벡터로서 이용된다. 상기 바이러스는 담배나방(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 AcNPV 프로모터(가령, 다각체(polyhedrin) 프로모터)의 통제 하에, 상기 바이러스의 비-필수 영역(가령, 다각체(polyhedrin) 유전자) 내로 개별적으로 클론되고 배치된다.

[0157] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기초된 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 이용되는 경우에, 목적하는 항체 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 통제 복합체, 예를 들면, 후기 프로모터와 3부분 리더 서열에 결합된다. 이후, 상기 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈 내로 삽입된다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(가령, 영역 E1 또는 E3) 내에 삽입은 감염된 숙주 내에서 생존하고 항체 분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 결과한다(참조: Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359 (1984)). 삽입된 항체 코딩 서열의 효율적인 번역을 위하여 특이적인 개시 신호(initiation signal) 역시 요구된다. 이들 신호에는 ATG 개시 코돈(initiation codon) 및 인접 서열이 포함된다. 더 나아가, 개시 코돈은 일반적으로, 전체 삽입체의 번역을 담보하기 위하여 원하는 코딩 서열의 해독틀(reading frame)과 동일 위상에 위치해야 한다. 이들 외인성 번역 통제 신호 및 개시 코돈은 자연과 합성의 다양한 기원으로부터 유래될 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소(transcription enhancer element), 전사 종결인자(transcription terminator) 등의 포함에 의해 강화된다(참조: Bittner et al., Methods in Enzymol., 153:51-544(1987)).

- [0158] 재조합 단백질의 장기적인 고-수율 생산을 위하여, 안정적인 발현이 선호된다. 가령, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주가 조작된다. 숙주 세포는 바이러스 복제 기점(origin of replication)을 보유하는 복제 발현 벡터를 이용하는 일시적인 발현 시스템 보다는 적절한 발현 통제 요소(가령, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결인자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별가능 마커(selectable marker)에 의해 통제되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입이후, 조작된 세포는 농축된 배지 내에서 1-2일동안 성장하고, 이후 선별 배지(selective media)로 옮겨진다. 재조합 플라스미드 내에서 선별가능 마커는 이러한 선별에 내성을 부여하고 세포가 상기 플라스미드를 그들의 크로모솜 내로 안정적으로 통합하고 성장하여 좌위를 형성할 수 있도록 하는데, 상기 좌위는 세포주 내로 클론되고 확대될 수 있다. 항-CD19 항체를 인코딩하는 플라스미드는 배양 생산에 적합한 임의의 세포주 내로 유전자/cDNA를 도입하는데 이용될 수 있다. 대안으로, 항-CD19 항체에 대한 내인성 유전자를 “활성화”시키기 위하여 숙주 세포 내에서 적절한 크로모솜 위치로 발현 통제 요소(가령, 프로모터, 인핸서 등)를 도입하는데 “표적화 벡터(targeting vector)” 라고 하는 플라스미드가 이용될 수 있다.
- [0159] 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(herpes simplex virus thymidine kinase)(Wigler et al., Cell, 11 :223 (1977)), 하이폭산틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(hypoxanthineguanine phosphoribosyltransferase)(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 48:202 (1992)), 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(adenine phosphoribosyltransferase)(Lowy et al., Cell, 22:8-17 (1980)) 유전자를 비롯한 다수의 선별 시스템이 각각, tk^{-} , $hgprt^{-}$ 또는 $aprT^{-}$ 세포에 이용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성(antimetabolite resistance)이 아래의 유전자에 대한 선별의 기초로서 이용될 수 있다: 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여하는 *dhfr*(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); 미코페놀산(mycophenolic acid)에 대한 내성을 부여하는 *gpt*(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 *neo*(Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926- 932 (1993); Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11(5):155-215 (1993)); 하이그로마이신(hygromycin)에 대한 내성을 부여하는 *hygro*(Santerre et al., Gene, 30:147 (1984)). 재조합 DNA 기술의 당분야에 널리 공지된 방법은 원하는 재조합 클론을 선별하는데 관례대로 적용될 수 있는데, 이들 방법은 예로써, Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol, 150:1에 기술된다.
- [0160] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭(vector amplification)에 의해 증가될 수 있다(참조: Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. Academic Press, New York (1987)). 이러한 벡터 시스템 발현 항체 내에서 마커가 증폭가능하면, 숙주 세포의 배양액 내에 존재하는 저해물질의 수준 증가는 마커 유전자의 사본 수를 증가시킨다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 연관되기 때문에, 항체의 생산 역시 증가한다((Grouse et al., Mol. Cell. Biol, 3:257 (1983)). 항체 발현 수준은 활성 인공 전사 도메인의 형태로 주변 크로마틴(chromatin)을 개조하고 도입유전자 발현을 강화시키는 기술을 비롯하여 재조합 단백질 생산의 분야에서 통상적인 지식을 가진 자에게 공지된 재조합 방법과 도구의 이용을 통하여 확대된다.
- [0161] 숙주 세포는 본 발명의 2개의 발현 벡터로 공동-형질감염되는데, 첫 번째 벡터는 중쇄 유래된 폴리펩티드를 인코딩하고 두 번째 벡터는 경쇄 유래된 폴리펩티드를 인코딩한다. 이들 2개의 벡터는 중쇄와 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선별가능 마커를 보유한다. 대안으로, 중쇄와 경쇄 폴리펩티드를 모두 인코딩하고 발현할 수 있는 단일 벡터가 이용될 수도 있다. 이런 상황에서, 경쇄는 독성 유리 중쇄의 과잉을 피하기 위하여 중쇄 앞에 놓인다(Proudfoot, Nature 322:562-65 (1986); Kohler, 1980, Proc. Natl Acad. Sci USA, 77:2197 (1980)). 이들 중쇄와 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함한다.
- [0162] 재조합 발현에 의해 생산된 본 발명의 항체 분자는 면역글로불린 분자의 정제를 위한 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 크로마토그래피(가령, 이온 교환, 친화성, 특히, 단백질 A이후 특이적인 항원에 대한 친화성, 크기 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도(differential solubility), 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제된다. 더 나아가, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 정제를 용이하게 하기 위하여 본 명세서에 기술되거나 당분야에 공지된 이중성 폴리펩티드 서열에 융합된다.
- [0163] 2.2. 항체 정제와 분리

- [0164] 재조합 기술을 이용하는 경우에, 항체는 세포내에서 또는 세포질 공간(periplasmic space) 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접적으로 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되면, 첫 번째 단계로서, 미립자 잔해(즉, 숙주 세포 또는 용해된 단편)는 예로써, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)에서는 대장균(*E. coli*)의 세포질 공간 내로 분비되는 항체를 분리하는 절차를 기술한다. 간단히 말하면, 세포 덩어리는 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 페닐메틸설포닐플로라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride)(PMSF)의 존재에서 대략 30분간 해동시킨다. 세포 잔해는 원심분리로 제거될 수 있다. 항체 변이체가 배지 내로 분비되는 경우에, 이런 발현 시스템으로부터 상층액은 일반적으로, 상업적으로 구입가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 단위를 이용하여 먼저 농축시킨다. 단백분해를 저해하기 위하여 임의의 전술한 단계에서 PMSF와 같은 프로테아제 저해물질이 포함될 수 있고, 우연한 오염물질의 성장을 예방하기 위하여 항생제가 포함될 수 있다.
- [0165] 이들 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예로써, 단독으로 또는 다른 정제 단계와 조합으로, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 겔 전기영동(gel electrophoresis), 투석(dialysis) 및/또는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용하여 정제될 수 있다. 단백질 A의 친화성 리간드로서 적합성(suitability)은 항체 변이체 내에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 종류와 아이소타입(isotype)에 좌우된다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초한 항체를 정제하는데 이용될 수 있다(Lindmark et al., J. Immunol. Methods, 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 생쥐 아이소타입과 인간 $\gamma 3$ 에 권장된다(Guss et al., EMBO J., 5:1567-1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 대부분 아가로스(agarose)이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 통제된 다공성 유리(pore glass) 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠(poly(styrenedivinyl)benzene)과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가르스로 달성될 수 있는 것보다 빠른 유속 및 짧은 처리 시간이 가능하다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우에, Bakerbond ABX 수지(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제에 유용하다. 이온-교환 칼럼 상에서 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서 크로마토그래피, 헤파린 상에서 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(가령, 폴리아스파라긴산 칼럼) 상에서 SEPHAROSE 크로마토그래피, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전과 같은 다른 단백질 정제 기술 역시 회수되는 항체 따라 이용가능하다.
- [0166] 임의의 예비 정제 단계이후, 목적하는 항체와 오염물질을 포함하는 혼합물은 대략 2.5-4.5의 pH에서 용리 완충액(elution buffer)을 이용하여, 가급적, 낮은 염 농도(가령, 대략 0-0.25 M 염)에서 수행된 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 종속된다.
- [0167] 3. 치료 항-CD19 항체
- [0168] 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 항-CD19 항체는 인간 ADCC를 매개하는 인간 항체 또는 인간화 항체이거나, 또는 인간 ADCC를 매개하는 공지된 항-CD19 항체에서 선택된다. 특정 구체예에서, 항-CD19 항체는 키메라 항체일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 항-CD19 항체는 단클론 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체이다. 적절하게는, 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 항-CD19 항체는 IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 인간 항체 또는 인간화 항체이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 항-CD19 항체는 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입의 인간 항체 또는 인간화 항체이다.
- [0169] 이들 항체는 앞서 기술된 기술을 이용하여 산출될 수 있긴 하지만, 본 발명의 다른 구체예에서, 본 명세서에 기술된 뮤린 항체 HB12a와 HB12b 및 다른 상업적으로 구입가능한 항-CD19 항체는 키메라 또는 인간화 항체이거나, 또는 인간 항체로 만들어질 수 있다.
- [0170] 가령, 이용될 수 있는 공지된 항-CD19 항체에는 HD37(IgG1)(DAKO, Carpinteria, CA), BU12(G.D. Johnson, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom), 4G7(IgG1)(Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany), J4.119(Beckman Coulter, Krefeld, Germany), B43(PharMingen, San Diego, CA), SJ25C1(BD PharMingen, San Diego, CA), FMC63(IgG2a)(Chemicon Int'l., Temecula, CA)(Nicholson et al., Mol. Immunol., 34:1157-1165 (1997); Pietersz et al., Cancer Immunol. Immunotherapy, 41 :53-60 (1995); Zola et al., Immunol Cell Biol, 69:411-422 (1991)), B4(IgG1)(Beckman Coulter, Miami, FL) Nadler et al., J. Immunol, 131:244-250 (1983) 및/또는 HD237(IgG2b)(Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna, Austria, 1989; Pezzutto et al., J. Immunol, 138:2793-2799 (1987))이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0171] 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 SEQ ID NO:2(도 5A)의 아미노산 서열을 포함하는 HB12a의 중쇄를

포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 SEQ ID NO:4(도 5B)의 아미노산 서열을 포함하는 HB12b의 중쇄를 포함한다.

[0172] 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 SEQ ID NO:16(도 6A)의 아미노산 서열을 포함하는 HB12a의 경쇄를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 SEQ ID NO: 18(도 6B)의 아미노산 서열을 포함하는 HB12b의 경쇄를 포함한다.

[0173] 특정 구체예에서, 항체는 앞서 기술된 것들(가령, HB12a 또는 HB12b)과 같은 공지된 항체(가령, IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입에 대한)의 아이소타입 전환된 변이체이다.

[0174] 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 항-CD19 항체는 나신 항체(naked antibody), 면역공액체(immunoconjugate) 또는 융합 단백질일 수 있다. 적절하게는, 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 앞서 기술된 항-CD19 항체는 이들로 치료된 인간에서 B 세포와 순환 면역글로불린을 감소 또는 고갈시킬 수 있다. B 세포의 고갈은 순환 B 세포, 또는 골수, 비장, 장과 연관된 림프(gut-associated lymphoid) 조직 및/또는 림프절과 같은 특정 조직 내에서 나타날 수 있다. 이런 고갈은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC), B 세포 증식의 저해 및/또는 B 세포 사멸(가령, 아포토시스(apoptosis)를 통한)의 유도과 같은 다양한 기전을 통하여 달성될 수 있다. B 세포의 “고갈”은 섹션 “투여와 용량”에 기술된 바와 같이 적어도 대략 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상으로, 순환 B 세포 및/또는 특정 조직 내에 B 세포의 감소를 의미한다. 특정 구체예에서, 거의 모든 검출가능 B 세포는 순환계 및/또는 특정 조직으로부터 고갈된다. 순환 면역글로불린(Ig)의 “고갈”은 섹션 “투여와 용량”에 기술된 바와 같이, 적어도 대략 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상으로, 감소를 의미한다. 특정 구체예에서, 거의 모든 검출가능 Ig는 순환계로부터 고갈된다.

[0175] 3.1. 인간 CD19 결합을 위한 항체의 스크리닝

[0176] 인간 CD19 항원에 결합하는 항체를 확인하는데 결합 측정법이 이용될 수 있다. 결합 측정법은 직접적인 결합 측정법 또는 경쟁-결합 측정법으로서 수행된다. 결합은 표준 ELISA 또는 표준 유세포분석법을 이용하여 검출될 수 있다. 직접 결합 측정법에서, 후보 항체는 인간 CD19 항원에 대한 결합이 검사된다. 특정 구체예에서, 스크리닝 측정법은 두 번째 단계에서, 인간 CD19를 발현하는 B 세포의 세포 사멸 또는 아포토시스를 유도하는 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 다른 한편, 경쟁-결합 측정법은 공지된 항-CD19 항체 또는 인간 CD19에 결합하는 다른 화합물과 경쟁하는 후보 항체의 능력을 평가한다.

[0177] 직접 결합 측정법에서, 인간 CD19 항원은 인간 CD19 항원에 후보 항체의 결합을 가능하게 하는 조건 하에 후보 항체와 접촉된다. 이러한 결합은 용액 내에서 또는 고체 표면 상에서 진행된다. 적절하게는, 후보 항체는 검출을 위하여 미리 표지된다. 임의의 검출가능 화합물은 발광, 형광, 또는 방사성 동위원소 또는 이를 보유하는 작용기, 또는 비-동위원소 라벨, 예를 들면, 효소 또는 염료와 같은 표지화(labeling)에 이용된다. 결합이 발생할 만큼 충분한 배양 기간이후, 반응물은 과량의 또는 비-특이적으로 결합된 항체를 제거하는 조건과 조작에 노출된다. 전형적으로, 이는 적절한 완충액으로 세척을 수반한다. 최종적으로, CD19-항체 복합체의 존재를 검출한다.

[0178] 경쟁-결합 측정법에서, 후보 항체는 인간 CD19 항원에 대한 공지된 항-CD19 항체(또는 다른 화합물)의 결합을 저해하거나 대체하는 능력을 평가한다. CD19의 표지된 공지의 결합체는 후보 항체와 혼합되고, 후보 항체가 추가되거나 이런 추가됨 없이, 이들 사이에 상호작용이 정상적으로 발생하는 조건 하에 놓인다. 인간 CD19에 결합하는 CD19의 표지된 공지의 결합체의 양은 후보 항체의 존재 또는 부재에서 결합된 양과 비교된다.

[0179] 바람직한 구체예에서, 항체 항원 복합체 형성과 검출을 용이하게 하기 위하여, 상기 결합 측정법은 고체 표면에 고정된 하나 이상의 성분으로 수행된다. 다양한 구체예에서, 고체 서포트에는 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리에틸렌(polyethylene), 유리, 니트로셀룰로오스(nitrocellulose), 텍스트란, 나일론, 폴리아크릴아마이드, 아가로즈가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 서포트 외형은 비드, 막, 마이크로입자; 마이크로역가 평판, 검사 튜브 또는 다른 반응 용기와 같은 반응 용기의 내부 표면일 수 있다. 인간 CD19, 또는 다른 성분의 고정화는 공유 또는 비-공유 부착을 통하여 달성될 수 있다. 한 구체예에서, 이러한 부착은 간접적으로, 다시 말하면, 부착된 항체를 통하여 달성된다. 다른 구체예에서, 인간 CD19 항원과 음성 대조가 에피토프, 예를 들면, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST)로 부착되고, 따라서, 항-GST(Santa Cruz Biotechnology)와 같은 상업적으로 구입가능한 항체에 의해 고체 표면에 대한 부착이 매개될 수 있다.

- [0180] 가령, 이런 친화성 결합 측정법은 고체 서포트에 고정된 인간 CD19 항원을 이용하여 수행된다. 전형적으로, 결합 반응의 비-고정된 성분, 본 발명의 경우에, 후보 항-CD19 항체는 검출이 가능하도록 표지된다. 발광, 발색, 형광, 또는 방사성 동위원소 또는 이를 보유하는 작용기, 비-동위원소 라벨, 예를 들면, 효소 또는 염료와 같은 다양한 표지와 방법이 이용가능하다. 바람직한 구체예에서, 후보 항-CD19 항체는 플루레신 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate)(FITC, Sigma Chemicals, St. Louis)와 같은 형광단(fluorophore)으로 표지된다.
- [0181] 최종적으로, 고체 표면에 남아있는 라벨은 당분야에 공지된 임의의 검출 방법으로 검출한다. 가령, 후보 항-CD19 항체가 형광단으로 표지되면, 형광분광광도계(fluorimeter)를 이용하여 복합체를 검출할 수 있다.
- [0182] 적절하게는, 인간 CD19 항원은 인간 CD19 항원을 발현하는 본래 세포, 또는 인간 CD19 항원을 포함하는 분리된 막의 형태로 결합 검사물에 추가된다. 따라서, 인간 CD19 항원에 직접적인 결합은 후보 항-CD19 항체의 존재와 부재에서, 배양중인 본래 세포 내에서 또는 동물 모형 내에서 검사된다. 표지된 후보 항-CD19 항체는 인간 CD19 항원을 발현하는 세포, 또는 이런 세포로부터 획득된 가공되지 않은 추출물과 혼합되고, 후보 항-CD19 항체가 추가된다. 분리된 막은 인간 CD19와 상호작용하는 후보 항-CD19 항체를 확인하는데 이용된다. 가령, 분리된 막을 이용한 전형적인 실험에서, 세포는 인간 CD19 항원을 발현하도록 유전자 조작된다. 막은 표준 기술로 수확되고, 시험관내 결합 측정법에 이용될 수 있다. 표지된 후보 항-CD19 항체(가령, 형광 표지된 항체)는 막에 결합되고 특이적인 활성이 검사된다; 특이적인 결합은 과량의 표지되지 않은(차가운) 후보 항-CD19 항체의 존재에서 수행된 결합 측정과의 비교에 의해 결정된다. 대안으로, 가용성 인간 CD19 항원은 재조합 방식으로 발현되고, 인간 CD19 항원에 결합하는 항체를 확인하는 비-세포 기초된 측정법에 이용된다. 재조합 방식으로 발현된 인간 CD19 폴리펩티드는 비-세포 기초된 스크리닝 측정법에 이용될 수 있다. 대안으로, 인간 CD19 항원의 하나이상의 결합 부분에 상응하는 펩티드, 또는 인간 CD19 항원의 하나이상의 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이 인간 CD19 항원의 일부분에 결합하는 항체를 확인하는 비-세포 기초된 측정 시스템에 이용될 수 있다. 비-세포 기초된 측정법에서, 재조합 방식으로 발현된 인간 CD19는 당업자에게 널리 공지된 수단에 의해, 검사 튜브, 마이크로역가 웰 또는 칼럼과 같은 고정 기질에 부착된다(참조: Ausubel et al., supra). 이후, 이들 검사 항체는 인간 CD19 항원에 결합하는 능력이 검사된다.
- [0183] 대안으로, 결합 반응은 용액 내에서 수행된다. 이러한 측정법에서, 표지된 성분은 용액 내에서 결합 상대와 상호작용하게 된다. 표지된 성분과 이의 결합 상대 사이에 크기 차이가 분리를 가능하게 하면, 이런 분리는 결합되지 않은 표지된 성분이 통과하지만 결합 상대 또는 결합 상대에 결합된 표지된 성분이 통과하지 못하는 구멍을 보유하는 한외여과막을 통하여 결합 반응의 산물을 통과시킴으로써 달성될 수 있다. 분리는 용액으로부터 표지된 성분의 결합 상대, 예를 들면, 결합 상대에 대한 항체 등을 포획할 수 있는 임의의 반응물을 이용하여 달성될 수도 있다.
- [0184] 한 구체예에서, 가령, 파지 라이브러리는 고체 상(solid phase), 예를 들면, 플라스틱 비드에 연결된 정제된 인간 CD19 항원, 또는 이의 유도체, 유사체, 단편, 또는 도메인을 포함하는 칼럼을 통하여 연속 파지 전사 라이브러리로부터 파지를 계대배양함으로써 스크리닝될 수 있다. 세척 완충액의 엄밀도(stringency)를 변화시킴으로써, 인간 CD19 항원에 대한 높은 친화성을 갖는 펩티드를 발현하는 파지를 농축하는 것이 가능하다. 칼럼으로부터 분리된 파지는 클론되고, 친화성이 직접적으로 측정될 수 있다. 어떤 항체 및 이들의 아미노산 서열이 인간 CD19 항원에 대한 가장 강한 결합을 공여하는 지를 인지하는 경우에, 컴퓨터 모형을 이용하여 CD19 항원과 후보 항체 사이에 분자 접촉을 확인할 수 있다.
- [0185] 본 발명의 이러한 측면의 다른 특정 구체예에서, 고체 서포트는 마이크로역가 접시에 부착된 인간 CD19 항원을 포함하는 막이다. 예로써, 후보 항체는 마이크로역가 접시 내에 라이브러리 구성원의 발현을 가능하게 하는 조건 하에 배양된 라이브러리 항체를 발현하는 세포에 결합할 수 있다. 인간 CD19에 결합하는 라이브러리 막이 회수된다. 이들 방법은 예로써, Parmley and Smith, 1988, Gene, 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques, 13:422-427; PCT Publication No. W094/18318 및 이들 문헌에 언급된 참고문헌에 전반적으로 기술된다. 인간 CD19 항원에 결합하는 것으로 확인된 항체는 앞서 기술된 항체의 임의 유형 또는 변형일 수 있다.
- [0186] 3.2. 인간 ADCC 작동체 기능을 위한 항체의 스크리닝
- [0187] 인간 IgG 분류의 항체는 본 발명에서 선호되는데, 그 이유는 이들이 혈청 내에서 긴 반감기와 같은 기능적 특성을 갖고 다양한 작동체 기능을 매개할 수 있기 때문이다(Monoclonal antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)). 인간 IgG 분류 항체는 아래의 4가지 하위분류: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4로 더욱 분류된다. IgG 분류 항체의 작동체 기능으로서 ADCC와 CDC 및 아포토시스 활성화에 대한

다수의 연구가 수행되었는데, 인간 IgG 분류의 항체 중에서, IgG1 하위분류가 인간에서 가장 높은 ADCC 활성과 CDC 활성을 갖는 것으로 보고되었다(Chemical Immunology, 65, 88 (1997)).

[0188] 인간 IgG1 하위분류 항체의 ADCC 활성과 CDC 활성 및 아포토시스 활성의 발현은 일반적으로, 킬러 세포, 자연 킬러 세포 또는 활성화된 대식세포와 같은 작동체 세포의 표면 상에 존재하는, 항체에 대한 수용체(이후, “Fc γ R”)에 항체의 Fc 영역의 결합을 수반한다. 다양한 보체 성분이 결합될 수 있다. 이러한 결합과 관련하여, 항체의 힌지 영역과 C 영역의 두 번째 도메인(이후, “C γ 2 도메인”) 내에서 여러 아미노산 잔기가 중요하고 (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)), C γ 2 도메인 내에서 당 사슬 역시(Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) 역시 중요한 것으로 제안되었다.

[0189] 본 발명의 항-CD19 항체는 항체의 작동체 기능과 관련하여, 예를 들면, ADCC 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및/또는 아포토시스 활성을 강화시키기 위하여 변형될 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성된다. 대안으로 또는 부가적으로, 이러한 영역 내에 사슬간 이황화결합 형성을 위하여 시스테인 잔기가 Fc 영역 내에 도입될 수 있다. 이러한 방식으로, 향상된 내재화 능력(internalization capability) 및 증가된 보체-매개된 세포 사멸과 ADCC를 나타내는 동종이량체 항체가 산출될 수 있다(Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992); Shopes, J Immunol., 148:2918-2922 (1992)). 강화된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체를 산출하기 위하여 이중이중성 가교-결합제 역시 사용될 수 있다(Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)). 항체는 강화된 보체 용해(complement lysis)와 ADCC 능력을 결과하는 2개 이상의 Fc 영역을 보유하도록 조작될 수 있다(Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, (3)219-230 (1989)).

[0190] 작동체 기능을 변화시키기 위하여 항체의 Fc 영역을 조작하는 다른 방법은 당분야에 공지되어 있다(가령, Fc γ RIIA에 대한 결합 친화성에 비하여 Fc γ RIIB에 대한 결합 친화성을 강화시키기 위한 Fc 영역의 변형을 기술하는 U.S. Patent Publication No. 20040185045와 PCT Publication No. WO 2004/016750, Koenig et al.; 참조: PCT Publication No. WO 99/58572(Armour et al.), WO 99/51642(Idusogie et al.), U.S. 6,395,272(Deo et al.)). Fc γ RIIB에 대한 결합 친화성을 감소시키기 위하여 Fc 영역을 변형하는 방법 역시 당분야에 공지되어 있다(가령, U.S. Patent Publication No. 20010036459와 PCT Publication No. WO 01/79299, Ravetch et al.). 야생형 Fc 영역에 비하여 Fc γ RIIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대하여 강화된 결합 친화성을 갖는 변이 Fc 영역을 보유하는 변형된 항체 역시 보고되었다(가령, PCT Publication No. WO 2004/063351, Stavenhagen et al.).

[0191] 적어도 4가지 상이한 유형의 Fc γ R이 발견되었는데, 이들은 각각, Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), Fc γ RIII(CD16), Fc γ RIV로 불린다. 인간에서, Fc γ RII와 Fc γ RIII은 각각, Fc γ RIIa와 Fc γ RIIb 및 Fc γ RIIIa와 Fc γ RIIIb로 더욱 분류된다. Fc γ R은 면역글로불린 대과에 속하는 막 단백질이고, Fc γ RII, Fc γ RIII, Fc γ RIV는 2개의 면역글로불린-유사 도메인을 보유하는 세포외 영역을 보유하는 α 사슬이고, Fc γ RI는 구성 요소로서 3개의 면역글로불린-유사 도메인을 보유하는 세포외 영역을 보유하는 α 사슬인데, 상기 α 사슬은 IgG 결합 활성에 관여한다. 이에 더하여, Fc γ RI와 Fc γ RIII은 α 사슬과 관련하여 신호 전달(signal transduction) 기능을 갖는 구성 요소로서 γ 사슬 또는 ζ 사슬을 보유한다(Annu. Rev. Immunol, 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol, 19, 275 (2001)). Fc γ RIV는 Bruhns et al., Clin. Invest. Med., (Canada) 27:3D (2004)에서 보고되었다.

[0192] 목적하는 항-CD19 항체의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, U.S. Patent No. 5,500,362 또는 5,821,337에서 기술된 바와 같은 시험관내 ADCC 활성 측정법을 이용할 수 있다. 이런 측정법에 유용한 작동체 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC)와 자연 킬러(NK) 세포이다. 가령, 보체 활성화 및/또는 ADCC에 의한 표적 세포의 용해를 매개하는 특정 항체의 능력을 평가할 수 있다. 목적하는 세포는 시험관내에서 성장되고 표지된다; 항체는 항원 항체 복합체에 의해 활성화되는 면역 세포, 다시 말하면, ADCC 반응에 관여하는 작동체 세포와 공동으로 세포 배양액에 추가된다. 항체는 또한, 보체 활성화를 검사할 수 있다. 어떤 경우든, 표적 세포의 세포용해는 용해된 세포로부터 표지의 방출로 검출된다. 실제로, 항체는 보체 및/또는 면역 세포의 공급원으로서 환자의 자기 혈청을 이용하여 스크리닝할 수 있다. 시험관내 검사에서 인간 ADCC를 매개할 수 있는 항체는 특정 환자의 치료에 사용될 수 있다. 대안으로, 또는 부가적으로, 목적하는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들면, dynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)에 기술된 바와 같은 동물 모형에서 평가할 수 있다. 게다가, 항체의 ADCC 수준 및 선택적으로, CDC 활성 및 선택적으로, 아포토시스 활성을 조절하는(즉, 증가 또는 감소시키는) 기술은 당분야에 널리 공지되어 있다(참조: U.S. Patent No. 6,194,551., Chaouchi et al., J. Immunol., 154(7): 3096-104 (1995); Pedersen et al., Blood, 99(4): 1314-1318 (2002); Alberts et al., Molecular Biology of the Cell; Steensma et al., Methods Mol Med., 85: 323-32, (2003)). 적절하게는, 본 발명의 항체는 ADCC 및/또는

CDC 및/또는 아폽토시스 반응을 유도할 수 있거나, 이러한 반응을 유도하는 능력을 갖도록 변형된다. 적절하게는, ADCC 기능을 결정하는 이들 측정법은 인간 ADCC 기능을 평가하는 인간 작동체 세포를 이용하여 수행된다.

[0193] 3.3. 면역공액체(immunconjugate)와 융합 단백질

[0194] 본 발명의 특정 측면에 따라, 치료제 또는 독소는 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 키메라, 인간, 또는 인간화 항-CD19 항체에 공액될 수 있다. 특정 구체예에서, 이들 공액체는 융합 단백질로서 산출될 수 있다(참조: 섹션 “변형된/변이 항체”). 치료제와 독소의 실례에는 엔다이인(enediynes) 계통의 분자, 예를 들면, 칼리케아마이신(calicheamicin)과 에스페라마이신(esperamicin)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 화학적 독소는 듀오카르마이신(duocarmycin)(참조: U.S. Patent No. 5,703,080과 U.S. Patent No. 4,923,990), 메토틱렉세이트(methotrexate), 독소루비신(doxorubicin), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), ARA-C, 빈데신(vindesine), 미토마이신(mitomycin) C, 시스-플라티늄(cis-platinum), 에토포시드(etoposide), 블레오마이신(bleomycin), 5-플루오르우라실(flourouracil)에서 선택될 수도 있다. 또한, 화학치료제의 실례에는 아드리아마이신(Adriamycin), 독소루비신(Doxorubicin), 5-플루오르우라실(Fluorouracil), 시토신 아라비노시드(Cytosine arabinoside, Ara-C), 사이클로포스파마이드(Cyclophosphamide), 티오테파(Thiotepa), 탁소테레(Taxotere)(docetaxel), 부설판(Busulfan), 사이톡신(Cytosine), 탁솔(Taxol), 메토틱렉세이트(Methotrexate), 시스플라틴(Cisplatin), 멜팔란(Melphalan), 빈블라스틴(Vinblastine), 블레오마이신(Bleomycin), 에토포시드(Etoposide), 이포스파마이드(Ifosfamide), 미토마이신(Mitomycin) C, 미톡산트론(Mitoxantrone), 빈크레이스틴(Vincristine), 비노렐빈(Vinorelbine), 카르보플라틴(Carboplatin), 테니포시드(Teniposide), 다우노마이신(Daunomycin), 카르미노마이신(Carminomycin), 아미노프테린(Aminopterin), 닥티노마이신(Dactinomycin), 미토마이신(Mitomycin), 에스페라마이신(Esperamicin)(참조: U.S. Patent No. 4,675,187), 멜팔란(Melphalan), 다른 관련된 질소 겨자(nitrogen mustard) 등이 포함된다.

[0195] 다른 구체예에서, 예로써, “CVB” (1.5 g/m² 사이클로포스파마이드, 200-400 mg/m² 에토포시드, 150-200 mg/m² 카르무스틴)가 본 발명의 복합 요법에 사용될 수 있다. CVB는 비-호지킨 림프종을 치료하는데 이용되는 처방이다(Patti et al., Eur. J. Haematol., 51:18 (1993)). 다른 적합한 복합 화학치료 처방은 당업자에게 널리 공지되어 있다(참조: Freedman et al., “Non-Hodgkin's lymphomas,” in Cancer Medicine, Volume 2, 3rd Edition, Holland et al. (eds.), pp. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993)). 예시로써, 중간-등급 비-호지킨 림프종의 치료를 위한 1세대 화학치료 처방에는 C-MOPP(사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 프로카르바진, 프레드니손)와 CHOP(사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손)가 포함된다. 유용한 2세대 화학치료 처방은 m-BACOD(메토틱렉세이트, 블레오마이신, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 텍사메타손, 레우코보린(leucovorin))이고, 적합한 3세대 처방은 MACOP-B(메토틱렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 프레드니손, 블레오마이신, 레우코보린)이다. 다른 유용한 약제는 페닐 부티레이트(phenyl butyrate)와 브로스타틴(brostatin)-1이다.

[0196] 본 발명의 면역공액체에 이용될 수 있는 다른 독소에는 유독성 렉틴(lectin); 식물성 독소, 예를 들면, 리신(ricin), 아브린(abrin), 모데신(modeccin), 보툴리나(botulina), 디프테리아 독소 등이 포함된다. 당연히, 다양한 독소의 조합 역시 하나의 항체 분자에 결합되어 다양한 세포독성을 도모할 수 있다. 본 발명의 복합 요법에 적절하게 이용되는 독소의 전형은 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNase I, 포도상구균 장독소(Staphylococcal enterotoxin)-A, 섬자리공(pokeweed) 항-바이러스 단백질, 젤로닌(gelonin), 디프테리아 독소(diphtherin toxin), 슈도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin), 슈도모나스 내독소(Pseudomonas endotoxin)이다(참조: Pastan et al., Cell, 47:641 (1986); Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994)). 이용될 수 있는 효소 활성 독소와 이의 단편에는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(녹농균(Pseudomonas aeruginosa)으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신(modeccin) A 사슬, 알파-사르진(alpha-sarcin), 유동(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 미국자리공(Phytolacca americana) 단백질(PAPI, PAPII, PAP-S), 모모르디카 차란티아(Momordica charantia) 저해물질, 쿠르신(curcin), 크로틴(croton), 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 저해물질, 젤로닌(gelonin), 미토젤린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin), 트리코테센(tricothecene) 등이 포함된다(참조: 1993년 10월 28일자 공개된 WO 93/21232).

[0197] 적합한 독소와 화학치료제는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) 및 Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)에서 기술된다. 다른 적합한 독소 및/또는 화학치료제는 당분야에 널리 공지되어 있다.

- [0198] 본 발명의 항-CD19 항체는 프로드러그(가령, 펩티딜 화학치료제, W081/01145 참조)를 활성 항암 약제로 전환시키는 프로드러그-활성화 효소(prodrug-activating enzyme)에 상기 항체를 공액함으로써 ADEPT에도 이용될 수 있다(참조: WO 88/07378과 U.S. Patent No. 4,975,278). ADEPT에 유용한 면역공액체의 효소 성분에는 프로드러그에 이런 방식으로 작용하여 상기 프로드러그를 활성 세포독성 형태로 전환시키는 효소가 포함된다.
- [0199] 본 발명의 방법에 유용한 효소에는 인산염-포함 프로드러그를 유리 형태로 전환시키는데 유용한 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase); 황산염-포함 프로드러그를 유리 형태로 전환시키는데 유용한 아릴설파타아제(arylsulfatase); 비-독성 5-플루오로시토신(fluorocytosine)을 항암제, 5-플루오로우라실(flourouracil)로 전환시키는데 유용한 시토신 디아미나아제(cytosine deaminase); 펩티드-포함 프로드러그를 유리 약제로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들면, 세라티아 프로테아제(serratia protease), 열용해소(thermolysin), 서브틸리신(subtilisin), 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase), 카텡신(cathepsin)(가령, 카텡신 B와 L); D-아미노산 치환기를 보유하는 프로드러그를 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다아제(alanylcarboxypeptidase); 당화된 프로드러그를 유리 약제로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들면, β -갈락토시다아제와 뉴라민 가수분해효소(neuraminidase); α -락탐(lactam)으로 유도체화된 약제를 유리 약제로 전환시키는데 유용한 β -락타마아제(lactamase); 아민 질소(amine nitrogen)에서 각각, 페녹시아세틸(phenoxyacetyl) 또는 페녹시아세틸 기로 유도체화된 약제를 유리 약제로 전환시키는데 유용한 페니실린 아미다아제(penicillin amidase), 예를 들면, 페니실린 V 아미다아제(penicillin V amidase) 또는 페니실린 G 아미다아제(penicillin G amidase)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 대안으로, 당분야에서 “항체 효소(abzyme)”로 알려져 있는, 효소 활성을 갖는 항체가 본 발명의 프로드러그를 유리 활성 약제로 전환시키는데 사용될 수 있다(참조: Massey, Nature 328:457-458 (1987)). 항체-항체 효소 공액체는 B 세포 악성종양으로 고생하는 인간의 요망되는 신체 일부로 항체 효소의 전달을 위하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 본 발명의 이들 효소는 앞서 언급된 이중이중성 가교연결 반응물의 이용과 같은 당분야에 널리 공지된 기술로 항체에 공유 결합될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적인 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원-결합 영역을 포함하는 융합 단백질이 당분야에 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 작제될 수 있다(참조: Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984)).
- [0200] 본 발명의 항-CD19 항체의 공유 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이들은 가능하면, 항체의 화학적 합성, 또는 효소적 또는 화학적 절단으로 만들어진다. 항-CD19 항체의 다른 유형의 공유 변형은 상기 항체의 표적된 아미노산 잔기를 선별된 측쇄, 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)와 반응시킴으로써 분자 내에 도입된다.
- [0201] 시스테인yl(cysteiny) 잔기는 통상적으로, α -할로아세트레이트(haloacetate)(및 상응하는 아민), 클로로아세트산(chloroacetic acid) 또는 클로로아세트아마이드(chloroacetamide)와 반응하여 카르복시니에틸(carboxyniethyl) 또는 카르복시아미도메틸(carboxyamidomethyl) 유도체를 제공한다. 유사하게, 요오드-반응물(iodo-reagent) 역시 사용될 수 있다. 또한, 시스테인yl 잔기는 브로모트리플루오로아세톤(bromotrifluoroacetone), α -브로모- β -(5-이미다졸릴)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트(chloroacetyl phosphate), N-알킬말레이미드(alkylmaleimide), 3-니트로-2-피리딜 이황화결합, 메틸 2-피리딜 이황화결합, p-클로로머큐리벤조에이트(chloromercuribenzoate), 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응으로 유도체화된다.
- [0202] 히스티딜(histidyl) 잔기는 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate)와의 반응으로 유도체화되는데, 그 이유는 상기 작용체가 히스티딜 측쇄에 상대적으로 특이적이기 때문이다. 파라-브로모페나실 브로마이드(Para-bromophenacyl bromide) 역시 유용하다; 반응은 가급적, pH 6.0에서 0.1 M 나트륨 카코딜레이트(sodium cacodylate)에서 진행된다.
- [0203] 리실(lysyl)과 아미노-말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응한다. 이들 작용제로 유도체화는 리시닐 잔기의 전하를 반전시키는 효과를 갖는다. α -아미노-포함 잔기 및/또는 ϵ -아미노-포함 잔기를 유도체화시키는데 적합한 다른 반응물에는 메틸 피콜린이미데이트(methyl picolinimidate)와 같은 이미도에스테르(imidoester), 피리독살 포스페이트(pyridoxal phosphate), 피리독살(pyridoxal), 클로로보로하이드리드(chloroborohydride), 트리니트로벤젠설폰산(trinitrobenzenesulfonic acid), 0-메틸이소요소(methylisourea), 2,4-펜탄디온(pentanedione), 글리옥시레이트(glyoxylate)와 트랜스아미나아제(transaminase)-촉매된 반응 등이 포함된다.
- [0204] 아르기닐(arginyl) 잔기는 하나이상의 통상적인 반응물, 특히, 페닐글리옥살(phenylglyoxal), 2,3-부탄디온

(butanedione), 1,2-사이클로헥산디온(cyclohexanedione), 닐하이드린(ninhydrin)과의 반응으로 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 일반적으로, 구아니딘(guanidine) 기능기의 높은 pKa로 인하여 알칼리성 조건하에 수행되어야 한다. 더 나아가, 이들 반응물은 리신의 ϵ -아미노 기 및 아르기닌 엡실론-아미노 기와 반응한다.

[0205] 티로실(tyrosyl) 잔기의 특이적인 변형은 방향족 디아조늄(diazonium) 화합물 또는 테트라니트로메탄(tetranitromethane)과의 반응으로 티로실 잔기 내로 스펙트럼 라벨(spectral label)을 도입하는데 있어 특히 주목된다. 가장 일반적으로, N-아세틸이미디아졸(acetylimidazole)과 테트라니트로메탄은 각각, O-아세틸 티로실 잔기와 3-니트로 유도체를 형성하는데 이용된다. 티로실 잔기는 방사선면역측정법에 이용되는 표지된 단백질을 제조하기 위하여 ^{125}I 또는 ^{131}I 를 이용하여 요오드화된다.

[0206] 카르복실 측기(side group)(아스파르트릴 또는 글루타미닐)는 카르보디이미드(carbodiimide)($\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R'}$)과의 반응으로 선택적으로 변형되는데, 여기서 R과 R'는 상이한 알킬 기, 예를 들면, 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보디이미드이다. 더 나아가, 아스파르트릴과 글루타미닐 잔기는 암모늄 이온과의 반응으로 아스파라기닐과 글루타미닐 잔기로 전환된다. 글루타미닐과 아스파라기닐 잔기는 빈번하게, 상응하는 글루타미닐과 아스파르트릴 잔기로 전환된다. 이들 잔기는 중성 또는 염기성 조건 하에 탈아미드화(deamidation)된다. 이들 잔기의 탈아미드화된 형태는 본 발명의 범위에 속한다.

[0207] 다른 변형에는 프롤린과 리신의 하이드록실화(hydroxylation); 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실 기의 인산화(phosphorylation); 리신, 아르기닌, 히스티딘 측쇄의 α -아미노 기의 메틸화(methylation)(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N-말단 아민의 아세틸화(acetylation), C-말단 카르복실 기의 아미드화(amidation) 등이 포함된다.

[0208] 다른 유형의 공유 변형은 항체에 글리코시드를 화학적으로 또는 효소적으로 결합시키는 과정에 관계한다. 이들 절차는 N- 또는 O-연결된 당화(glycosylation)를 위한 당화 능력을 갖는 숙주 세포 내에서 항체의 생산을 요하지 않는다는 점에서 유리하다. 이용된 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌과 히스티딘, (b) 유리 카르복실 기, (c) 유리 설파이드릴(sulfhydryl) 기, 예를 들면, 시스테인의 유리 설파이드릴 기, (d) 유리 하이드록실 기, 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실 기, (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착된다. 이들 방법은 1987년 9월 11일자 공개된 WO 87/05330 및 Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)에 기술된다.

[0209] 4. 약학적 제제, 투여 및 용량

[0210] 본 발명의 약학적 제제는 활성 성분으로서, 인간, 인간화, 또는 키메라 항-CD19 항체를 함유한다. 이들 제제는 인간 환자에 투여하기 적합한 중량이나 부피 단위에서 요망하는 반응을 유도하는데 효과적인 양으로, 나신 항체, 면역공액체, 또는 융합 단백질을 함유하고, 가급적 무균이다. 상기 반응은 예로써, 순환 B 세포 고갈, 조직 B 세포 고갈, B 세포 악성종양의 퇴행, 또는 병적 증상(disease symptom)의 감소와 같은, 항-CD19 항체 조성물의 생리학적 효과를 결정함으로써 측정될 수 있다. 다른 측정법은 당업자에게 공지되어 있고, 이러한 반응의 수준을 측정하는데 이용될 수 있다.

[0211] 4.1. 약학적 제제

[0212] 항-CD19 항체 조성물은 약학적으로 허용되는 담체로 제조된다. “약학적으로 허용되는”은 활성 성분의 생리학적 활성의 효능을 간섭하지 않는 하나 이상의 비-독성 물질을 의미한다. 이런 제조물은 통상적으로, 염, 완충제, 보존제, 친화성 담체 및 임의의 다른 치료제를 또한 함유한다. 이들 약학적으로 허용되는 제조물은 통상적으로, 인간에게 투여하는데 적합한 친화성 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화제(encapsulating substance)를 또한 함유한다. 의약품으로 사용되는 경우에, 이들 염은 약학적으로 허용되어야 하지만, 약학적으로 허용되지 않는 염이 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제조하는데 편의하게 이용될 수 있고 본 발명의 범위에서 배제되지 않는다. 이와 같은 약학적으로 및 약학적으로 허용되는 염에는 아래의 산: 염화수소산, 염화브롬산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, 구연산, 붕산, 포름산, 말론산, 숙신산 등으로부터 제조된 염들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 또한, 약학적으로 허용되는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 염, 예를 들면, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염으로서 제조될 수 있다. “담체”는 적용을 용이하게 하기 위하여 활성 성분이 결합되는 자연이나 합성의 유기 또는 무기 성분을 의미한다. 이들 약학적 조성물의 성분은 또한, 요구되는 약학적 효능을 현저하게 손상시키는 상호작용이 존재하지 않도록 하는 방식으로, 본 발명의 항체 및 서로 혼합될 수 있다.

- [0213] 본 발명의 다른 측면에서, 항-CD19 항체 조성물은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체 또는 면역공액체를 임의의 생리화적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써, 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로, 저장용으로 제조될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 제 16판, Osol, A. Ed. (1999)). 허용되는 운반체, 부형제, 또는 안정화제는 이용된 용량과 농도에서 수용자에게 비독성이고, 인산염, 구연산염 및 다른 유기 산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제(가령, 옥타데실디메틸벤질염화암모늄; 염화헥사메토늄(hexamethonium chloride); 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride), 염화벤제토늄(benzethonium chloride); 페놀, 부틸 또는 벤질알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; m-크레졸); 낮은 분자량(대략 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 당류, 이당류 및 글루코오스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 금속 복합체(가령, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0214] 항-CD19 항체 조성물은 또한, 염화벤잘코늄; 클로로부탄올; 파라벤; 치메로살(thimerosal)과 같은 적절한 보존제를 선택적으로 함유한다.
- [0215] 항-CD19 항체 조성물은 단위 제형(unit dosage form)으로 제공되고 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법으로 제조된다. 모든 방법은 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 활성제를 접촉시키는 단계를 수반한다. 일반적으로, 이들 조성물은 활성 화합물을 액체 담체, 미세하게 분할된 고체 담체, 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 접촉시키고, 필요한 경우에, 산물을 성형함으로써 제조된다.
- [0216] 비경구 투여에 적합한 조성물은 항-CD19 항체의 무균 수성 또는 비-수성 제조물을 편의하게 함유하는데, 이는 가급적, 수용자의 혈액과 등장성이다. 이러한 제조물은 적당한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용한 공지된 방법에 따라 제조된다. 이러한 무균 주사가능 제조물은 비-독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매에 녹인 무균 주사가능 용액이나 현탁액, 예를 들면, 1,3-부탄 디올에 녹인 용액일 수도 있다. 사용될 수 있는 허용되는 운반체와 용매에는 물, 링거액, 등장성 염화나트륨 용액이 포함된다. 이에 더하여, 무균의 고정 오일이 용매 또는 현탁 매체로서 통상적으로 사용된다. 이런 목적으로, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 비롯한 임의의 순한 고정 오일이 사용될 수 있다. 이에 더하여, 올레산과 같은 지방산이 주사가능 제조물에 사용된다. 경구, 피하, 정맥내, 근육내 투여에 적합한 담체 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA에서 확인할 수 있다. 특정 구체예에서, 다양한 경로의 투여에 적합한 담체 제제는 RITUXANTM에서 기술된 것과 동일하거나 유사할 수 있다(참조: Physicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ, 2005), pp. 958-960 and 1354-1357). 본 발명의 특정 구체예에서, 항-CD19 항체 조성물은 염화나트륨, 구연산나트륨 이수화물(sodium citrate dihydrate), 폴리소르베이트(polysorbate) 80으로 정맥내 투여용으로 제조되는데, 여기서 조성물의 pH는 대략 6.5로 조정된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 정맥내 주사는 항체가 순환계를 통하여 급속하게 분산되기 때문에 유용한 투여 방식이다. 하지만, 정맥내 투여는 맥관구조(vasculature)와 내피하 기질(subendothelial matrix)의 내피 세포를 포함하는 혈관 장벽(vascular barrier)에 의해 제한된다. 또한, 이러한 혈관 장벽은 고형 종양(solid tumor)에 의한 치료 항체의 흡수에도 중요한 문제점이다. 림프종은 상대적으로 높은 혈류 속도(blood flow rate)를 보유하기 때문에, 효과적인 항체 전달에 기여한다. 림프관(intralymphatic) 투여 경로, 예를 들면, 피하 또는 근육내 주사, 또는 림프관(lymphatic vessel)의 도관삽입(catheterization) 역시 B 세포 림프종을 치료하는데 유용한 수단을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법 항-CD19 항체는 피하에 자기-투여된다. 이와 같은 바람직한 구체예에서, 조성물은 대략 50 mg/ml로, 동결건조된 약제로서 제조되거나, 또는 액체 완충제(가령, PBS 및/또는 구연산염)에 담겨 제조된다.
- [0217] 본 명세서에서 제제는 치료되는 특정 증상에 필요한 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는, 서로 부정적인 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 활성 화합물을 함유할 수도 있다. 가령, 면역억제제를 더욱 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 적절하게는, 이들 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.
- [0218] 이들 활성 성분은 또한, 예로써, 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 각각, 콜로이드성 약물 전달 시스템(가령, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전에서 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 트랩될 수 있다. 이들 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th

edition, Osol, A. Ed. (1980)에서 기술된다.

- [0219] 생체내 투여에 사용되는 이들 제제는 전형적으로, 무균이다. 이는 무균 여과 막을 통한 여과로 달성된다.
- [0220] 서방(sustained-release) 제조물이 제조될 수 있다. 서방 제조물의 적절한 실례는 항-CD19 항체를 포함하는 고체 소수성 폴리머의 반투성 매트릭스를 포함하는데, 상기 매트릭스는 형상 물품, 예를 들면, 막 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방 매트릭스의 실례는 폴리에스테르, 하이드로겔(가령, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드(U.S. Patent No. 3,773,919), L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 코폴리머(가령, LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 코폴리머 및 레우프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미소구), 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트와 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 분자의 방출이 가능하지만, 특정 하이드로겔은 더욱 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 오랜 기간 동안 체내에 머무르면, 이들은 37°C에서 수분에 대한 노출의 결과로서 변성되거나 응집되어 생물학적 활성의 상실 및 면역원성에서 가능한 변화가 초래된다. 관련된 기전에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 가령, 응집 기전(aggregation mechanism)이 티오-이황화물 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 관찰되면, 안정화는 설피드릴 잔기를 변형하고, 산성 용액으로부터 동결건조시키고, 수분 함량을 제어하고, 적절한 첨가제를 이용하고, 특이적인 폴리머 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물에 사용되는 약학적으로 허용되는 담체는 인간 ADCC 또는 CDC에 영향을 주지 않는다.
- [0221] 본 명세서에 기술된 항-CD19 항체 조성물은 면역리포솜(immunoliposome)으로서 제조될 수도 있다. “리포솜”은 약제(가령, 본 명세서에 기술된 항-CD19 항체)의 인간으로의 전달에 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성되는 소형 소포(nesicle)이다. 리포솜의 성분은 통상적으로, 생물학적 막의 지질 정렬과 유사한 이중층 형태로 정렬된다. 본 발명의 항체를 포함하는 리포솜은 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); U.S. Patent No. 4,485,045와 4,544,545에 기술된 바와 같은, 당분야에 공지된 방법으로 제조된다. 강화된 순환 시간(circulation time)을 갖는 리포솜은 U.S. Patent No. 5,013,556에 기술된다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물로 역상 증발 방법에 의해 생산될 수 있다. 리포솜은 한정된 구멍 크기의 필터를 통해서 압출성형되어 원하는 직경을 갖는 리포솜을 산출한다. 본 발명의 항체는 이황화물 교환 반응을 통해 Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)에서 기술된 바와 같이, 리포솜에 공액될 수 있다. 치료제 역시 리포솜 내에 내포될 수 있다(참조; Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989)).
- [0222] 바람직한 일부 약학적 제제에는 아래와 같은 산물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0223] (a) 100 mg(10 ml) 또는 500 mg(50 ml) 1회용 바이알에 담겨 10 mg/ml의 농도로 공급되는, 항-CD19 항체의 정맥내(i.v.) 투여용 무균의 보존제-없는 액체 농축물. 상기 산물은 염화나트륨, 구연산나트륨 이수화물, 폴리소르베이트 및 주사용 무균수(sterile water)를 이용하여 i.v. 투여용으로 제조될 수 있다. 가령, 상기 산물은 9.0 mg/ml 염화나트륨, 7.35 mg/ml 구연산나트륨 이수화물, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80, 주사용 무균수에서 제조될 수 있다. pH는 6.5로 조정된다.
- [0224] (b) 1회용 바이알에 담긴 피하(s.c.) 주사용 무균의 동결건조된 분말. 상기 산물은 수크로오스, L-히스티딘 염산모노하이드레이트, L-히스티딘 및 폴리소르베이트 20로 제조될 수 있다. 가령, 각 1회용 바이알은 150 mg 항-CD19 항체, 123.2 mg 수크로오스, 6.8 mg L-히스티딘 염산모노하이드레이트, 4.3 mg L-히스티딘, 3 mg 폴리소르베이트 20을 포함할 수 있다. 1.3 ml의 주사용 무균수로 1회용 바이알의 재구성(reconstitution)은 대략 1.5 ml 용액을 산출하고 1.25 ml당 125 mg(100 mg/ml)의 항체를 전달하였다.
- [0225] (c) 정맥내(i.v.) 투여를 위한 무균의 보존제-없는 동결건조된 분말. 상기 산물은 α-트레할로스 이수화물, L-히스티딘 HCl, 히스티딘, 폴리소르베이트 20, USP로 제조될 수 있다. 가령, 각 바이알은 440 mg 항-CD19 항체, 400 mg α, α-트레할로스 이수화물, 9.9 mg L-히스티딘 HCl, 6.4 mg L-히스티딘, 1.8 mg 폴리소르베이트 20, USP를 포함할 수 있다. 보존제로서 1.1% 벤질 알코올(benzyl alcohol)을 함유하는 20 ml의 정균처리한 주사용수(bacteriostatic water for injection) (BWHI), USP로 재구성은 대략 6의 pH에서 21 mg/ml 항체를 함유하는 복수-분량 용액을 산출한다.
- [0226] (d) 항-CD19 항체가 수크로오스, 폴리소르베이트, 일염기성 인산나트륨 이수화물(monobasic sodium phosphate monohydrate), 이염기성 인산나트륨 이수화물(dibasic sodium phosphate dihydrate)로 제조되는, 정맥내 주입

용 무균의 동결건조된 분말. 가령, 각 1회용 바이알은 100 mg 항체, 500 mg 수크로오스, 0.5 mg 폴리소르베이트 80, 2.2 mg 일염기성 인산나트륨 이수화물, 6.1 mg 이염기성 인산나트륨 이수화물을 포함할 수 있다. 보존제는 존재하지 않는다. 10 ml의 주사용 무균수, USP로 재구성 이후, 결과의 pH는 대략 7.2이다.

[0227] (e) 1회용, 1 ml 미리-충전된 주사기로 공급되는 피하 주사용 무균의 보존제-없는 용액. 상기 산물은 염화나트륨, 일염기성 인산나트륨 이수화물, 이염기성 인산나트륨 이수화물, 구연산나트륨, 구연산 일수화물, 만니톨, 폴리소르베이트 80, 주사용수, USP로 제조될 수 있다. pH를 대략 5.2로 조정하기 위하여 수산화나트륨이 추가될 수도 있다. 가령, 각 주사기는 0.8 ml(40 mg)의 약제 산물을 전달하도록 제조될 수 있다. 각 0.8 ml는 40 mg 항-CD19 항체, 4.93 mg 염화나트륨, 0.69 mg 일염기성 인산나트륨 이수화물, 1.22 mg 이염기성 인산나트륨 이수화물, 0.24 mg 구연산나트륨, 1.04 mg 구연산 일수화물, 9.6 mg 만니톨, 0.8 mg 폴리소르베이트 80, 주사용수, USP를 포함한다.

[0228] (f) 무균 주사용수(SWFI), USP로 재구성되고 피하(s.c.) 주사로 투여되는, 1회용 바이알에 포함된 무균의 보존제-없는 동결건조된 분말. 상기 산물은 수크로오스, 히스티딘 염산모노하이드레이트, L-히스티딘, 폴리소르베이트로 제조될 수 있다. 가령, 75 mg 바이알은 129.6 mg 또는 112.5 mg의 항-CD19 항체, 93.1 mg 수크로오스, 1.8 mg L-히스티딘 염산모노하이드레이트, 1.2 mg L-히스티딘, 0.3 mg 폴리소르베이트 20를 포함할 수 있고, 0.9 ml SWFI, USP로 재구성 이후 0.6 ml에서 75 mg의 항체를 전달하도록 설계된다. 150 mg 바이알은 202.5 mg 또는 175 mg 항-CD19 항체, 145.5 mg 수크로오스, 2.8 mg L-히스티딘 염산모노하이드레이트, 1.8 mg L-히스티딘, 0.5 mg 폴리소르베이트 20를 포함할 수 있고, 1.4 ml SWFI, USP로 재구성 이후 1.2 ml에서 150 mg의 항체를 전달하도록 설계된다.

[0229] (g) 무균 주사용수로 재구성을 위한 무균의 동결건조된 산물. 상기 산물은 만니톨, 히스티딘, 글리신을 이용하여 근육내(IM) 주사를 위한 1회용 바이알로서 제조될 수 있다. 가령, 각 1회용 바이알은 100 mg 항체, 67.5 mg 만니톨, 8.7 mg 히스티딘, 0.3 mg 글리신을 포함할 수 있고, 1.0 ml 무균 주사용수로 재구성되는 경우에 1.0 ml에서 100 mg 항체를 전달하도록 설계된다. 대안으로, 각 1회용 바이알은 50 mg 항체, 40.5 mg 만니톨, 5.2 mg 히스티딘, 0.2 mg 글리신을 포함할 수 있고, 0.6 ml 무균 주사용수로 재구성되는 경우에 50 mg 항체를 전달하도록 설계된다.

[0230] (h) 100 mg/ml의 농도로 공급되는, 근육내(IM) 주사를 위한 무균의 보존제-없는 용액. 상기 산물은 히스티딘, 글리신, 무균 주사용수로 1회용 바이알로 제조될 수 있다. 가령, 각 1회용 바이알은 1 ml에서 100 mg 항체를 전달하도록 설계된 1.2 ml 부피에서 100 mg 항체, 4.7 mg 히스티딘, 0.1 mg 글리신으로 제조될 수 있다. 대안으로, 각 1회용 바이알은 0.5 ml에서 50 mg 항체를 전달하도록 설계된 0.7 ml 또는 0.5 ml 부피에서 50 mg 항체, 2.7 mg 히스티딘, 0.08 mg 글리신으로 제조될 수 있다.

[0231] 특정 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 40℃에서 안정하다. 특정 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 실온에서 안정하다.

[0232] 4.2. 항체 반감기

[0233] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체의 반감기는 적어도 4 내지 7일이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체의 평균 반감기는 적어도 2 내지 5일, 3 내지 6일, 4 내지 7일, 5 내지 8일, 6 내지 9일, 7 내지 10일, 8 내지 11일, 8 내지 12, 9 내지 13, 10 내지 14, 11 내지 15, 12 내지 16, 13 내지 17, 14 내지 18, 15 내지 19, 또는 16 내지 20일이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체의 반감기는 최대 50일일 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항체의 조성물과 방법의 반감기는 당분야에 공지된 방법으로 연장될 수 있다. 이런 연장은 본 발명의 항체 조성물의 투여량 및/또는 투약 빈도를 감소시킬 수 있다. 향상된 생체내 반감기를 갖는 항체 및 이들을 제조하는 방법은 U.S. Patent No. 6,277,375 및 International Publication No. WO 98/23289와 WO 97/3461에서 기술된다.

[0234] 생체내에서 본 발명의 항-CD19 항체의 혈청 순환 역시, 항체의 N- 또는 C-말단에 PEG의 특정 부위 공액(site-specific conjugation)을 통하여 또는 리실 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통하여, 다중기능성 링커와 함께 또는 이런 링커 없이, 폴리머 분자, 예를 들면, 고분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 항체에 부착함으로써 연장될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 상실을 유발하는 선형 또는 가지형 폴리터 유도체화가 이용된다. 항체에 대한 PEG 분자의 적절한 공액을 담보하기 위하여 공액 정도를 SDS-PAGE 및 질량 분석법(mass spectrometry)으로 밀접하게 모니터링할 수 있다. 반응되지 않은 PEG는 크기-배제 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 공액체로부터 분리될 수 있다. PEG-유도체화된 항체는 당업자에게 공지된 기술, 예를 들면, 본 명세서에 기술된

면역측정법을 이용하여 결합 활성 및 생체내 효능을 검사할 수 있다.

[0235] 더 나아가, 본 발명의 조성물과 방법의 항체는 이러한 항체가 생체내에서 더욱 안정하도록, 또는 생체내에서 더욱 긴 반감기를 갖도록 하기 위하여 알부민에 공액될 수 있다. 이들 기술은 당분야에 널리 공지되어 있다(참조: International Publication No. WO 93/15199, WO 93/15200, WO 01/77137; European Patent No. EP 413, 622).

[0236] 4.3. 투여와 용량

[0237] 인간 환자에 본 발명의 조성물의 투여는 정맥내, 피내, 경피, 피하, 근육내, 흡입(가령, 에어로졸을 통하여), 볼(가령, 설하), 국소(즉, 기도 표면을 비롯한 피부와 점막 표면), 경막내(intrathecal), 관절내(intraarticular), 흉막내(intrapleural), 뇌내(intracerebral), 동맥내(intra-arterial), 복강내, 경구, 림프내(intralymphatic), 비내(ontranasal), 직장이나 질내 투여; 국소 카테터를 통한 관류(perfusion); 또는 직접적인 병소내 주입을 비롯한 임의의 경로로 달성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 정의된 기간(가령, 0.5 내지 2 시간) 동안 제공된 정맥내 푸시(intravenous push) 또는 정맥내 주입으로 투여된다. 본 발명의 조성물은 연동 수단(peristaltic means)에 의해 또는 저장소(depot)의 형태로 전달될 수 있지만, 임의의 특정한 사례에서 가장 적합한 경로는 당분야에 공지된 바와 같이, 개체의 종, 연령, 성별, 전반적인 상태; 치료되는 질환의 특성과 심각도 및/또는 투여되는 특정 조성물의 특성(즉, 용량, 제제화)과 같은 인자에 좌우된다. 특정 구체예에서, 투여 경로는 일정한 기간 동안 주1회 또는 2회, 볼루스(bolus) 또는 연속 주입(continuous infusion)이다. 다른 특정 구체예에서, 투여 경로는 선택적으로, 주1회 또는 2회, 피하 주사이다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 및/또는 방법은 외래환자에 기초하여 투여된다.

[0238] 특정 구체예에서, 항-CD19 항체를 함유하는 조성물의 용량은 mg/환자 체중 kg의 단위로 측정된다. 다른 구체예에서, 항-CD19 항체를 함유하는 조성물의 용량은 mg/환자 체지방 체중(lean body weight)(즉, 지방 함량(body fat content)을 제외한 체중) kg의 단위로 측정된다. 또 다른 구체예에서, 항-CD19 항체를 함유하는 조성물의 용량은 mg/환자 체표면적(body surface area) m²의 단위로 측정된다. 또 다른 구체예에서, 항-CD19 항체를 함유하는 조성물의 용량은 환자에 투여되는 1회 분량당 mg의 단위로 측정된다. 용량의 임의의 측정량이 본 발명의 조성물과 방법과 관련하여 이용될 수 있고, 용량 단위는 당분야의 표준적인 수단에 의해 전환될 수 있다.

[0239] 당업자가 인지하는 바와 같이, 용량은 개체의 연령, 성별, 종류, 상태(즉, B 세포 악성종양의 단계), 세포 고갈의 요망되는 수준, 치료되는 질환 및/또는 이용되는 특정 항체 또는 항원-결합 단편을 비롯한 다수의 인자에 기초하여 선택될 수 있고 당업자에 의해 결정될 수 있다. 가령, 본 발명의 조성물의 효과량은 시험관내 검사 시스템 또는 동물 모형(가령, 목화 쥐(cotton rat) 또는 원숭이) 검사 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다. 항체의 효과를 평가하기 위한 모형과 방법은 당분야에 공지되어 있다(Wooldridge et al., Blood, 89(8): 2994-2998 (1997)). 특정 구체예에서, 특정 B 세포 악성종양의 경우에, 본 발명의 조성물과 방법과 함께, 항체 요법을 위한 당분의 표준적인 치료 처방을 이용할 수 있다.

[0240] 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 투약 처방의 실례에는 일일, 주3회(간헐적), 또는 매 14일 마다 투약이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정 구체예에서, 투약 처방에는 매일 또는 매 6-8주마다 투약이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0241] 당업자가 인지하는 바와 같이, 일반적으로, 유지 처방(maintenance regime)과 비교하여 최초 치료에서 투여량 및/또는 투여 빈도가 높다.

[0242] 본 발명의 한 구체예에서, 항-CD19 항체는 B 세포에 결합하고, 따라서, B 세포의 더욱 효율적인(즉, 더욱 낮은 용량에서) 고갈을 결과할 수 있다. 더욱 높은 결합은 환자의 B 세포의 표면 상에서 인간 CD19의 밀도가 높은 경우에 달성된다. 전형적인 구체예에서, 항체(선택적으로, 약학적 조성물의 일부로서 약학적으로 허용되는 담체내에)의 용량은 적어도 0.0005, 0.001, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 37.5, 또는 50 mg/m² 및/또는 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 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 이하이다. 특정 구체예에서, 용량은 대략 0.0005 내지 200 mg/m², 대략 0.001 내지 150 mg/m², 대략 0.075 내지 125 mg/m², 대략 0.375 내지 100 mg/m², 대략 2.5 내지 75 mg/m², 대략 10 내지 75 mg/m², 대략 20 내지 50 mg/m²이다. 관련된 구체예에서, 이용되는 항-CD19 항체의 용량은 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/환자 체중 kg이다. 특정 구체예에서, 이용되는 나신 항-CD19 항체의 용량은 적어도 1 내지 10, 5 내지 15, 10 내지 20, 또는 15 내지 25 mg/환자

체중 kg이다. 특정 구체예에서, 이용되는 항-CD19 항체의 용량은 적어도 1 내지 20, 3 내지 15, 또는 5 내지 10 mg/환자 체중 kg이다. 바람직한 구체예에서, 이용되는 항-CD19 항체의 용량은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg/환자 체중 kg이다. 특정 구체예에서, 항체(선택적으로, 약학적 조성물의 일부로서 약학적으로 허용되는 담체 내에)의 단일 투약 단위(single dosage unit)는 적어도 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 또는 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 다른 구체예에서, 용량은 단일 투약 단위당 최대 1 g이다.

[0243] 상기한 모든 용량은 전형이고 본 발명의 조성물과 방법과 관련하여 이용될 수 있지만, 항-CD19 항체가 독소 또는 방사성치료제와 병용되는 경우에는 앞서 기술된 용량보다 낮은 용량이 바람직하다. 특정 구체예에서, 환자가 낮은 CD19 밀도 수준을 나타내는 경우에, 앞서 기술된 용량보다 낮은 용량이 바람직하다.

[0244] 키메라 항-CD19 항체가 이용되는 본 발명의 특정 구체예에서에서, 이러한 키메라 항체의 용량 또는 양은 대략 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 mg/환자 체중 kg보다 많다. 키메라 항-CD19 항체가 이용되는 본 발명의 다른 구체예에서, 이러한 키메라 항체의 용량 또는 양은 대략 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 또는 0.1 mg/환자 체중 kg보다 적다.

[0245] 본 발명의 방법의 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 및/또는 조성물은 대략 375 mg/ m^2 보다 적은 용량; 대략 37.5 mg/ m^2 보다 적은 용량; 0.375 mg/ m^2 보다 적은 용량; 및/또는 대략 0.075 mg/ m^2 내지 대략 125 mg/ m^2 사이의 용량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, 투약 처방은 반복된 간격으로 투여되는 적은 용량을 포함한다. 가령, 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 대략 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 또는 200일의 간격으로, 대략 375 mg/ m^2 보다 적은 용량으로 투여될 수 있다.

[0246] 앞서 명시된 용량은 적어도 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 또는 180일 또는 그 이상의 기간 동안 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 치료되는 인간에서 B 세포 고갈을 유도할 수 있다. 특정 구체예에서, 전구-B 세포(표면 면역글로불린을 발현하지 않음)가 고갈된다. 특정 구체예에서, 성숙 B 세포(표면 면역글로불린을 발현함)가 고갈된다. 다른 구체예에서, 모든 비-악성 유형의 B 세포가 고갈을 나타낼 수 있다. 이들 유형의 B 세포는 B 세포 고갈을 측정하는데 이용될 수 있다. B 세포 고갈은 혈액 혈청과 같은 체액 내에서, 또는 골수와 같은 조직 내에서 측정될 수 있다. 본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, B 세포는 본 발명의 조성물과 방법의 이용에 앞서 치료된 환자에서 B 세포 수준과 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 고갈된다. 본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, B 세포는 인간에 대한 전형적인 표준 B 세포 수준과 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 고갈된다. 관련된 구체예에서, 인간에 대한 전형적인 표준 B 세포 수준은 연령, 성별, 체중 및 기타 인자와 관련하여, 치료되는 환자에 필적하는 환자를 이용하여 결정된다.

[0247] 본 발명의 특정 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 대략 125 mg/ m^2 이하의 용량은 적어도 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 200일의 기간 동안 B 세포 고갈을 유도한다. 다른 전형적인 구체예에서, 대략 37.5 mg/ m^2 이하의 용량이 적어도 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 200일의 기간 동안 B 세포를 고갈시킨다. 또 다른 구체예에서, 대략 0.375 mg/ m^2 이하의 용량이 적어도 7, 14, 21, 30, 45 또는 60일의 기간 동안 B 세포의 고갈을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 대략 0.075 mg/ m^2 이하의 용량이 적어도 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 200일의 기간 동안 B 세포의 고갈을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 대략 0.01 mg/ m^2 , 0.005 mg/ m^2 또는 심지어, 0.001 mg/ m^2 이하의 용량이 적어도 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 200일의 기간 동안 B 세포의 고갈을 유도한다. 이들 구체예에 따라, 용량은 임의의 적절한 경로로 투여될 수 있긴 하지만, 가급적, 피하 경로로 투여된다.

[0248] 다른 측면에서, 본 발명은 B 세포 고갈 및/또는 B 세포 질환의 치료가 통상적으로 이용되는 방법에서 사용되는 양보다 적은 양의 항체 또는 항체 단편으로 달성될 수 있다는 발견을 제시한다. 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 B 세포를 고갈시키고 및/또는 B 세포 질환을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 CD19에 특이적으로 결합하는 효과량의 항체를 인간에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 대략 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 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 용량이 적어도 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 또는 200일 또는 그 이상의 기간 동안, 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상의 B 세포(순환 및/또는 조직 B 세포) 고갈을 유도한다. 전형적인 구체예에서, 대략 125 mg/m² 또는 75 mg/m² 이하의 용량은 적어도 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120, 150 또는 180일의 기간 동안, 적어도 50%, 75%, 85% 또는 90%의 B 세포 고갈을 유도한다. 다른 구체예에서, 대략 50, 37.5 또는 10 mg/m²의 용량은 적어도 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120 또는 180일의 기간 동안 적어도 50%, 75%, 85% 또는 90%의 B 세포 고갈을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 대략 0.375 또는 0.1 mg/m²의 용량은 적어도 7, 14, 21, 30, 60, 75 또는 90일의 기간 동안 적어도 50%, 75%, 85% 또는 90%의 B 세포 고갈을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 대략 0.075, 0.01, 0.001, 또는 0.0005 mg/m²의 용량은 적어도 7, 14, 21, 30 또는 60일의 기간 동안 적어도 50%, 75%, 85% 또는 90%의 B 세포 고갈을 유도한다.

[0249] 본 발명의 특정 구체예에서, 용량은 혈액 또는 조직, 예를 들면, 골수 내에서 일정한 양을 유지하기 위하여 증가되거나 감소될 수 있다. 관련된 구체예에서, 용량은 본 발명의 조성물과 방법의 항체의 원하는 수준을 유지하기 위하여 대략 2%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 정도 증가되거나 감소된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법에 대한 환자의 면역 반응에 기초하여, 용량이 조절될 수 있고 및/또는 주입 속도(infusion rate)가 감소될 수 있다.

[0250] 본 발명의 방법의 한 측면에서, 본 발명의 항-CD19 항체 및/또는 조성물은 먼저, 적하량(loading dose)으로 투여되고, 이후, 치료되는 B 세포 악성종양이 진행될 때까지 유지량(maintenance dose)으로, 또는 규정된 치료 과정(가령, CAMPATHTM, MYLOTARGTM, 또는 RITUXANTM, 이들 중에서 후자는 추가적인 데이터가 산출됨에 따라 증가하는 규정된 용량으로 환자가 치료될 수 있도록 한다)으로 투여될 수 있다.

[0251] 본 발명의 방법의 다른 측면에 따라, 환자는 본 발명의 조성물과 방법의 면역 반응을 검출하거나, 면역 반응을 최소화하거나, 또는 부작용을 최소화하기 위하여 본 발명의 조성물과 방법으로 미리 치료될 수 있다.

[0252] 4.4. 독성 검사

[0253] 본 발명의 조성물 및/또는 치료 처방의 내약성(tolerance), 독성 및/또는 효능은 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준적인 약학 절차에 의해, 예를 들면, LD50(개체군의 50%에서 치사량), ED50(개체군의 50%에서 치료 효과량), IC50(50% 저해를 달성하는 효과량)을 측정함으로써 결정될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 용량은 순환 B 세포 또는 순환 면역글로불린, 또는 둘 모두의 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 고갈을 달성하는데 효과적인 양이다. 독성 효과와 치료 효과 사이에 용량 비율(dose ratio)은 치료 지수(therapeutic index)인데, 이는 LD50/ED50 비율로서 표시될 수 있다. 더욱 높은 치료 지수를 나타내는 치료제가 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 치료제가 사용될 수 있긴 하지만, CD19 음성 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하고, 따라서 부작용을 감소시키기 위하여, 이들 작용제를 CD19-발현 세포로 표적시키는 전달 시스템을 설계하는데 있어 주의가 요구된다.

[0254] 세포 배양 측정법과 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에서 이용되는 조성물 및/또는 치료 처방의 용량 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다. 이들 작용제의 용량은 가급적, 독성이 거의(또는 전혀) 없는 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 존재한다. 용량은 이용된 투약 형태(dosage form) 및 투여 경로에 따라, 상기 범위 내에서 변한다. 본 발명의 방법에 이용되는 임의의 요법에서, 치료 효과량은 적절한 동물 모형에 의해 평가될 수 있다. 동물 모형의 종류에 따라, 용량은 예로써, Freireich et al., Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, monkey, dog, and human, Cancer chemotherapy Reports, NCI 1966 40:219-244에 제시된 바와 같이, 당분야에 확립된 공식에 따른 일정한 비율로 인간에 맞게 결정된다. 세포 배양 측정법으로부터 획득된 데이터는 잠재적 독성을 예측하는데 유용할 수 있다. 동물 연구는 세포 배양에서 측정되는 바와 같이, IC50(즉, 증상의 반-최대 저해를 달성하는 검사 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하는 특정 용량을 공식화하는데 이용될 수 있다. 이런 정보는 인간에서 효과적인 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 이용될 수 있다. 혈장 약제 수준은 예로써, 고성능 액체 크로마토그래피, ELISA, 또는 세포 기초된 측정법으로 측정될 수 있다.

[0255] 5. 환자 진단, 단계 결정 및 치료 처방

[0256] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 조성물과 방법에 이용되는 치료 처방과 용량은 치료되는 B 세포 질환이나 질병의 단계를 비롯한 다수의 인자에 기초하여 선택된다. 환자 또는 환자 개체군에서 B 세포 질환이나 질병의 특정 단계에 적합한 치료 처방은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 상이한 단계의 B 세포 질환이나 질병을 앓는

환자를 치료하기 위한 본 발명의 조성물의 효과량을 결정하기 위하여, 당분야의 표준적인 프로토콜을 이용하여 용량 반응 곡선을 산출할 수 있다. 일반적으로, 진행된 단계의 B 세포 질환이나 질병을 앓는 환자는 초기 단계 B 세포 질환이나 질병을 앓는 환자에 비하여, 더욱 오랜 기간 동안 더욱 높은 용량 및/또는 더욱 빈번한 투약 빈도를 요구한다.

[0257] 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 B 세포 악성종양을 비롯한 B 세포 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. “B 세포 악성종양”은 B 세포 계열의 세포로부터 유래된 임의의 악성종양을 포함한다. 전형적인 B 세포 악성종양에는 하위 등급/여포성 NHL, 소형 림프구성(SL) NHL, 중간 등급/여포성 NHL, 중간 등급 범발성 NHL, 상위 등급 면역아구성(immunoblastic) NHL, 상위 등급 림프성 NHL, 상위 등급 소형 비-분할 세포 NHL, 외투 세포 림프종, 치료하기 어려운 질병(bulky disease) NHL를 비롯한 B 세포 아형 비-호지킨 림프종(NHL); 버키트 림프종; 다발성 골수종; 전구-B 급성 림프아구성 백혈병 및 초기 B 세포 전구체로부터 유래되는 다른 악성종양; 통상적인 급성 림프구성 백혈병(ALL); 면역글로불린-돌연변이된 CLL과 면역글로불린-비돌연변이된 CLL을 비롯한 만성 림프구성 백혈병(CLL); 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia); 무-급성 림프아구성 백혈병; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia); 종자 중심(germinal center) B 세포-유사(GCB) DLBCL, 활성화된 B 세포-유사(ABC) DLBCL, 3형 DLBCL을 비롯한 범발성 대형 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL); 전림프구성 백혈병; 경쇄 질환(light chain disease); 형질구종(plasmacytoma); 골경화성 골수종(osteosclerotic myeloma); 형질 세포 백혈병(plasma cell leukemia); 미확정 단클론 감마병증(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS); 아급성 다발성 골수종(smoldering multiple myeloma, SMM); 무통성 다발성 골수종(indolent multiple myeloma, IMM); 표준형과 결절성 림프구 우세형(pre-dominant type)을 비롯한 호지킨 림프종; 림프형질세포 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma, LPL); 위 점막-연관된 림프 조직(gastric mucosal-associated lymphoid tissue, MALT) 림프종을 비롯한 변연부 림프종(marginal zone lymphoma)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0258] 본 발명자들은 본 발명의 항체와 조성물이 성숙 B 세포를 고갈시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 여포성 림프종; 외투 세포(mantle-cell) 림프종; 버키트 림프종; 다발성 골수종; 종자 중심(germinal center) B 세포-유사(GCB) DLBCL, 활성화된 B 세포-유사(ABC) DLBCL, 3형 DLBCL을 비롯한 범발성 대형 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL); 표준형과 결절성 림프구 우세형(pre-dominant type)을 비롯한 호지킨 림프종; 림프형질세포 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma, LPL); 위 점막-연관된 림프 조직(gastric mucosal-associated lymphoid tissue, MALT) 림프종을 비롯한 변연부 림프종(marginal zone lymphoma); 면역글로불린-돌연변이된 CLL과 면역글로불린-비돌연변이된 CLL을 비롯한 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 성숙 B 세포 악성종양(즉, 세포 표면 상에서 Ig를 발현함)을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0259] 더 나아가, CD19는 예로써, CD20과 달리 B 세포 발달 시에 초기에 발현되기 때문에, 예로써, 골수 내에서 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양(즉, 세포 표면 상에 Ig를 발현하지 않음)을 치료하는데 특히 적합하다. 전형적인 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양에는 급성 림프성 백혈병이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0260] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 림프절외 종양(extranodal tumor)을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0261] 5.1. B 세포 악성종양의 진단과 단계 결정

[0262] 암, 예를 들면, 종양을 형성할 수 있는 B 세포 질환이나 질병(가령, 비-호지킨 림프종, 범발성 대형 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 버키트 림프종)의 진행은 전형적으로, 암이 신체를 통하여 확산되는 정도에 의해 특성화되고, 종종 결과를 전조하는 아래의 4단계로 구분된다. 단계 I: 암이 특정 조직에 국한되고 림프절로 확산되지 않는다. 단계 II: 암이 주변 림프절로 확산된다(즉, 전이). 단계 III: 암이 기원 조직으로부터 멀리 떨어진 신체 부위에서 림프절 내에서 관찰되고 하나가 아닌 대량의 또는 복수의 종양을 포함할 수 있다. 단계 IV: 암이 신체의 원위 부위까지 확산된다. 암의 단계는 임상적 관찰 및 당업자에게 널리 공지된 검사 방법으로 결정될 수 있다. 앞서 기술된 암의 단계는 전통적으로, 종양 형성으로 특성화되는 암의 임상적 진단과 관련하여 이용되고, B 세포 질환과 질병을 치료하기 위하여 본 발명의 조성물과 방법과 관련하여 이용될 수 있다. 전형적으로, 초기 단계 질환은 상기 질환이 환자의 신체 일부에 국한되고 전이되지 않았음을 의미한다.

[0263] 다발성 골수종이 포함되지만 이에 국한되지 않는 비-종양 형성 B 세포 질환과 질병과 관련하여, 질환의 단계를 결정하는 기준이 상이하다. Durie-Salmon 단계 결정 시스템이 광범위하게 이용된다. 이러한 단계 결정 시스템에서, 질환의 임상적 단계(단계 I, II 또는 III)는 M 단백질의 수준, 용해성 골 병변(lytic bone lesion)의 총수, 헤모글로빈 수치, 혈청 칼슘 수준을 비롯한 여러 척도에 기초한다. 단계는 신장 기능(A 또는 B로 분류

됨)에 따라 더욱 세분된다. Durie-Salmon 단계 결정 시스템에 따라, 단계 I(적은 세포량)은 아래와 같이 특성화된다: 헤모글로빈 수치 >10 g/dl; 혈청 칼슘 수치 정상 또는 ≤ 12 mg/dl; 골 x-레이, 정상 골 구조(등급 0) 또는 고립성 골 형질구종 단독; 낮은 M-성분 생산율: IgG 수치 <5 g/dl, IgA 수치 <3 g/d, 벤스 존스 단백질(Bence Jones protein) <4 g/24 h. 단계 I 환자는 전형적으로, 관련된 기관이나 조직 손상 또는 증상이 나타나지 않는다. 단계 II(중간 세포량)는 단계 I과 단계 III 모두에 합치되지 않는 것으로 특성화된다. 단계 III(많은 세포량)은 하나이상의 아래와 같은 수치로 특성화된다: 헤모글로빈 수치 <8.5 g/dl; 혈청 칼슘 수치 >12 mg/dl; 진행된 용해성 골 병변(등급 3); 높은 M-성분 생산율: IgG 수치 >7 g/dl, IgA 수치 >5 g/dl, 벤스 존스 단백질(Bence Jones protein) >12 g/24 h 하위분류(A 또는 B), 여기서 A는 상대적으로 정상인 신장 기능(혈청 크레아티닌 수치 <2.0 mg/dl)이고, B는 비정상적인 신장 기능(혈청 크레아티닌 수치 ≥ 2.0 mg/dl)이다.

[0264] 골수종에 대한 다른 단계 결정 시스템은 골수종에 대한 국제 단계 결정 시스템(International Staging System, ISS)이다. 이러한 시스템은 단계 결정 그룹을 더욱 효율적으로 구별할 수 있고, 베타₂-마이크로글로불린(β_2 -M)과 알부민의 용이하게 측정되는 혈청 수준에 기초한다. 골수종에 대한 ISS에 따라, 단계 I은 β_2 -M <3.5 와 알부민 ≥ 3.5 로 특성화되는, 단계 II는 β_2 -M <3.5 와 알부민 <3.5 또는 β_2 -M $3.5 - 5.5$ 로 특성화되고, 단계 III은 β_2 -M >5.5 로 특성화된다(Multiple Myeloma Research Foundation, New Canaan, CT).

[0265] 환자에서 B 세포 악성종양의 단계는 임상적 결정이다. 앞서 지시된 바와 같이, 고형 종양(solid tumor)과 관련하여, 종양의 폭, 위치, 충수는 단계의 임상적 결정에서 일차적인 인자이다. 비-종양 형성 B 세포 악성종양을 앓는 환자에서 단계의 결정은 더욱 복잡하고, 앞서 기술된 바와 같은 혈청 수준 측정을 필요로 할 수 있다.

[0266] B 세포 질환과 질병의 단계에 관한 설명은 무제한적이다. B 세포 질환과 질병의 진단에서 당분야에 공지된 다른 특징은 B 세포 질환 또는 질병의 단계를 결정하기 위한, 환자에 대한 기준으로서 이용될 수 있다.

[0267] 5.2. B 세포 악성종양을 진단하기 위한 임상적 기준

[0268] 상이한 B 세포 악성종양에 대한 진단 기준은 당분야에 공지되어 있다. 역사적으로, 진단은 전형적으로, 현미경적 외관(microscopic appearance)과 면역표현형(immunophenotype)의 조합에 기초한다. 더욱 최근에, B 세포 악성종양의 분자 정의를 개발하기 위하여 유전자-발현 프로파일링과 같은 분자 기술이 적용되고 있다(참조: Shaffer et al., Nature 2:920-932(2002)). 특정 B 세포 악성종양의 임상적 진단을 위한 전형적인 방법은 아래에 제시된다. 다른 적합한 방법은 당업자에게 명백할 것이다.

[0269] 5.2.1. 여포성 NHL

[0270] 일반적으로, 대부분의 NHL(외투 세포 림프종 제외)은 체세포성 극돌연변이(somatic hypermutation, SHM)의 결과인 것으로 보이는 고도로 돌연변이된 면역글로불린 유전자를 보유한다. NHL에서 가장 일반적인 유전자 비정상인 BCL6 유전자의 전좌(translocation)와 돌연변이다.

[0271] 여포성 NHL는 종종, 여포성 성장 패턴을 갖는 무통성 B 세포 림프종이다. 이는 미국과 서유럽에서 두 번째로 많이 발병하는 림프종이다. 상기 질환이 나타나는 평균 연령은 60세이고, 여성에서 약간 우세하다. 무통성 림프절 병증(lymphadenopathy)이 가장 일반적인 증상이다. 검사에서, 골수 및 간혹, 말초혈의 침범이 종종 관찰된다. 여포성 NHL는 여포성 소형 절단된 세포에서부터 대형 세포 우세로 연속체(continuum)를 형성하는 등급을 갖는, 여포(follicle) 내에서 대형 세포의 비율에 기초하여 세포학적 등급(cytologic grade)으로 세분된다(참조: S. Freedman, et al., Follicular Lymphoma, pp. 367-388, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pp. 309-324, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, New York, N. Y. (2000)).

[0272] 대부분의 여포성 NHL는 BCL2의 발현을 유도하는, 크로모솜 14와 18 사이에 전좌로 특성화된다. 여포성 NHL는 또한, SHM과 진행성 SHM 및 종자 중심(GC) B 세포와 유사한 유전자 발현 프로파일로 특성화되는데(참조: Shaffer et al., Nature 2:920-932 (2002)), 상기 세포는 이러한 악성에 대한 추정 기원 세포이다. 중쇄-와 경쇄 재정렬(rearrangement)이 전형적이다. 이러한 질환의 종양 세포는 단클론 표면 면역글로불린을 발현하는데, 특히, IgM을 가장 많이 발현한다. 거의 모든 여포성 NHL 종양 세포는 항원 CD19, CD20, CD79a, CD21, CD35, CD10을 발현하지만 CD5와 CD43을 발현하지 않는다. 소형 절단된 세포로 섬유주주위 침윤(paratrabeular infiltration)이 골수 내에서 관찰된다(참조: S. Freedman et al., Follicular Lymphoma, pp. 367-388, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pp. 309-324, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford

University Press, New York, N.Y. (2000)). 여포성 NHL의 진단은 전반적으로, 조직 구조와 세포학적 특징을 평가하기 위하여 절개된 절결의 생검에 의존한다. 미세-바늘 흡인(fine-needle aspiration)은 일반적으로, 적합하지 않은데, 그 이유는 이러한 절차가 평가될 수 있는 조직을 제공할 가능성이 낮고 추가 검사를 위한 충분한 조직을 제공하지 못하기 때문이다. 좌우 양측 골수 생검 역시 지적되는데, 그 이유는 관여가 부조화이기 때문이다. 다른 진단 절차에는 흉부 x-레이, 흉부, 복부, 목과 골반 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캔, 전체 혈구수 계산(complete blood count), 화학 프로파일 포함된다. 여포성 NHL과 다른 성숙 B 세포 림프종을 구별하는데 유세포 분석법(flow cytometry) 및 면역조직화학(immunohistochemistry)이 이용될 수 있다(참조: S. Freedman et al., Follicular Lymphoma, pp. 367-388, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pp. 309-324, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)).

[0273] 5.2.2. 외투 세포 림프종

[0274] 외투 세포 림프종은 이차성 여포의 덮개 영역에 국한되고, 결절성 및/또는 범발성 성장 패턴으로 특성화된다. 외투 세포 림프종 환자는 60-65세의 평균 연령을 보유하는데, 상기 질환은 남성에서 우세하다. 진단 목적으로, 통상적인 증상 특징은 전신 림프절병증(generalized lymphadenopathy). 부가적으로, 비장이 종종 확장된다. 이러한 B 세포 림프종은 사이클린 D1의 과다발현을 유발하는, IgH 좌위와 사이클린 D1 사이에 t(11;14)에 관련된다. 50% 이상의 사례는 부가적인 크로모좀 비정상을 나타낸다. 덮개-세포 림프종은 전형적으로, SHM에 의해 특성화되지 않는다(참조: W. Hiddemann et al., Mantle cell Lymphoma, pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); D. Weisenburger et al., Mantle Cell Lymphoma, pp. 28-41, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)).

[0275] 외투 세포 림프종 세포의 면역조직화학의 면역형태학적 검사(Immunophenotyping)(유세포분석 또는 동결 표본(frozen section))는 이들이 거의 항상 단클론이고, 표면 IgM을 보유한다는 것을 입증한다. 외투 세포 림프종 세포는 또한, 표면 IgD를 보유하는 것으로 관찰되었다. 이들 세포는 항원 CD19, CD20, CD22, CD24를 발현하지만 CD23을 발현하지 않는다. 이들은 또한, 표면 항원 CD5를 발현하지만 CD10을 발현하지 않고, 이들을 거의 항상 CD5 음성인 진성 여포 중심-세포(follicle center-cell) 림프종을 구별한다. 빈번하게, 골수 침윤 및 간과 위장관의 종양을 비롯하여 림프절외 침범(extranodal involvement)이 관찰된다. 경미한 빈혈과 백혈병 표현은 외투 세포 림프종에서 드물지 않게 나타난다(참조: A. LaI et al., Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, pp. 181-220, In W. Finn et al., eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004); W. Hiddemann et al., Mantel Cell Lymphoma, pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0276] 외투 세포 림프종의 진단은 말초 혈액의 검사 및 골수와 림프절 생검을 수반한다. 이에 더하여, 세포유전학 연구(cytogenetic study) 및 면역형태학적 검사가 상이한 진단에 이용된다(참조: W. Hiddemann, et al., Mantel Cell Lymphoma pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); D. Weisenburger, et al., Mantel Cell Lymphoma, pp. 28-41, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)).

[0277] 5.2.3. 버키트 림프종

[0278] 버키트 림프종은 어린이와 청년에서 전형적으로 관찰되는 침습성 B 세포 림프종이고, 일반적으로, 하악 및/또는 복부의 치료하기 어려운 질환과 연관한다. 대략 20%의 환자가 골수 침범(bone marrow involvement)을 나타내기 때문이다. 버키트 림프종의 풍토형(endemic form)은 악성 세포의 엡스테인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 감염을 수반한다; 산발형(sporadic form)은 EBV 감염과 무관하다. c-myc 유전자의 탈조절(deregulation)을 유발하는, c-myc의 면역글로불린 좌위로의 전좌는 상기 질환의 특징이다(t(8;14)(q24;q32)). 흥미롭게도, c-myc 서열의 결실은 상기 질환의 산발형에 관여하는 반면, 풍토형은 일반적으로, 점 돌연변이(point mutation) 또는 삽입을 수반하는 것으로 보인다(참조: V. Pappa, et al., Molecular Biology, pp. 133-157, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)). 버키트 림프종은 또한, SHM으로 특성화되고, 이들 악성 세포는 GC B 세포와 유사한 유전자 발현 프로파일을 보유하는데, 이는 이러한 악성이 GC B 세포로부터 유래된다는 것을 암시한다.

[0279] 버키트 림프종의 면역표현형(Immunophenotype)은 이러한 질환의 세포가 CD19, CD20, CD22, CD79a를 발현하지만, CD5, CD23, 사이클린 D 또는 말단 데옥시뉴클레오티딜 전이효소(terminal deoxynucleotidyl

transferase)를 발현하지 않는다는 것을 입증한다. 빈번하게, 이들 세포는 CD10과 BCL6에 대하여 양성이고, BCL2에 대하여 통상적으로 음성이다(참조: I. Magrath, et al., Burkitt's Lymphoma, pp. 477-501, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0280] 상위 등급 B 세포 버키트-유사 림프종은 버키트 림프종과 대형 B 세포 림프종 사이의 경계선에 위치하는 림프종이다. 이러한 림프종의 세포는 CD19와 CD20을 발현하지만 진성 버키트 림프종에서 거의 항상 존재하는 CD10의 발현이 빈번하게 부재한다. 이들 특징으로 인하여, 일부 연구자들은 상기 림프종이 범발성 대형 B 세포 림프종으로서 분류되어야 한다고 믿고 있다(참조: K. MacLennan, Diffuse Aggressive B Cell Lymphoma, pp. 49-54, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)).

[0281] 버키트 림프종의 진단은 전반적으로, 상기 림프종과 연관된 전좌의 검출에 의존한다; 따라서, 전통적인 세포유전학 분석이 일반적으로 수행된다. 이러한 질환과 연관된 전좌 및 다른 유전자 변형에서 Ig-myc 접합(junction)을 검출하기 위하여 장거리 중합효소 연쇄 반응(long distance polymerase chain reaction) 기술 및 형광 in situ 혼성화(FISH)가 이용되고 있다(참조: R. Siebert, et al., Blood 91 :984-990 (1998); T. Denyssevyich, et al., Leukemia, 16:276-283 (2002)).

[0282] 5.2.4. 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL)

[0283] DLBCL은 가장 일반적인 비-호지킨 림프종이고, 소형 B 세포 림프종, 여포성 림프종 또는 변연부 림프종으로부터 발생할 수 있다. 전형적으로, 환자는 림프절병증을 나타낸다; 하지만, 높은 비율의 환자가 림프절외 부위 역시 나타내고 위장 침범(gastrointestinal involvement)이 가장 일반적이다. 골수 침범은 대략 15%의 환자에서 관찰된다(참조: Armitage, et al., Diffuse Large B cell lymphoma, pp. 427-453, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)). 임상적, 생물학적, 형태학적 특징에서 이질성(heterogeneity)은 이와 같은 림프종 군을 하위분류하는 것을 어렵게 만든다. 하지만, 종자 중심 B 세포(GC-DLBCL)의 특징적인 유전자를 발현하는 부분집합과 말초혈 B 세포에서 유전자를 과다발현하는 부분집합으로 2가지 상이한 부분집합이 확인되었다. 생존율은 활성화된 B 세포 유형(ABC)-DLBCL 환자보다 GC-DLBCL 환자에서 현저하게 높다(참조: W. Chan, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 128(12):, 1379-1384 (2004)).

[0284] DLBCL은 세포 표면 항원 CD19, CD20, CD22, CD79a를 발현한다. CD10은 대다수의 사례에서 발현되고, CD5 발현은 대략 10%의 사례에서 관찰된다(참조: K. MacLennan, Diffuse Aggressive B Cell Lymphoma, pp. 49-54, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)). DLBCL은 종종, BCL6의 비정상 및/또는 BCL2의 IgH 좌위로의 전좌로 특성화된다. GC B 세포 유사(GC) DLBCL은 고도로 돌연변이된 면역글로불린 유전자를 보유하는 SHM 및 GC B 세포-유사 유전자 발현 프로필을 보유하는 악성 클론에서 진행성 SHM으로 특성화된다. 대부분의 GC DLBCL은 면역글로불린 클래스 전환(class switching)을 겪는다. ABC-DLBCL은 BCL2, 인터페론 조절 인자 4, CD44, FLIP, 사이클린 D를 비롯한 NF- κ B 표적 유전자의 높은 수준 발현으로 특성화된다. SHM은 나타나지만 진행성 SHM은 나타나지 않고, ABC-DLBCL은 GC B 세포 유전자 발현 프로필을 보유하지 않는다. 거의 모든 ABC-DLBCL은 IgM을 높은 수준으로 발현한다.

[0285] 5.2.5. 림프절외 변연부 림프종

[0286] 림프절외 변연부 림프종은 조직화된 림프 조직이 정상적으로 부재하는 기관(가령, 위, 타액선, 폐, 갑상선)에서 발생하는 림프절외 림프종이다. 이는 주로, 60세 이상의 평균 연령을 갖는 노인에게 영향을 주는 질환이다. 종종, 만성 염증 또는 자가면역 과정이 이러한 림프종의 발생을 선행한다. 변연부 림프종의 가장 일반적인 형태인 위 점막-연관된 림프 조직(MALT) 림프종은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 감염과 관련된다. 여러 연구에서, 항생제 처방이후 헬리코박터 파일로리(*H. pylori*) 감염의 박멸로 증상의 소멸이 입증되었다. 위 MALT 림프종에서 나타나는 증상에는 불특정의 소화불량, 상복부 통증(epigastric pain), 메스꺼움, 위장 출혈, 빈혈 등이 포함된다. 전신 증상은 드물게 나타나고, 유산 탈수소효소(lactate acid dehydrogenase)의 상승된 수준 역시 그러하다(참조: J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B Cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); J. Radford, Other Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas, pp. 325-330, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)). 전신 B 증상에는 감염의 징후 없이 2주 이상 동안 38°C 이상의 열병, 도한(night sweat), 극도의 피로감, 또는 이전 6개월 동안 10% 이상의 의도하지 않은 체중 감소) 등이 포함된다.

- [0287] MALT 림프종의 면역표현형은 CD20, CD79a, CD21, CD35의 발현 및 CD5, CD23, CD10의 발현 부재로 특성화된다. 대략 절반 정도의 MALT 림프종이 CD43을 발현한다. 상기 질환의 종양 세포 내에서 전형적으로 발현되는 면역글로불린은 IgM이고, IgD는 발현되지 않는다. 이들 특징은 상기 림프종을 다른 소형 B 세포 림프종, 예를 들면, 외투 세포 림프종, 림프구성 림프종, 여포성 림프종으로부터 구별하는데 매우 중요하다. 삼염색체증(trisomy) 3이 60%의 MALT 림프종 사례에서 보고되었다. 25-40%의 위와 폐 MALT 림프종에서, t(11;18)이 관찰되었다. 이러한 전좌는 다른 MALT 림프종에서는 훨씬 낮은 빈도로 관찰된다. t(11;18)는 BCL10의 핵 발현과 관련된다(참조: J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B Cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)). 변연부 림프종은 전반적으로, SHM 및 진행성 SHM으로 특성화된다.
- [0288] 진단 절차는 세포 표면 마커의 동일성을 결정하기 위한 면역형태학적 검사 또는 유세포분석을 포함한다. 이에 더하여, t(11;18)의 존재를 결정하기 위한 분자 유전학적 분석이 수행되어야 하는데, 그 이유는 이의 존재가 상기 질병이 항생제에 반응하지 않는다는 지표이기 때문이다. 헬리코박터 파일로리(*H. pylori*)의 존재를 결정하기 위하여 조직학이 이용될 수 있다.
- [0289] 부가적인 검사에는 전체 혈구수 계산; 유산 탈수소효소에 대한 검사를 비롯한 기초적인 생화학 검사; 복부, 흉부, 골반, 골수 생검의 CT 스캔 등이 포함된다(참조: J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B Cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).
- [0290] 5.2.6. 결절성 변연부 B 세포 림프종
- [0291] 결절성 변연부 B 세포 림프종은 상대적으로 새로 분류된 림프종이기 때문에, 공개된 정보가 거의 없다. 이는 림프절외와 비장 변연부 림프종과 유전적 특징과 형태학적 특징을 공유하지만 비장 또는 림프절외에 국한되지 않는 원발성 결절성 B 세포 림프종이다. C형 간염 바이러스가 이러한 림프종과 관련되는 것을 보고되었고, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome) 역시 그러하였다(참조: F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B Cell Lymphoma, pp. 361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).
- [0292] 결절성 변연부 림프종은 이질성 세포 구조(cytology)와 조직 형태(morphology)를 보유한다. 대형 세포의 상대적으로 높은 비율로 인하여, 상기 림프종은 다른 변연부 림프종(비장과 림프절외)과 달리, 진성 하위 등급 B 세포 림프종으로 분류될 수 없다. 결절성 변연부 림프종의 유전적 표현형과 면역학적 표현형에는 CD19, CD20, BCL2, sIgM, 세포질 IgG(cIg)의 발현이 포함된다. 이들 세포는 CD5, CD10, CD23, CD43 또는 사이클린 D1을 발현하지 않는다. MALT 림프종의 전좌 특징, t(11;18)은 결절성 변연부 림프종에서 관찰되지 않는다. 이들 특징은 다른 소형 B 세포 림프종으로부터 상기 림프종의 감별 진단(differential diagnosis)에 도움을 준다(참조: F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B Cell Lymphoma, pp. 361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).
- [0293] 5.2.7. 비장 변연부 림프종
- [0294] 비장 변연부 림프종은 현저한 지라비대(splenomegaly) 및 말초혈과 골수의 침윤의 특징적인 임상 증상을 갖는 무통성 미세-결절성 B 세포 림프종이다. 이에 더하여, 상대적으로 높은 수준의 간 침범(liver involvement)이 보고되었다. 이러한 림프종에 대한 C형 간염 바이러스에 대한 역할이 가정되었다. 비장 변연부 림프종의 면역표현형은 전형적으로, CD20⁺, IgD⁺, BCL2⁺, p27⁺, CD3⁻, CD5⁻, CD10⁻, CD23⁻, CD38⁻, CD43⁻, BCL-6⁻, 사이클린 D1⁻이다. 유전적 특징은 7q 결실, p53 변형, SHM이다(참조: M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp. 275-282, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).
- [0295] 진단은 전반적으로, 세포 표면 마커의 동일성을 결정하는 면역형태학적 검사에 의존한다. 세포 표면 마커에 대한 데이터와 함께, 유전적 분석과 생화학적 분석은 이러한 림프종을 다른 소형 B 세포 림프종으로부터 구별하는데 도움이 된다(참조: M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp. 275-282, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).
- [0296] 5.2.8. 급성(B 세포) 림프구성 백혈병(ALL)
- [0297] ALL은 주로, 1-5세 사이의 어린이에서 가장 높은 비율로 발병하는 골수-기초된 신생물이다. 나타나는 가장 일반

적인 증상은 피로, 혼수, 열병, 뼈와 관절 통증 등이다. 피로와 혼수는 빈혈 증상의 정도와 상관한다. 상승된 백혈구 세포 수가 통상적으로 나타난다.

[0298] 흉부의 방사선사진(radiograph)은 종종 골격 병변(skeletal lesion)을 보여준다. 골수의 확산(extramedullary spread)이 일반적이고, 중추신경계, 고환, 림프절, 간, 비장, 신장에 침범한다. 새로 진단된 사례의 대략 5-10%에서만 전종격동 종양(anterior mediastinal mass)이 관찰된다(참조: J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0299] ALL의 면역표현형은 CD10+, CD19+, CD20+, CD24+이다. 전구-B 세포 ALL 세포는 세포질 면역글로불린을 발현하지만 표면 면역글로불린을 발현하지 않는 반면, 성숙 B 세포 ALL(이는 ALL 사례의 1-2%에 불과하다)은 표면 면역글로불린의 발현에 의해 B 세포 계열의 다른 백혈병과 구별된다. ALL의 세포유전학적 특징에는 t(8;14), t(2;8), t(8;22) 등이 포함된다. 세포유전학적 수준에서 드물게 검출되긴 하지만, t(12;21)는 유년기 ALL(대략 25%의 사례에서 관찰됨)과 관련하여 가장 일반적인 세포유전학적 비정상이다(참조: M. Kinney, et al., Classification and Differentiation of the Acute Leukemia, pp. 2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999); J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (1999)).

[0300] 급성 백혈병의 정확한 진단은 통상적으로, 골 흡인물(bone aspirate)과 생검에 의존한다. 흡인물 도말표본(aspirate smear)이 형태학적, 면역학적, 세포학적 평가에 이용된다. 골수 내에서 림프아구(lymphoblast)의 존재는 ALL의 특징이다. 골수 내에서 5% 이상의 백혈병성 림프아구(leukemic lymphoblast) 세포의 존재는 ALL 진단을 확정하지만 대부분의 경우에, 결정적인 진단을 위하여 25% 이상이어야 한다. 중추신경계 침범을 진단하기 위하여 요추 천자(lumbar puncture)가 이용된다. 혈청 요산(uric acid) 수준과 혈청 유산염 탈수소효소(lactate dehydrogenase) 수준이 ALL에서 상승하는 것으로 밝혀졌다(참조: M. Kinney, et al., Classification and Differentiation of the Acute Leukemia, pp. 2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999); J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (1999)).

[0301] 5.2.9. 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소형 B 세포 림프구성 림프종 (SLL)

[0302] CLL/SLL은 백혈병의 가장 일반적인 유형이다. 상기 질환이 말초혈과 골수에 침범하면, 이는 CLL로 불린다. 하지만, 림프절 및 다른 조직이 CLL에서와 면역학적으로, 형태학적으로 동일한 세포에 의해 침윤되지만 상기 질환의 백혈병 특징이 부재하는 경우에는 SLL로 불린다. 이러한 질환은 주로, 노인에게 영향을 주고, 여성보다 남성에서 더욱 높은 빈도로 발병한다. 무통성 림프절병증이 가장 일반적으로 관찰된다. 저감마글로불린혈증(hypogammaglobulinemia)은 면역글로불린의 임의의 특정 하위분류가 아닌 전체 면역글로불린의 감소된 수준을 나타내는 대부분의 CLL/SLL 사례에서 공통적이다. 무증상 환자는 빈번하게, 정기적인 혈구수 계산 동안 진단된다($5000 \times 10^9/L$ 이상의 림프구 수). 대략 20% 정도의 CLL/SLL 사례가 B 증상을 보고한다. 부가적인 진단 특징은 미성숙 림프구에 의한 30%의 골수 침윤이다. 림프절 생검은 전반적으로, 잘 분화된 림프구에 의한 침범된 결절의 침윤을 보여준다. 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia)과 면역 혈소판감소증(immune thrombocytopenia)을 비롯하여 자가면역 폐렴이 종종, CLL/SLL과 관련된다(참조: J. Gribben, et al., Small B Cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocyte Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B Cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N. Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin and Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003)).

[0303] 여러 하위 등급 B 세포 악성종양과 대조적으로, CLL/SLL에서는 비임의 상호 전좌(nonrandom reciprocal translocation)가 거의 발견되지 않는다. 하지만, 13q14, 11q22-23, 17q13에서 결실을 비롯한 다른 세포유전학적 비정상이 보고되었는데, 후자 2개는 p53 좌위에 영향을 준다. 대략 20%의 사례가 삼염색체증(trisomy) 12를 나타낸다. 상승된 수준의 β_2 -미크로글로불린, 더욱 높은 수준의 CD38 발현 및 종양 괴사 인자-알파의 생산 모두 CLL/SLL의 특징이다. CLL/SLL의 면역표현형은 매우 특징적인데, 표면 면역글로불린, 통상적으로, IgM, 또는 IgM과 IgG의 약한 발현 및 세포 항원 CD19, CD20과 통상적으로, CD5와 CD23의 발현을 포함한다(참조: J.

Gribben, et al., Small B Cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocyte Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B Cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N. Y. (2000)).

[0304] 5.2.10. B 세포 전림프구성 백혈병(PLL)

[0305] 한때 CLL의 변종으로 간주되었던 PLL은 현재, 별개의 질환으로 생각된다. PLL은 전반적으로, 노인 남성의 질환이고 매우 높은 백혈구 세포 수($200 \times 10^9/L$ 이상)와 지라비대로 특성화된다. 부가적인 증상에는 빈혈과 혈소판감소증(thrombocytopenia)이 포함된다. PLL에서 전림프구(prolymphocyte)는 혈액과 골수 내에서 세포의 55% 이상을 차지한다. CLL과 대조적으로, PLL에서는 자가면역 현상이 드물게 관찰된다(참조: J. Gribben, et al., Small B Cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0306] PLL의 면역표현형은 CD19, CD21, CD22, CD24, FMC7의 발현으로 특성화된다. PLL 세포는 CD23을 발현하지 않고, 대부분의 경우에 CD5를 발현하지 않는다. PLL 세포는 복잡한 크로모솜 비정상을 나타내는데, 13q14와 11q23이 가장 빈번하다. PLL 세포에서 p53 돌연변이의 패턴은 CLL에서 관찰되는 것과 상이하다. 감별 진단은 일반적으로, 전체 혈구수 계산, 조직학적 분석, 면역학적 분석, 유전적 분석에 의존한다(참조: J. Gribben, et al., Small B Cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0307] 5.2.11. 모발상 세포 백혈병(HCL)

[0308] HCL은 주로, 여성보다는 남성에서 중년의 집단에 영향을 주는 드물게 발병하는 무통성 만성 백혈병이다. 전형적인 증상은 심한 지라비대와 범혈구감소증(pancytopenia)이다. 말초혈과 골수는 전형적인 “모발상 세포”를 보유하는데, 이들은 세포질 돌출(cytoplasmic projection)을 보이는 B 림프구이다. 90% 이상의 HCL 환자가 골수 침윤을 나타낸다(참조: Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin and Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, pp. 2428-2446, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0309] 세포유전학 분석에서, 클론 비정상(clonal abnormality)이 19%의 사례에서 존재하고, 크로모솜 5, 7, 14의 수치적 비정상과 구조적 비정상에 관련되는 것으로 밝혀졌다. TNF- α 의 혈청 수준은 모발상 세포 백혈병에서 상승하고 종양 부하량(tumor burden)과 상관한다. 모발상 세포 백혈병 세포는 표면 면역글로불린(IgG와 IgM)을 발현하고 CD11c, CD19, CD20, CD22와 전형적으로, CD25를 발현한다. 이에 더하여, FMC7, HC-2, CD103이 발현된다. HCL 세포는 CD5 또는 CD10을 발현하지 않는다. 진단은 전반적으로, 골수 흡인물의 이용, 세포유전학, 혈액 스미어(blood smear), 면역형태학적 검사를 수반한다(참조: Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin and Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, pp. 2428-2446, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0310] 5.2.12. 전구체 B 세포 림프성 림프종/전구-B 세포 급성 림프성 백혈병/림프성 림프종

[0311] 전구체 B 세포 림프성 림프종/전구-B 세포 급성 림프성 백혈병/림프성 림프종은 전구체 T 또는 B 세포의 질환이다. 이들 T와 B 세포 림프성 림프종은 형태학적으로 동일하지만 골수 침윤 또는 골수 침범의 정도에 기초하여 임상적 구별이 이루어진다. 85-90%의 림프성 림프종은 T-세포 유래되고, 나머지는 B 세포 유래된다. 림프성 림프종은 평균 20세에 발병하고 남성에서 우세하다. 말초 림프절 침범은 특히, 경부, 쇄골상(supraclavicular), 겨드랑이 부위에서 일반적으로 나타나는 증상이다. 이러한 질환은 빈번하게, 골수 침범이 나타난다. 중추신경계에는 발생이 덜하지만 재발의 사례에서 종종 나타난다. 다른 침범 부위에는 간, 비장, 골, 피부, 인두, 고환이 포함될 수 있다(참조: J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pp. 503-513, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0312] 전구체 B 세포 림프성 림프종은 CD99, CD34, 말단 테옥시뉴클레오티딜 전이효소(terminal deoxynucleotidyl transferase)와 같은 미성숙 마커 B 세포 마커를 발현한다. 이들 세포는 또한, CD79a, CD19와 간혹, CD20을 발

현하고, CD45와 표면 면역글로불린의 발현이 전형적으로 부재한다. 11q23에서 전좌 및 t(9;22)(q34;q11.2)와 t(12;21)(p13;q22)은 불량한 예후에 관련된다. 우수한 예후는 특히, 삼염색체증(trisomy) 4, 10, 17 및 t(12;21)(p13;q22)와 연관된 다배수성 핵형(hyperdiploid karyotype)에 관련된다(참조: J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pp. 503-513, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0313] 진단 검사는 림프절 생검, 혈액 검사, x-레이, CT 스캔 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)에서 악성 세포를 검사하기 위한 요추 천자(lumbar puncture)를 포함한다.

[0314] 5.2.13. 원발성 종격동 대형 B 세포 림프종

[0315] 원발성 종격동 대형 B 세포 림프종은 어린 여성에서 주로 발생하고 흉선에서 기원하는 국소 침입성 전종격동 종양으로 특성화되는 범발성 대형 B 세포 림프종이다. 말초 결절로의 원위 확산 및 골수 침범은 드물다. 전신 증상이 일반적이다. 상기 질환이 결절성 대형 세포 림프종과 유사하긴 하지만, 이는 상이한 유전학적, 면역학적, 형태학적 특성을 보유한다.

[0316] 원발성 종격동 대형 B 세포 림프종의 종양 세포의 면역표현형은 종종, 면역 면역글로불린 음성이지만 CD19, CD20, CD22, CD79a와 같은 B 세포 연관된 항원을 발현한다. CD10과 BCL6 역시 통상적으로 발현된다. 형질 세포 연관된 마커 CD15, CD30, 상피세포 막 항원(EMA)의 발현은 드물다. BCL6과 c-myc 유전자 정력 역시 드물다. 클론 면역글로불린 재정렬, 면역글로불린 가변 영역 및 BCL6 극돌연변이(hypermuation)와 함께 유전자 극돌연변이(gene hypermutation)의 존재는 상기 림프종이 성숙 종자 중심 또는 포스트-종자 중심 B 세포로부터 유래된다는 것을 암시한다. 이러한 질환의 종양과 연관하는 것으로 생각되는 크로모솜 전좌는 다른 형태의 범발성 대형 세포 림프종에서 관찰되는 것들과 유사하다(참조: P. Zinzani, et al., Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma, pp. 455-460, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0317] 원발성 종격동 대형 B 세포 림프종에 대한 진단적 평가는 전반적으로, 전체 신체 검사(complete physical examination), 전체 혈액학적 분석과 생화학적 분석(complete hematological and biochemical analysis), 전신 컴퓨터 단층촬영(total-body computerized tomography), 골수 생검(bone marrow biopsy)을 포함한다. 갈륨-67 스캐닝(gallium-67 scanning) 검사가 단계 결정, 치료에 대한 반응, 재발의 평가에 유용하다(참조: P. Zinzani et al., Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma, pp. 455-460, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0318] 5.2.14. 림프형질세포 림프종(LPL)/림프형질세포 면역중/발덴스트롬 마크로글로불린혈증

[0319] LPL/림프형질세포 면역중/발덴스트롬 마크로글로불린혈증은 일반적으로 무통성이며, 종종, 골수, 림프절, 비장을 침범하는 결절성 림프종이다. 이는 전반적으로, 노인성 질환이고 남성에서 약간 우세하다. 대부분의 환자는 혈청의 과점도(hyperviscosity)를 유발하는 단클론 IgM 파라단백질(paraprotein)(>3g/dl)을 그들의 혈청 내에 보유한다. 종양 세포는 형질세포 형태(plasmacytic morphology)를 보유한다. LPL의 부분집합은 크로모솜 9와 14 사이에 재발성 전좌로 특성화되는데, 이는 PAX5와 면역글로불린 중쇄 좌위에 영향을 준다. LPL은 SHM 및 진행성 SHM으로 특성화되고, 포스트-GC B 세포로부터 유래되는 것으로 생각된다(참조: A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B Cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N. Y. (2000); A. LaI, et al., Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, pp. 181-220, In W. Finn, et al., eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

[0320] 이러한 질환의 면역표현형은 B 세포 연관된 항원 CD19, CD20, CD22, CD79a의 발현 및 CD5, CD10, CD23의 발현의 부재를 나타낸다. 강한 표면 면역글로불린과 CD20의 존재, CD5와 CD23의 발현의 부재, 세포질 면역글로불린의 부재는 상기 질환을 만성 림프구성 백혈병과 구별하는데 도움을 주는 특징이다. 또한, t(9;14)(p13;q32)가 상기 질환의 특징이다(참조: A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B Cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N. Y. (2000);

R. Chaganti, et al., Cytogenetics of Lymphoma, pp. 809-824, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0321] 진단 검사는 전형적으로, 전체 혈구수 계산, 신장과 간 기능 검사, CT 스캔, 골수의 생검과 흡인 및 파라단백질과 혈청 점도를 정량하고 특성화하기 위한 단백질 전기영동을 포함한다. β_2 -마이크로글로불린의 측정은 예후 검사로서 이용된다(참조: A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

[0322] 5.2.15. 무-급성 림프아구성 백혈병

[0323] 무-급성 림프아구성 백혈병은 B- 또는 T-세포 특징이 부재하는 ALL의 부분집합이다. 백혈병성 아세포(leukemic blast)의 표현형 분석은 전형적 무-ALL 패턴, 다시 말하면, CD10(통상적인 ALL 항원)-음성, 강한 HLA-DR-양성, CD19 (B4)-양성을 보인다(참조: Katz et al. (1988) Blood 71(5):1438-47)

[0324] 5.2.16. 호지킨 림프종

[0325] 호지킨 림프종은 일반적으로, 청년의 림프절 내에서 발생한다. 이는 표준적인 아형 및 덜 일반적인 결절성 림프구성 우성 아형으로 구분될 수 있다. 표준형은 SHM을 나타내지만 진행성 SHM을 나타내지 않고, GC B 세포 유전자 발현 프로필을 보유하지 않는다. 대조적으로, 결절성 림프구 우세형은 SHM과 진행성 SHM으로 특성화된다. 이들 2가지 유형이 임상적으로 및 생물학적으로 상이하긴 하지만, 이들은 양성 염증 세포의 배경 내에서 신생물 세포의 부재와 같은 일정한 특징을 공유한다(B. Schnitzer et al., Hodgkin Lymphoma, pp. 259-290, In W. Finn and L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

[0326] 증상에서 가장 일반적인 특징은 통상적으로, 목에서 및 때때로, 서혜(inguinal) 부위에서 림프절의 무통증 확장이다. 결절의 왁싱(waxing)과 종말(waning) 역시 상기 질환의 특징이다. B 증상은 환자의 대략 1/3에서 관찰된다. 독립된 림프절외 침범은 드물고, 파종(dissemination)이 발생한 사례에서, 림프절의 침범은 전체 기간의 대략 10-20%에서 관찰된다(참조: P. Johnson et al., Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp. 181-204, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)).

[0327] 리드-스턴버그(Reed-Sternberg, RS) 세포는 호지킨 림프종의 악성 세포이다. RS 세포 및 이들의 변이체는 CD15, CD25, CD30 및 트랜스페린(transferrin) 수용체를 발현한다. 이에 더하여, 이들 세포는 다클론 세포질 면역글로불린을 발현한다. 대부분의 호지킨 림프종 사례에서, RS 세포는 CD45를 발현하지 않는데, 이는 상기 질환을 비-호지킨 림프종으로부터 구별하는데 도움을 주는 특징이다. 엡스타인-바르(Epstein Barr) 바이러스는 호지킨 림프종 사례의 대략 절반에서 리드-스턴버그(Reed-Sternberg) 세포 내에 존재하는 것으로 확인되긴 했지만 이의 역할은 확실치 않다.

[0328] 진단은 가장 빈번하게는, 림프절 생검으로 달성된다. 부가적인 진단 검사에는 전혈 측정(종종, 혈액학적 검사는 정상이다; $1.0 \times 10^9/L$ 이하의 백혈구 세포 수가 대략 20%의 사례에서 관찰된다), 적혈구 침강 속도(종종, 상기 질환의 진행된 단계에서 상승한다); 전해질, 요소, 크레아티닌, 요산염(urate)을 비롯한 생화학적 검사(고칼슘혈증(hypercalcemia)이 드물긴 하지만, 발병하는 경우에, 과도한 골 침범에 관련된다), 간 혈액 검사, 유산염 탈수소효소(종종, 상승된 수준이 진행된 질병과 연관한다), 알부민, 베타₂-마이크로글로불린(β_2 -M)이 포함된다.

흉부, 복부, 골반의 림파니지오그램(lymphangiogram)과 흉부 x-레이와 CT 스캔은 비정상적 림프절 및 림프절외 침범의 정도를 확인하는데 중요하다. 골수 생검은 전형적으로, 선택적인 것으로 간주되는데, 그 이유는 골수 침범이 드물고, 이런 생검의 결과가 임상적 관리 또는 예후에 영향을 주지 않는 것으로 생각되기 때문이다. 비절제(splenectomy)는 현재, 통상적으로 수행되지 않는데, 그 이유는 이런 절차가 관리에 거의 영향을 주지 않고, CT 또는 MRI 영상이 비장 상태에 대한 정보를 제공하기 때문이다. 현저하게 상승된 수준의 p55, TNF, sICAM-1은 상기 질환의 단계, 증상의 존재 및 완전 반응률(complete reaction rate)에 상관된다(참조: P. Johnson, et al., Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp. 181-204, In Malignant lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin and Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); R. Stein, Hodgkin's Disease, pp. 2538-2571, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0329] 5.2.17. 다발성 골수종

[0330] 다발성 골수종은 형질 세포의 악성 종양이다. 신생물 세포는 골수 내에 국한되고, 골용해성 골 병변(osteolytic bone lesion)이 이의 특징이다. 면역글로불린 좌위와 다양한 다른 유전자, 예를 들면, 사이클린 D1, 사이클린 D3, c-MAF, MMSET (다발성 골수종 SET-도메인 단백질) 또는 섬유아세포 성장 인자 수용체 3 사이에 상호 크로모솜 전좌(reciprocal chromosomal translocation)는 일차적인 발암 현상인 것으로 생각된다. 다발성 골수종은 SHM으로 특성화되고, 추정 기원 세포는 포스트-GC B 세포이다. 다발성 골수종은 전형적으로, 재발성 감염, 피로, 통증, 신장 문제와 같은 증상으로 먼저 확인되고, 임상적 검사로 확진된다(참조: Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th edition. DeVita, V.T., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. editors. 2001 Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, PA 19106 pp. 2465-2499).

[0331] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법에 의한 치료 후보가 되는 환자는 CBC에서 보고된 세포 유형이 당분 야에 널리 공지된 그들의 정상적인 범위 내에 있는 지를 결정하는 전체 혈구수 계산(CBC), 다양한 혈액 성분, 예를 들면, 알부민, 혈액 요소 질소(BUN), 칼슘, 크레아티닌, 유산염 탈수소효소(LDH)의 수준이 표준 수치로부터 벗어나는 지를 결정하는 혈액 화학 프로파일(blood chemistry profile)을 비롯하여, 다발성 골수종의 진단 또는 의심을 확증하기 위한 혈액 및/또는 소변에 대한 진단 검사가 추가로 진행될 수 있다. 베타₂-마이크로글로불린(β_2 -M)의 혈청 수준 역시 검사될 수 있는데, 골수종 세포에 대한 성장 인자, IL-6에 대한 마커를 대위한다. 소변 내에서 단백질의 수준을 측정하기 위하여 검뇨(urinalysis)가 이용될 수 있다. 혈액 내에서(혈청 단백질 전기영동, 또는 SPEP) 또는 소변 내에서(소변 전기영동, 또는 UEP) M 단백질을 비롯한 다양한 단백질의 수준을 측정하기 위하여 전기영동이 이용될 수 있다. 존재하는 비정상 항체 단백질에 관한 더욱 구체적인 정보를 제공하기 위하여 면역고정 전기영동(immunofixation electrophoresis, IFE) 또는 면역전기영동(immunoelectrophoresis)이라고 하는 검사가 추가로 수행될 수도 있다. 다양한 단백질, 특히, M 단백질의 변화와 비율을 평가하여 골수종 질환의 진행 및 치료 처방에 대한 반응을 추적할 수 있다. 다발성 골수종은 골수종 종양 세포에 의해 분비되는 M 단백질의 급격한 증가로 특성화된다.

[0332] 다발성 골수종의 진단 또는 의심을 확증하기 위하여 골에 대한 진단 검사가 또한 수행될 수 있는데, 여기에는 골 구조에서 변화를 평가하고 골 내에서 종양의 총수와 크기를 결정할 수 있는 X-레이 및 골(골격) 조사, 자기 공명 영상(MRI), 전산화 축성 단층촬영(computerized axial tomography, CAT), 일명, 컴퓨터 단층촬영(computed tomography, CT)을 비롯한 다른 영상 검사가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0333] 골수 내에서 형질 세포의 총수에서 증가를 검출하기 위하여 골수 흡인 또는 골수 생검이 이용될 수 있다. 흡인은 액상 골수의 샘플을 요하고, 생검은 고형 골 조직의 샘플을 요한다. 양쪽 검사에서, 샘플은 가급적, 골반(관골(hip bone))으로부터 채취된다. 골수의 흡인을 위하여 복장뼈(sternum) 역시 이용될 수 있다.

[0334] 다발성 골수종 환자는 전형적으로, 효과적인 치료 처방을 규정하는데 도움이 되는 아래의 3가지 군으로 분류된다. 미확정 단클론 감마병증(MGUS)은 전형적으로, 3 g/dL 이하의 혈청 M 단백질 수준, 10% 이하의 골수 클론 형질 세포, 다른 B 세포 질환의 증거 없음, 관련된 기관 또는 조직 손상, 예를 들면, 고칼슘혈증(증가된 혈청 칼슘 수준) 없음, 증가된 혈청 크레아티닌으로 확인되는 손상된 신장, 빈혈, 또는 골 병변으로 특성화된다. 무증상 골수종은 전형적으로, 단계 I이고, 아급성 다발성 골수종(SMM)과 무통성 다발성 골수종(IMM)을 포함한다. SMM은 3 g/dL 이상의 혈청 M 단백질로 특성화되고, IMM은 골수 세포의 10% 이상의 골수 클론 형질 세포로 특성화된다. 증상성 골수종은 혈청 및/또는 소변 내에서 M 단백질로 특성화되고, 골수 클론 형질 세포 또는 형질구종의 존재로 특성화되는 단계 II 다발성 골수종 및 관련된 기관 또는 조직 손상으로 특성화되는 단계 III 다발성 골수종을 포함한다. 골경화성 골수종은 드물게 발생하는 POEMS 증후군(다발신경병증(polyneuropathy), 장기 비대(organomegaly), 내분비병증(endocrinopathy), 단클론 감마병증, 피부 병소)의 한 구성요소이다. 피크 발생률(Peak incidence) 40 내지 50세 연령에서 나타난다. 전신 특징은 골격 병변, 골수-형질(marrow-plasma) 세포 < 5%, 정상 CBC, 증가된 혈소판, 장기비대 등이다. CSF는 높은 단백질 함량을 보유하고 세포가 존재하지 않는다. M-단백질 수준이 낮다(< 3g/dL, 평균 = 1.1 g/dL); 중쇄 분류 - 일반적으로, α 또는 γ ; 경쇄 분류 - 일반적으로, λ ; 희박한 요소 단클론과 간혹, 한냉글로불린혈증(cryoglobulinemia). 신경병증(neuropathy)이 원위와 근위가 모두 약화된 환자의 50%에서 발생하고, 감각 상실(sensory loss)이 소형 섬유(small fiber)에서보다 크다; 탈수초화(demyelination)와 긴 원위 잠복(long distal latency).

[0335] 아급성 다발성 골수종 환자는 일반적으로, 수개월/수년 동안 안정적인 질환으로 존재한다; 빈혈 없음, 골 병변, 신장 부전 또는 고칼슘혈증; 골수와 단클론 혈청 단백질 내에서 >10% 형질 세포를 보유한다. 아급성 다발성 골수종에 대한 기준은 다발성 골수종의 진단에서와 유사하다; 하지만, 진행 과정(progressive course)의 증거가

없다. 이들은 진행이 느린 사례이고, 종양 세포량(tumor cell mass)이 진단 시에 적고, S 기에서 골수 형질 세포의 비율이 낮다(<0.5%). 특징적인 임상적 증상은 아래와 같다: 혈청 M 단백질 수준 >3 g/dL 및/또는 골수 형질 세포 $\geq 10\%$; 빈혈의 부재, 신부전, 고칼슘혈증, 용해성 골 병변.

[0336] 무통성(또는 무증상) 다발성 골수종은 증상의 부재에서, 통상적으로, 스크리닝 실험실 연구이후 우연히 진단되는 다발성 골수종이다. 무통성 다발성 골수종은 아급성 골수종과 유사하지만 극소수의 골 병변과 경미한 빈혈을 나타낸다. 무통성 다발성 골수종의 대부분의 사례는 3년 이내에 명백한 다발성 골수종으로 발달한다. 진단 기준은 아래의 사실을 제외하고 다발성 골수종에서와 동일하다: 골 병변 없음 또는 무증상 용해 병변(X-레이 검사); M 성분 수준: IgG의 경우에 <3 g/dL, IgA 소변 경색 < 4 g/24h의 경우에 2 g/dL; 헤모글로빈 >10 g/dL, 혈청 칼슘 정상, 혈청 크레아티닌 <2 mg/dL, 감염 없음.

[0337] 5.2.18. 고립성 형질구종

[0338] 고립성 형질구종은 양성 단클론 감마병증에서부터, 고립성 형질구종 내지 다발성 골수종까지 광범위한 형질 세포 신생물 중의 하나이다. 전체 고립성 형질구종 중에서 대략 70%가 궁극적으로, 다발성 골수종을 유발한다. 이들 질환은 특징적인 과라단백질을 생산하는 B 세포의 증식으로 특성화된다. 고립성 형질구종은 고립성 부위, 일반적으로, 단일 골 또는 골수외(extramedullary) 조직 부위 내에서 클론 형질 세포의 증식을 유발한다. 고립성 형질구종의 진단 기준에는 조직학적으로 확증된 단일 병변, 정상적인 골 생검, 음성 골격 검사결과, 빈혈 없음, 정상적인 칼슘과 신장 기능 등이 포함된다. 대부분의 사례는 최소로 상승된 혈청 M-단백질(과라단백질)을 보인다. 진단 시에 평균 연령은 다발성 골수종의 평균 연령보다 대략 5-10세 낮은 50-55세이다(참조: C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pp. 113-144, In W. Finn and L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004), S. Chaganti, et al., Cytogenetics of Lymphoma, pp. 809-824, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, (2004)).

[0339] 형질구종의 면역표현형과 유전적 특징은 다발성 골수종과 유사하다.

[0340] 5.2.19. 경색 질환/경색 침착 질환(LCDD)

[0341] LCDD는 조직 내에 침착되는 면역글로불린 경색(일반적으로, 카파 경색)의 과다-발현에 의해 유발되는 형질 세포 혈액이상(dyscrasias) 질환이다. 환자는, 일반적으로, 기관 기능장애, 약화, 피로, 체중 감소를 나타낸다. LCDD의 대략 80%의 사례에서, 단클론 면역글로불린이 검출된다.

[0342] 면역형광 기술을 이용한 단클론 카파 경색의 검출은 과도한 배경 염색(background staining)을 제공하는 경색의 성향으로 인하여 제한되고, 이런 이유로, 초미세구조 면역황금 표식(ultrastructural immunogold labeling)이 필요하다(참조: C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pp. 113-144, In W. Finn and L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

[0343] 5.2.20. 형질 세포 백혈병(PCL)

[0344] PCL, 형질 세포 혈액이상은 드물게 발생하는 다발성 골수종의 침습성 변이체이다. 형질 세포 백혈병에 대한 기준은 $2 \times 10^9/L$ 이상의 말초혈 형질 세포 절대치 또는 백혈구 세포의 20% 이상의 형질 세포이다. 유세포분석법에 의한 세포질 경색 제한으로 CD 138⁺ 개체군의 존재의 결정은 PCL을 형질세포 특징을 갖는 림프 신생물로부터 구별할 것이다. PCL 세포는 또한, 표면 경색과 CD19 발현의 부재 및 CD45의 발현 없음이나 약한 발현으로 특성화된다. PCL의 대략 50 % 사례가 CD20을 발현하고 대략 50%는 CD56의 발현이 부재한다. PCL 환자에서 관찰되는 유전적 비정상성은 다발성 골수종 환자에서 관찰되는 것들과 동일하긴 하지만, PCL에서 이들의 빈도가 더욱 높다(참조: C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pp. 113-144, In W. Finn and L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, (2004)).

[0345] 형질 세포 백혈병은 2가지 형태를 갖는다: 최초 진단이 골수종의 백혈병성 기(leukemic phase)에 기초하면 일차성 형태이고, 그렇지 않으면 이차성 형태이다. 일차성 형질 세포 백혈병은 어린 연령, 간비종대(hepatosplenomegaly), 림프절병증, 극소수의 용해성 골 병변에 관련되지만 이차성 형태보다 예후가 불량하다. 형질세포 백혈병 환자의 말초 혈액은 2000/mL 또는 그 이상의 절대치로, 20% 이상의 형질 세포를 보유한다.

[0346] 5.2.21. 미확정 단클론 감마병증(MGUS)

[0347] MGUS는 전기영동에서 균일한 면역글로불린 또는 양성 M-성분의 존재로 특성화되는 상대적으로 일반적인 질환이

다. 이러한 질환의 발생은 연령에 따라 증가하는 것으로 보인다. M-성분을 보유하는 대부분의 개체는 악성 형질 세포 혈액이상, 예를 들면, 다발성 골수종이 발병하지 않는다. 하지만, 이러한 질환을 앓는 일부 개체는 연관된 악성 질환을 나타낸다. 증상성인 경우에, 환자는 확장된 간이나 비장 및 측부신경병증(pleuroneuropathy)을 나타낼 수 있다(참조: J. Foerster, Plasma Cell Dyscrasias: General Considerations, pp. 2612-2630, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0348] MGUS는 말초 혈액 내에서 순환하는 증가된 수의 단클론 형질 세포의 존재에 의해 다발성 골수종으로부터 구별될 수 있다. M-성분의 혈청학적 특징은 다른 형질 세포 혈액이상 질환에서와 동일하지만, M-성분의 전체 농도가 일반적으로, 30 g/L 이하이다. 과라단백질은 일반적으로, IgG이다; 하지만, IgG, IgA, IgM을 비롯한 복수의 과라 단백질이 존재할 수도 있다. 개별 면역글로불린 분류 각각의 상대적인 양은 정상 혈청 내에서 관찰되는 양에 전형적으로 비례한다. 단백혈증(proteinemia) 또는 단백뇨증(proteinuria)은 드물다. 혈액과 소변 내에서 M-단백질 수준의 일련의 측정 및 임상적 특징과 실험적 특징의 지속된 모니터링(단백질 전기영동 포함)이 MGUS를 초기 단계 형질 세포 혈액이상과 구별하는 가장 확실한 방법이다(In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

[0349] 5.2.22. 성숙 B 세포 악성종양

[0350] 본 발명자들은 본 발명의 항-CD19 조성물이 성숙 B 세포를 고갈시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 여포성 림프종; 외투 세포 림프종; 버키트 림프종; 다발성 골수종; 종자 중심 B 세포-유사(GCB) DLBCL, 활성화된 B 세포-유사(ABC) DLBCL, 3형 DLBCL을 비롯한 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL); 표준형과 결절성 림프구 우세형(pre-dominant type)을 비롯한 호지킨 림프종; 림프형질세포 림프종(LPL); 위 점막-연관된 림프 조직(MALT) 림프종을 비롯한 변연부 림프종; 면역글로불린-돌연변이된 CLL과 면역글로불린-비돌연변이된 CLL을 비롯한 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 성숙 B 세포 악성종양을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0351] 5.2.23. 전구-B 세포 악성종양

[0352] 더 나아가, CD19는 예로써, CD20과 달리 B 세포 발달 시에 초기에 발현되기 때문에, 예로써, 골수 내에서 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양을 치료하는데 특히 적합하다. 전형적인 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양에는 외투 세포 림프종, 전구-B 세포 급성 림프성 백혈병, 전구체 B 세포 림프성 림프종 및 CD19 발현으로 특성화되는 다른 악성종양이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0353] 5.3. 샘플과 개체 내에서 CD19 밀도 측정

[0354] 반드시 필요한 것은 아니지만, 환자의 진단을 더욱 특성화하기 위하여 CD19 밀도 측정을 이용할 수 있다. 세포에 대한 항체 결합의 밀도를 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다(참조: Sato et al., J. Immunology 165:6635-6643 (2000); 상기 문헌에서는 특정 CD 항원의 세포 표면 밀도를 측정하는 방법을 기술한다). 다른 표준 방법은 Scatchard 분석이다. 가령, 항체 또는 단편은 분리하고, 방사성표지하고, 방사성표지된 항체의 특이적인 활성을 측정할 수 있다. 이후, 항체는 CD19를 발현하는 표적 세포와 접촉시킨다. 상기 세포와 연관된 방사성은 상기 특이적인 활성, 측정되는 이들 세포에 결합된 항체 또는 항체 단편의 양에 기초하여 측정될 수 있다.

[0355] 대안으로, 형광 활성화된 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS) 분석을 이용할 수 있다. 전반적으로, 항체 또는 항체 단편은 CD19를 발현하는 표적 세포에 결합시킨다. 이후, 상기 항체에 결합하는 두 번째 반응물, 예를 들면, 형광색소(fluorochrome) 표지된 항-면역글로불린 항체를 추가한다. 그 다음, 형광색소 염색을 측정하고, 이를 이용하여 세포에 대한 항체 또는 항체 단편 결합의 밀도를 측정할 수 있다.

[0356] 다른 적합한 방법으로서, 항체 또는 항체 단편은 검출가능한 라벨, 예를 들면, 형광단(fluorophore)으로 직접적으로 표지하고, 표적 세포에 결합시킬 수 있다. 단백질에 대한 라벨의 비율을 측정하고, 이를 공지된 양의 라벨이 결합된 표준 비드와 비교한다. 세포에 결합된 라벨의 양과 공지된 표준의 비교는 상기 세포에 결합된 항체 양을 산정하는데 이용될 수 있다.

[0357] 또 다른 측면에서, 본 발명은 샘플 또는 개체 내에서 CD19의 존재 및/또는 밀도를 시험관내에서 또는 생체내에서 검출하는 방법을 제시한다. 이는 또한, 질병과 치료 효과를 모니터링하고 투여되는 항체의 양을 결정하고 조정하는데 이용될 수 있다. 이러한 생체내 방법은 PET(양전자 방출 단층 촬영, positron emission tomography) 또는 SPECT(단일 광양자 방출 컴퓨터 단층 촬영, single photon emission computed tomography)와 같은 영상 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 대안으로, 공유 부착된 킬레이터를 이용하여 항-CD19 항체를 인듐(Indium)으

로 표지할 수 있다. 생성된 항체는 CD20 항원을 영상하기 위하여 ZEVALIN™(인덱스 표지된 항-CD20 mAb)(Biogen Idee)을 이용할 때와 동일한 방식으로 표준 감마 카메라를 이용하여 영상할 수 있다.

[0358] 한 구체예에서, 생체내 방법은 본 발명의 항체와 인간 CD19 항원 사이에 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에, 선택적으로 대조 샘플과 함께, 검사되는 샘플을 본 발명의 인간 항-CD19 항체와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 이후, 복합체 형성을 검출한다(가령, FACS 분석 또는 웨스턴 블랏팅(Western blotting))을 이용하여). 검사 샘플과 함께 대조 샘플을 이용하는 경우에, 복합체는 양쪽 샘플 모두에서 검출되고, 샘플 사이에 복합체의 형성에서 임의의 통계학적으로 유의한 차이는 검사 샘플 내에서 인간 CD19의 존재를 지시한다.

[0359] 다른 구체예에서, CD19 밀도의 척도로서 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity)를 이용할 수 있다. 이런 구체예에서, B 세포는 환자로부터 채취되고 형광 라벨로 표지된 CD19 항체로 염색되며, 형광 강도는 유세포 분석법을 이용하여 측정된다. 형광 강도는 B 세포에 대한 강도의 평균으로서 측정되고 표시될 수 있다. 이들 방법을 이용하여, CD19 밀도의 대표적인 평균 형광 강도는 본 발명의 조성물과 방법을 이용한 치료 전후에 1명의 환자에서 비교하거나, 또는 환자 및 B 세포 상에서 hCD19의 정상 수준 사이에 비교할 수 있다.

[0360] B 세포 상에서 CD19 발현의 밀도가 결정된 환자에서, CD19의 밀도는 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체의 용량 및/또는 상기 항체와 병용되는 치료 처방의 결정 및/또는 조정에 영향을 준다. 가령, CD19의 밀도가 높은 경우에, 인간에서 ADCC를 덜 효율적으로 매개하는 항-CD19 항체를 이용하는 것이 가능하다. 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 치료되는 환자가 낮은 CD19 밀도를 보유하는 특정 구체예에서, 더욱 높은 용량의 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체가 이용된다. 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 치료되는 환자가 낮은 CD19 밀도를 보유하는 다른 구체예에서, 낮은 용량의 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체가 이용된다. 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 치료되는 환자가 높은 CD19 밀도를 보유하는 특정 구체예에서, 더욱 낮은 용량의 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체가 이용된다.

[0361] 특정 구체예에서, CD19 밀도를 환자에서 CD20 밀도와 비교하거나, CD19 밀도를 인간 또는 특정 환자 개체군에 대한 CD19 밀도와 비교하거나, 또는 CD19 밀도를 치료 이전에 또는 B 세포 질환이나 질병의 발병 이전에 환자에서 CD19 수준과 비교할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 치료되는 환자는 CD19가 B 세포의 표면 상에 존재하는 B 세포 악성종양 환자이다.

[0362] 6. 면역치료 프로토콜

[0363] “항-CD19 면역요법” 이라고 하는 치료 처방/프로토콜에 이용되는 항-CD19 항체 조성물은 나신 항체, 면역공역체 및/또는 융합 단백질일 수 있다. 본 발명의 조성물은 단일 치료제로서, 또는 다른 치료제 또는 처방과의 조합으로 이용될 수 있다. 항-CD19 항체 또는 면역공역체는 하나이상의 치료제의 투여 이전에, 투여와 동시에, 또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물과의 조합 치료 처방에 이용될 수 있는 치료제는 세포의 기능을 저해하거나 예방하고 및/또는 세포의 파괴를 유도하는 임의의 물질이다. 실례에는 방사성 동위원소, 화학치료제 및 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 이의 단편과 같은 독소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에 기술된 치료 처방, 또는 임의의 요망되는 치료 처방은 유전자도입 동물 모형, 예를 들면, 고유 CD19 항원에 부가적으로 또는 이를 대신하여 인간 CD19 항원을 발현하는 하기 섹션 “**실시예 1: 유전자도입 생쥐 내에서 인간 CD19 발현**” 에 기술된 생쥐 모형을 이용하여 효능을 검사할 수 있다. 따라서, 항-CD19 항체 치료 처방은 인간에 투여에 앞서 효능을 결정하기 위하여 동물 모형에서 검사될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법은 B 세포 악성종양을 비롯한 B 세포 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. “B 세포 악성종양” 은 B 세포 계열의 세포로부터 유래된 임의의 악성종양을 포함한다. 전형적인 B 세포 악성종양에는 하위 등급/여포성 NHL, 소형 림프구성(SL) NHL, 중간 등급/여포성 NHL, 중간 등급 범발성 NHL, 상위 등급 면역아구성(immunoblastic) NHL, 상위 등급 림프성 NHL, 상위 등급 소형 비-분할 세포 NHL, 외투 세포 림프종, 치료하기 어려운 질병(bulky disease) NHL를 비롯한 B 세포 아형 비-호지킨 림프종(NHL); 버키트 림프종; 다발성 골수종; 전구-B 급성 림프아구성 백혈병 및 초기 B 세포 전구체로부터 유래되는 다른 악성종양; 통상적인 급성 림프구성 백혈병(ALL); 면역글로불린-돌연변이된 CLL과 면역글로불린-비돌연변이된 CLL을 비롯한 만성 림프구성 백혈병(CLL); 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia); 무-급성 림프아구성 백혈병; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia); 종자 중심(germinal center) B 세포-유사(GCB) DLBCL, 활성화된 B 세포-유사(ABC) DLBCL, 3형 DLBCL을 비롯한 범발성 대형 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL); 전 림프구성 백혈병; 경쇄 질환(light chain disease); 형질구종(plasmacytoma); 골경화성 골수종(osteosclerotic myeloma); 형질 세포 백혈병(plasma cell leukemia); 미확정 단클론 감마병증(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS); 아급성 다발성 골수종(smoldering multiple myeloma, SMM); 무통성 다발성

골수종(indolent multiple myeloma, IMM); 표준형과 결절성 림프구 우세형(pre-dominant type)을 비롯한 호지킨 림프종; 림프형질세포 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma, LPL); 위 점막-연관된 림프 조직(gastric mucosal-associated lymphoid tissue, MALT) 림프종을 비롯한 변연부 림프종(marginal zone lymphoma)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0364] 본 발명자들은 본 발명의 항체와 조성물이 성숙 B 세포를 고갈시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 여포성 림프종; 외투 세포 림프종; 버키트 림프종; 다발성 골수종; 종자 중심 B 세포-유사(GCB) DLBCL, 활성화된 B 세포-유사(ABC) DLBCL, 3형 DLBCL을 비롯한 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL); 표준형과 결절성 림프구 우세형을 비롯한 호지킨 림프종; 림프형질세포 림프종(LPL); 위 점막-연관된 림프 조직(MALT) 림프종을 비롯한 변연부 림프종; 면역글로불린-돌연변이된 CLL과 면역글로불린-비돌연변이된 CLL을 비롯한 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 성숙 B 세포 악성종양(즉, 세포 표면 상에서 Ig를 발현함)을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0365] 더 나아가, CD19는 예로써, CD20과 달리 B 세포 발달 시에 초기에 발현되기 때문에, 예로써, 골수 내에서 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양(즉, 세포 표면 상에 Ig를 발현하지 않음)을 치료하는데 특히 적합하다. 전형적인 전구-B 세포와 미성숙 B 세포 악성종양에는 급성 림프성 백혈병이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0366] 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 림프절외 종양(extranodal tumor)을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0367] 6.1. 항-CD19 면역요법

[0368] 본 발명에서, “항-CD19 면역요법”은 본 명세서에 기술된 임의의 치료 처방에 따른 본 발명의 항-CD19 항체의 투여를 포괄한다. 항-CD19 항체는 나신 항체, 또는 면역공액체 또는 융합 단백질로서 투여될 수 있다.

[0369] 항-CD19 면역요법은 B 세포 악성종양의 치료를 위한 단일 치료제로서 항-CD19 항체의 투여를 포괄한다. 항-CD19 면역요법은 B 세포 악성종양으로부터 유래되는 초기 단계 질병을 치료하는 방법을 포괄한다. 항-CD19 면역요법은 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 포괄하는데, 여기서 항-CD19 항체는 ADCC를 매개한다. 항-CD19 면역요법은 B 세포 악성종양을 치료하는 방법을 포괄하는데, 여기서 항-CD19 항체는 상기 요법이 화학요법, 방사성 화학물질 기초된 요법(radio chemical based therapy) 또는 외과 요법인 지에 상관없이, 환자가 악성종양에 대한 치료를 받기 이전에 투여된다.

[0370] 바람직한 구체예에서, B 세포 악성종양을 앓는 인간 개체는 가급적, 인간 ADCC를 매개하는 인간 또는 인간화 항체를 투여함으로써 치료될 수 있다. 초기 단계 질병, 또는 단일 치료제의 경우에, ADCC를 매개하는 항-CD19 항체(뮤린과 키메라 항체 포함)가 인간 개체에 이용될 수 있다; 하지만, 인간과 인간화 항체가 바람직하다.

[0371] IgG1 또는 IgG3 인간 아이소타입의 항체가 치료에 바람직하다. 하지만, 인간 ADCC를 매개하는 IgG2 또는 IgG4 인간 아이소타입 역시 이용될 수 있다. 이런 작동체 기능은 시험관내에서 또는 생체내에서 작동체 세포에 의한 표적 세포 용해를 매개하는 목적 항체의 능력을 측정함으로써 평가할 수 있다. 이용되는 항체의 용량은 순환 B 세포를 고갈시킬 만큼 충분해야 한다.

[0372] 환자에서 치료의 진전은 혈액 샘플을 분석함으로써 모니터링할 수 있다. 치료를 모니터링하기 위하여 임상적 향상의 다른 징후가 이용될 수 있다.

[0373] 본 발명의 조성물과 방법에 연계하여 이용될 수 있는, B 세포 고갈을 측정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 아래의 구체예가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 한 구체예에서, 순환 B 세포 고갈은 B 세포에 결합하여 B 세포의 양을 결정하는 항-CD19 항체 이외의 반응물을 이용한 유세포분석법으로 측정할 수 있다. 다른 구체예에서, 혈액 내에서 항체 수준은 표준 혈청 분석을 이용하여 모니터링할 수 있다. 이런 구체예에서, B 세포 고갈은 B 세포에 의해 생산되는 것으로 알려져 있는 항체의 양을 규정함으로써 간접적으로 측정된다. 이후, 상기 항체의 수준을 모니터링하여 B 세포의 고갈 및/또는 기능적 고갈을 결정한다. 다른 구체예에서, B 세포 고갈은 B 세포를 확인하는 면역화학 염색(immunohistochemical staining)으로 측정할 수 있다. 환자 조직으로부터 추출된 B 세포는 현미경 슬라이드 상에 위치시키고, 표지하고, 존재 또는 부재를 검사할 수 있다. 관련된 구체예에서, 치료 전후에 추출된 B 세포를 비교하여 B 세포의 존재에서 차이를 결정한다.

[0374] 종양 부하량(tumor burden)을 측정하고 이를 본 발명의 조성물과 방법에 연계하여 이용할 수 있다. 종양 부하량을 측정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 아래의 구체예가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정 구체예에서, 물질대사 활성을 측정하고 종양을 암시하는 더욱 높은 활성 부위를 확인하는데 PET 스캔이 이용될 수 있다. CT 스캔과 MRI 역시 연조직(soft tissue)에서 종양의 존재와 크기를 검사하는데 이용될 수 있다. 다른

구체예에서, 종양 부피와 위치를 측정하는데 골 스캔(bone scan)이 이용될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 종양 부하량은 도플러 기술(doppler technology)(가령, 초음파)을 이용하여 종양의 혈액 유입과 유출을 검사함으로써 측정할 수 있다. 이런 구체예에서, 종양 부하량에 대한 추정치를 산정하기 위하여 환자의 적당한 조직 내에서 시간의 추이에서 혈류의 변화 또는 정상적인 혈류로부터 이탈이 이용될 수 있다. 종양 부하량을 측정하는 이와 같은 방법은 본 발명의 치료 방법 전후에 이용될 수 있다.

[0375] 본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, B 세포는 고갈되고 및/또는 종양 부하량은 감소되는 반면, ADCC 기능은 유지된다.

[0376] 항-CD19 항체가 단일 치료제로서 투여되는 본 발명의 구체예에서, 본 발명은 상이한 치료 처방의 이용을 고려한다.

[0377] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 조성물과 방법의 항-CD19 항체는 나신 항체이다. 관련된 구체예에서, 이용된 나신 항-CD19 항체의 용량은 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/환자 체중 kg이다. 특정 구체예에서, 이용된 나신 항-CD19 항체의 용량은 적어도 1 내지 10, 5 내지 15, 10 내지 20, 또는 15 내지 25 mg/환자 체중 kg이다. 특정 구체예에서, 이용된 나신 항-CD19 항체의 용량은 적어도 1 내지 20, 3 내지 15, 또는 5 내지 10 mg/환자 체중 kg이다. 바람직한 구체예에서, 이용된 나신 항-CD19 항체의 용량은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg/환자 체중 kg이다. 특정 구체예에서, 용량은 4 내지 8주 연속 동안 주1회 투여되는 대략 375 mg/m²의 항-CD19 항체를 포함한다. 특정 구체예에서, 용량은 4 내지 8주 연속 동안 주1회 투여되는, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 mg/환자 체중 kg이다.

[0378] 앞서 기술된 전형적인 용량의 항-CD19 항체는 섹션 “투여와 용량”에 기술된 바와 같이 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 용량은 단일 주입 용량이다. 다른 구체예에서, 용량은 일정한 기간 동안 투여된다. 다른 구체예에서, 용량은 일정한 기간 동안 수회 투여된다. 투여 기간은 수일, 수개월 또는 수주이다. 항-CD19 항체의 복수 분량이 독성 부작용과 균형을 맞추면서 치료 이익을 달성하는데 적합한 간격으로 투여될 수 있다. 가령, 복수 분량이 이용되는 경우에, 항체로 반복 처리에 앞서 환자의 단핵구 총수를 회복시킬 수 있는 시간 간격을 설정하는 것이 바람직하다. 이러한 투약 처방은 치료 효능을 최적화하는데, 그 이유는 단핵구 개체군이 환자에서 ADCC 기능을 반영하기 때문이다.

[0379] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 치료에 반응하는 인간 환자에 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 질병이 진행되지 않는 인간 환자에 투여된다. 관련된 구체예에서, 본 발명의 조성물은 질병이 진행되지 않고 일정한 기간 동안 진행되지 않았던 인간 환자에 투여되고, 이후 환자는 상기 질병이 재발하거나 다시 진행되지 않으면 본 발명의 조성물이 투여되지 않는다. 가령, 환자는 대략 4 내지 8주 동안 앞서 언급된 임의의 용량으로 치료될 수 있는데, 이 기간 동안 상기 환자는 질병 진행(disease progression)이 모니터링된다. 질병 진행이 중단되거나 반전되면, 환자는 재발할 때까지, 다시 말하면, 치료되는 질병이 재발하거나 진행될 때까지 본 발명의 조성물이 투여되지 않는다. 이러한 재발 또는 진행이후, 환자는 초기에 이용된 동일한 투약 처방으로 다시 치료되거나, 또는 앞서 기술된 다른 용량을 이용하여 치료될 수 있다.

[0380] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 1회 적하량(loading dose)으로 투여되고, 이후 일정한 기간 동안, 감소된 복수 분량(유지량)으로 투여될 수 있다. 이런 구체예에서, 효과적인 B 세포 고갈을 유지하기 위하여 용량이 시간별로 분배되고 양이 조정된다. 바람직한 구체예에서, 적하량은 대략 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18 mg/환자 체중 kg이고, 유지량(maintenance dose)은 적어도 5 내지 10 mg/환자 체중 kg이다. 바람직한 구체예에서, 유지량은 매 7, 10, 14 또는 21일의 간격으로 투여된다. 유지량은 독성이 나타날 때까지, 혈소판 수가 감소할 때까지, 질병 진행이 없을 때까지, 환자가 약제에 대한 면역 반응을 나타낼 때까지, 또는 질병이 말기 상태(terminal state)로 진행될 때까지 무한히 지속될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 질병이 말기 단계로 진행될 때까지 인간 환자에 투여된다. 환자의 순환 단핵구 수준이 치료 처방의 일부로서 모니터링되는 본 발명의 구체예에서, 투여되는 항-CD19 항체의 용량은 단핵구 총수가 회복될 수 있도록 일정한 간격으로 분할된다. 가령, 본 발명의 조성물은 매 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일의 간격으로 투여된다.

[0381] 항-CD19 항체가 독소에 공액되거나 독소와 공동으로 투여되는 본 발명의 구체예에서, 당업자가 인지하는 바와 같이, 항-CD19 항체의 용량은 독소 용량에 기초하여 조정될 수 있고, 상기 독소 용량은 이용되는 독소의 특정 유형에 좌우된다. 전형적으로, 독소가 이용되는 경우에, 항-CD19 항체의 용량은 나신 항-CD19 항체가 이용될 때

의 용량보다 적다. 적절한 용량은 당분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 특정 독소에 대하여 결정될 수 있다. 가령, 용량 범위 연구를 수행하여 독소와 함께 투여되거나 독소에 공역될 때 항-CD19 항체의 최대 허용량(maximum tolerated dose)을 결정할 수 있다.

[0382] 항-CD19 항체가 방사선치료제에 공역되거나 방사선치료제와 공동으로 투여되는 본 발명의 구체예에서, 항-CD19 항체의 용량은 이용된 방사선치료제에 좌우된다. 바람직한 특정 구체예에서, 2 단계 공정이 이용된다. 첫째, 인간 환자는 나신 항-CD19 항체를 함유하는 조성물이 투여되고, 대략 6, 7, 8, 9, 또는 10일후, 소량의 방사선치료제가 투여된다. 둘째, 저용량 요법의 내약성(tolerance), 분배(distribution), 소거율(clearance)이 결정되면, 환자는 일정한 용량의 나신 항-CD19 항체가 투여되고, 이후 치료량의 방사성치료제가 투여된다. 이런 치료 처방은 ZEVALIN™(인듐 표지된 항-CD20 mAb)(Biogen Idee) 또는 BEXXAR™(GSK, Coulter Pharmaceutical)을 이용한 비-호지킨 림프종의 치료를 위하여 승인된 것들과 유사하다.

[0383] 6.2. 화학치료제와의 조합

[0384] 항-CD19 면역요법(나신 항체, 면역공역체, 또는 융합 단백질을 이용)은 단독으로 또는 조합으로, 화학요법, 방사선면역치료법(RIT), 화학요법 및 외부 방사선(병용요법, CMT), 또는 병용 방사선면역치료법(CMRIT) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다른 요법과 병용될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체 요법은 비-호지킨 림프종을 치료하기 위한 가장 통상적인 화학요법 처방인 CHOP(사이클로포스파마이드-하이드록시도루비신-온코빈(빈크리스틴)-프레드니솔론)과 공동으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서, “공동으로 투여”는 항-CD19 면역요법이 다른 요법 이전에, 동안, 또는 이후에 투여될 수 있음을 의미한다.

[0385] 특정 구체예에서, 항-CD19 면역요법은 세포독성 방사성핵종(radionuclide) 또는 방사성치료 동위원소와 병용된다. 가령, 알파-방출 동위원소, 예를 들면, ^{225}Ac , ^{224}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra , 또는 ^{223}Ra 이다. 대안으로, 세포독성 방사성핵종은 베타-방출 동위원소, 예를 들면, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{166}Ho , 또는 ^{64}Cu 이다. 더 나아가, 세포독성 방사성핵종은 오거(Auger) 및 낮은 에너지 전자를 방출할 수 있는데, 여기에는 동위원소 ^{125}I , ^{123}I 또는 ^{77}Br 이 포함된다. 다른 구체예에서, 동위원소는 ^{198}Au , ^{32}P 등이다. 특정 구체예에서, 개체에 투여되는 방사성핵종의 양은 대략 0.001 mCi/kg 내지 대략 10 mCi/kg이다.

[0386] 바람직한 일부 구체예에서, 개체에 투여되는 방사성핵종의 양은 대략 0.1 mCi/kg 내지 대략 1.0 mCi/kg이다. 다른 바람직한 구체예에서, 개체에 투여되는 방사성핵종의 양은 대략 0.005 mCi/kg 내지 0.1 mCi/kg이다.

[0387] 특정 구체예에서, 항-CD19 면역요법은 화학 독소 또는 화학치료제와 병용된다. 적절하게는, 화학 독소 또는 화학치료제는 칼리케아마이신(calicheamicin) 및 에스페라마이신(esperamicin)과 같은 엔다이인(enediyne), 듀오카르마이신(duocarmycin), 메토틱렉세이트(methotrexate), 독소루비신(doxorubicin), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), ARA-C, 빈데신(vindesine), 미토마이신(mitomycin) C, 시스-플라티나(cis-platinum), 에토포시드(etoposide), 블레오마이신(bleomycin), 5-플루오로우라실(flourouracil)에서 선택된다.

[0388] 항-CD19 면역요법과의 복합 요법으로 사용될 수 있는 적합한 화학 독소 또는 화학치료제에는 칼리케아마이신(calicheamicin) 및 에스페라마이신(esperamicin)과 같은, 엔다이인(enediyne) 계통 분자의 구성원이 포함된다. 화학 독소는 또한, 듀오카르마이신(duocarmycin)(참조: U.S. Pat. No. 5,703,080; U.S. Pat. No. 4,923,990), 메토틱렉세이트(methotrexate), 독소루비신(doxorubicin), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), ARA-C, 빈데신(vindesine), 미토마이신(mitomycin) C, 시스-플라티나(cis-platinum), 에토포시드(etoposide), 블레오마이신(bleomycin), 5-플루오로우라실(flourouracil)에서 선택될 수도 있다. 화학치료제의 실례에는 아드리아마이신(Adriamycin), 독소루비신(Doxorubicin), 5-플루오로우라실(Flourouracil), 시토신 아라비노시드(Cytosine arabinoside, Ara-C), 사이클로포스파마이드(Cyclophosphamide), 티오테파(Thiotepa), 탁소테레(Taxotere)(docetaxel), 부설판(Busulfan), 사이톡신(Cytoxin), 탁솔(Taxol), 메토틱렉세이트(Methotrexate), 시스플라틴(Cisplatin), 멜팔란(Melphalan), 빈블라스틴(Vinblastine), 블레오마이신(Bleomycin), 에토포시드(Etoposide), 이포스파마이드(Ifosfamide), 미토마이신(Mitomycin) C, 미톡산트론(Mitoxantrone), 빈크레이스틴(Vincristine), 비노렐빈(Vinorelbine), 카르보플라틴(Carboplatin), 테니포시드(Teniposide), 다우노마이신(Daunomycin), 카르미노마이신(Carminomycin), 아미노프테린(Aminopterin), 닥티노마이신(Dactinomycin), 미토마이신(Mitomycin), 에스페라마이신(Esperamicin)(참조: U.S. Patent No. 4,675,187), 멜팔란(Melphalan), 다른 관련된 질소 겨자(nitrogen mustard) 등이 포함된다.

[0389] 다른 구체예에서, 예로써, “CVB” (1.5 g/m² 사이클로포스파마이드, 200-400 mg/m² 에토포시드, 150-200 mg/m²

카르무스틴)가 본 발명의 복합 요법에 사용될 수 있다. CVB는 비-호지킨 림프종을 치료하는데 이용되는 처방이다(Patti et al., Eur. J. Haematol., 51:18 (1993)). 다른 적합한 복합 화학치료 처방은 당업자에게 널리 공지되어 있다(참조: Freedman et al., "Non-Hodgkin's lymphomas," in Cancer Medicine, Volume 2, 3rd Edition, Holland et al. (eds.), pp. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993)). 예시로써, 중간-등급 비-호지킨 림프종의 치료를 위한 1세대 화학치료 처방에는 C-MOPP(사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 프로카르바진, 프레드니손)와 CHOP(사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손)가 포함된다. 유용한 2세대 화학치료 처방은 m-BACOD(메토트렉세이트, 블레오마이신, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 텍사메타손, 레우코보린(leucovorin))이고, 적합한 3세대 처방은 MACOP-B(메토트렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 프레드니손, 블레오마이신, 레우코보린)이다. 다른 유용한 약제는 페닐 부티레이트(phenyl butyrate)와 브로스타틴(brostatin)-1이다. 바람직한 복수양식 요법에서, 화학치료제와 사이토킨 모두 본 발명에 따른 항체, 면역공액체 또는 융합 단백질과 공동-투여된다. 이들 사이토킨, 화학치료제와 항체, 면역공액체 또는 융합 단백질은 임의의 순서로, 또는 모두 함께 투여될 수 있다.

[0390] 본 발명의 면역공액체에 이용될 수 있는 다른 독소에는 유독성 렉틴(lectin); 식물성 독소, 예를 들면, 리신(ricin), 아브린(abrin), 모데신(modeccin), 보툴리나(botulina), 디프테리아 독소 등이 포함된다. 당연히, 다양한 독소의 조합 역시 하나의 항체 분자에 결합되어 다양한 세포독성을 도모할 수 있다. 본 발명의 복합 요법에 적절하게 이용되는 독소의 전형은 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNase I, 포도상구균 장독소(Staphylococcal enterotoxin)-A, 섬자리공(pokeweed) 항-바이러스 단백질, 젤로닌(gelonin), 디프테리아 독소(diphtherin toxin), 슈도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin), 슈도모나스 내독소(Pseudomonas endotoxin)이다(참조: Pastan et al., Cell, 47:641 (1986); Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994)). 이용될 수 있는 효소 활성 독소와 이의 단편에는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신(modeccin) A 사슬, 알파-사르진(alpha-sarcin), 유동(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 미국자리공(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, PAP-S), 모모르디카 차란티아(*Momordica charantia*) 저해물질, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotonin), 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 저해물질, 젤로닌(gelonin), 미토젤린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin), 트리코테센(tricothecene) 등이 포함된다(참조: 1993년 10월 28일자 공개된 WO 93/21232).

[0391] 적합한 독소와 화학치료제는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) 및 Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)에서 기술된다. 다른 적합한 독소 및/또는 화학치료제는 당분야에 널리 공지되어 있다.

[0392] 또한, 본 발명의 항-CD19 항체는 프로드러그(가령, 펩티딜 화학치료제, W081/01145 참조)를 활성 항암 약제로 전환시키는 프로드러그-활성화 효소(prodrug-activating enzyme)와 병용될 수 있다(참조: WO 88/07378과 U.S. Patent No. 4,975,278). 이런 조합의 효소 성분에는 프로드러그에 이런 방식으로 작용하여 상기 프로드러그를 활성 세포독성 형태로 전환시키는 효소가 포함된다. 본 명세서에서 "프로드러그(prodrug)"는 부모 약제에 비하여 종양 세포에 대한 세포독성이 덜하고 효소적으로 활성화되거나 더욱 강한 활성을 갖는 부모 형태로 전환될 수 있는 약제학적 활성 물질의 전구물질 또는 유도체 형태를 의미한다(참조: Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.) 5 pp. 247-267, Humana Press (1985)). 본 발명의 항-CD19 항체와 병용될 수 있는 프로드러그에는 더욱 강한 세포독성을 갖는 유리 약제로 전환될 수 있는 인산염-포함 프로드러그, 티오인산염-포함 프로드러그, 황산염-포함 프로드러그, 펩티드-포함 프로드러그, D-아미노산-변형된 프로드러그, 당화된 프로드러그, α-락탐-포함 프로드러그, 선택적으로 치환된 페녹시아세트아마이드-포함 프로드러그 또는 선택적으로 치환된 페닐 아세트아마이드-포함 프로드러그, 5-플루오로시토신과 다른 5-플루오로우리딘 프로드러그가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명에 유용한 프로드러그 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약제에는 앞서 기술된 화학치료제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0393] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법의 이용은 독성 요법의 연기를 가능하게 하고, 화학요법과 연관된 불필요한 부작용과 합병증 위험을 피하는데 도움이 되고, 화학요법에 대한 내성의 발생을 지연시킨다. 특정 구체예에서, 독성 요법 및/또는 독성 요법에 대한 내성은 본 발명의 조성물과 방법으로 치료된 환자에서 최대 6개월, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년 동안 지연된다.

[0394] 6.3. 치료 항체와의 조합

[0395] 본 명세서에 기술된 항-CD19 면역요법은 항-CD20 mAb, 항-CD52 mAb, 항-CD22 항체(CD22 항원과 항-CD22 항체에 대하여, 예로써, U.S. Patent No. 5,484,892; U.S. application serial number 10/371,797의 U.S. patent publication No. 2004/0001828; U.S. application serial number 10/372,481과 U.S. provisional application serial number 60/420,472의 U.S. patent publication No. 2003/0202975에 기술됨), 항-CD20 항체, 예를 들면, RITUXAN™(C2B8; RITUXIMAB™; Biogen Idee)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다른 항체와 조합으로 투여된다. 본 발명의 항체와 조합으로 이용되거나 본 발명의 조성물의 이용될 수 있는 치료 항체의 다른 실례에는 HERCEPTIN™(Trastuzumab; Genentech), MYLOTARG™(Gemtuzumab ozogamicin; Wyeth Pharmaceuticals), CAMPATH™(Alemtuzumab; Berlex), ZEVALIN™(Ipriumomab tiuxetan; Biogen Idee), BEXXAR™(Tositumomab; GlaxoSmithKline Corixa), ERBITUX™(Cetuximab; Imclone), AVASTIN™(Bevacizumab; Genentech)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0396] 특정 구체예에서, 항-CD19와 항-CD20 및/또는 항-CD22 mAb는 선택적으로, 임의의 적절한 비율로 동일한 약학적 조성물에서 담겨 제공될 수 있다. 예로써, 항-CD19와 항-CD20 항체의 비율은 대략 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 또는 1:1000 또는 그 이상의 비율일 수 있다. 유사하게, 항-CD19와 항-CD22 항체의 비율은 대략 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 또는 1:1000 또는 그 이상의 비율일 수 있다.

[0397] 6.4. 단핵구 또는 대식세포 기능을 강화시키는 조합 화합물

[0398] 본 발명의 방법의 특정 구체예에서, 단핵구 또는 대식세포 수 또는 기능(가령, 적어도 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상)을 강화시키는 화합물이 항-CD19 면역요법과 병용될 수 있다. 이들 화합물은 당분야에 공지되어 있는데, 여기에는 제한 없이, 인터루킨(가령, IL-12)과 같은 사이토킨 및 인터페론(가령, 알파 또는 감마 인터페론)이 포함된다.

[0399] 단핵구 또는 대식세포 기능 또는 증진을 강화시키는 화합물은 항체, 면역공액체 또는 항원-결합 단편과 동일한 약학적 조성물 내에서 제조될 수 있다. 개별적으로 투여되는 경우에, 항체/단편과 상기 화합물은 동시에(서로 수 시간 이내에) 투여되거나, 동일한 치료 과정 동안 투여되거나, 또는 순차적으로(즉, 환자는 먼저, 항체/단편 치료 과정을 받고, 이후 대식세포/단핵구 기능을 강화시키는 화합물 등의 과정을 받는다) 투여될 수 있다. 이런 구체예에서, 단핵구 또는 대식세포 기능을 강화시키는 화합물은 다른 치료 처방 및/또는 본 발명의 조성물로 치료에 앞서, 치료와 동시에, 또는 치료 이후에, 인간 개체에 투여된다. 한 구체예에서, 인간 개체는 인간에 대한 정상 범위의 혈액 백혈구, 단핵구, 호중구, 림프구 및/또는 호염기구 수를 보유한다. 인간 혈액 백혈구(전체)에 대한 정상 범위는 대략 $3.5-10.5(10^9/L)$ 이다. 인간 혈액 호중구에 대한 정상 범위는 대략 $1.7-7.0(10^9/L)$ 이고, 단핵구는 대략 $0.3-0.9(10^9/L)$ 이고, 림프구는 대략 $0.9-2.9(10^9/L)$, 호염구는 대략 $0-0.3(10^9/L)$ 이고, 호산구는 대략 $0.05-0.5(10^9/L)$ 이다. 다른 구체예에서, 인간 개체는 인간에 대한 정상 범위보다 낮은 혈액 백혈구 수, 예를 들면, 적어도 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 또는 $0.8(10^9/L)$ 개의 백혈구를 보유한다.

[0400] 본 발명의 이러한 구체예는 본 발명의 항체, 면역공액체 또는 항체 단편, 또는 당분야에 공지된 다른 항체로 수행될 수 있고, 항-CD19, 항-CD20 및/또는 항-CD22 항체 요법(가령, C2B8과 같은 기존 항체로 치료)에 내성을 보이는 개체, 현재 화학요법을 받고 있거나 이전에 받은 적이 있는 개체, B 세포 질환이 재발된 개체, 면역억화된 개체, 또는 대식세포 또는 단핵구 기능이 손상된 개체에 특히 적합하다. 치료에 내성이거나 B 세포 질환이 재발된 환자의 유병율(prevalence)은 적어도 부분적으로, 대식세포 또는 단핵구 기능의 손상에 기인한다. 따라서, 본 발명에서는 항-CD19 항체와 항원-결합 단편을 투여하는 방법과 공동으로 이용되는 ADCC 및/또는 대식세포 및/또는 단핵구 기능을 강화시키는 방법을 제시한다.

[0401] 6.5. 면역조절제와의 조합

[0402] 본 발명의 항-CD19 면역요법은 면역조절제와 병용될 수도 있다. 이런 접근법에서, 키메라 항체의 이용이 바람직

하다; 인간 또는 인간화 항-CD19 항체의 이용이 가장 바람직하다. 본 명세서에서, 복합 요법을 위한 “면역조절제(immunoregulatory agent)”는 호스트(host)의 면역계를 억제하거나, 감추거나, 또는 강화시키는 역할을 하는 물질을 의미한다. 여기에는 사이토킨 생산을 억제하거나, 자기-항원 발현을 하향조절 또는 억제하거나, 또는 MHC 항원을 감추는 물질이 포함된다. 이런 약제의 실례에는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘(참조: U.S. Pat. No. 4,665,077), 아자티오프린(azathioprine)(또는, 아자티오프린에 대한 부작용이 있는 경우에, 사이클로포스파마이드); 브로모크립틴(bromocriptine); 글루타르알데히드(glutaraldehyde)(이는 U.S. Pat. No. 4,120,649에 기술된 바와 같이, MHC 항원을 감춘다); MHC 항원과 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 사이클로스포린 A; 당질코르티코스테로이드(glucocorticosteroid), 예를 들면, 프레드니손(prednisone), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 스테로이드; 항-인터페론- γ , $-\beta$ 또는 $-\alpha$ 항체를 비롯한 사이토킨 또는 사이토킨 수용체 길항물질; 항-종양 괴사 인자- α 항체; 항-종양 괴사 인자- β 항체; 항-인터루킨-2 항체와 항-IL-2 수용체 항체; 항-L3T4 항체; 이중성 항-림프구 글로불린; 범(pan)-T 항체, 바람직하게는, 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 보유하는 가용성 펩티드(1990년 7월 26일자 공개된 WO 90/08187); 스트렙토키나아제(streptokinase); TGF- β ; 스트렙토도나제(streptodornase); 호스트로부터 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시시퍼구알린(deoxyspergualin); 라파마이신(rapamycin); T-세포 수용체(U.S. Pat. No. 5,114,721); T-세포 수용체 단편(Offner et al., Science 251:430-432 (1991); WO 90/11294; WO 91/01133); T-세포 수용체 항체(EP 340,109), 예를 들면, T10B9 등이다. 사이토킨의 실례에는 림포카인(lymphokine), 모노카인(monokine), 전통적인 폴리펩티드 호르몬이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이들 사이토킨에는 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 송아지 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone); 티록신(thyroxine); 인슐린(insulin); 프로인슐린(proinsulin); 렐락신(relaxin); 프로렐락신(prorelaxin); 여포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH), 갑상선 자극 호르몬(thyroid stimulating hormone, TSH), 황체화 호르몬(luteinizing hormone, LH)과 같은 당단백질 호르몬(glycoprotein hormone); 간 성장 인자(hepatic growth factor); 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor); 프롤락틴(prolactin); 태반 최유물질(placental lactogen); 종양 괴사 인자- α ; 뮐러리안(mullerian)-저해 물질; 생쥐 생식호르몬 연관된 펩티드; 인히빈(inhibin); 악티빈(activin); 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor); 인테그린(integrin); 트롬보포이오틴(thrombopoietin, TPO); NGF- α 와 같은 신경 성장 인자(nerve growth factor); 혈소판 성장 인자(platelet-growth factor); TGF- α 와 TGF- β 와 같은 전환 성장 인자(transforming growth factor, TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I과 -II; 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO); 골유도성 인자(osteoinductive factor); 인터페론; 대식세포-CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor, CSF); 과립구-대식세포-CgP(GM-CSF); 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15와 같은 인터루킨(IL); TNF- α 또는 TNF- β 와 같은 종양 괴사 인자; LIF와 키트 리간드(KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서, 사이토킨은 자연 공급원, 또는 재조합 세포 배양액과 고유 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물로로부터 단백질을 포괄한다. 특정 구체예에서, 이들 방법은 개체에 하나이상의 면역조절제, 바람직하게는, 사이토킨을 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 바람직한 사이토킨은 인터루킨-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, 트롬보포이에틴(thrombopoietin), γ 인터페론에서 선택된다.

[0403] 이들 면역조절제는 본 발명의 항-CD19 항체와 동일한 시점에 또는 별개의 시점에 투여되고, 당분야에서 설정된 용량과 동일하거나 이보다 적은 용량으로 이용된다. 바람직한 면역조절제는 치료되는 질환의 유형 및 환자의 병력을 비롯한 여러 인자에 좌우되지만, 사이클로스포린 A, 당질코르티코스테로이드(가장 바람직하게는, 프레드니손 또는 메틸프레드니솔론), OKT-3 단클론 항체, 아자티오프린, 브로모크립틴, 이중성 항-림프구 글로불린, 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 약제가 전반적으로 선호된다.

[0404] 6.6. 다른 치료제와의 조합

[0405] 종양 신생혈관구조(neovasculature)를 작용하는 약제 역시 항-CD19 면역요법과 병용될 수 있는데, 여기에는 콤브레스타틴(combrestatin) A4과 같은 튜불린(tubulin)-결합제(Griggs et al., Lancet Oncol. 2:82, (2001)) 및 안지오스타틴(angiostatin)과 엔도스타틴(endostatin)(Rosen, Oncologist 5:20, 2000)이 포함된다. 항-CD19 항체와의 병용에 적합한 면역조절인자(Immunomodulator)에는 α -인터페론, γ -인터페론, 종양 괴사 인자 알파(TNF α)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법을 이용한 복합 요법에 이용되는 치료제는 펩티드이다.

[0406] 특정 구체예에서, 항-CD19 면역요법은 하나이상의 칼리케아마이신(calicheamicin) 분자와 병용된다. 칼리케아마이신 계열의 항생제는 피코몰이하(sub-picomolar) 농도에서 이중-가닥 DNA 파괴를 유도할 수 있다. 이용되는 칼

리케아마이신의 구조 유사체에는 γ 11, γ 21, γ 31, N-아세트- γ 11, PSAG, 011이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

[0407] 대안으로, 본 발명의 항-CD19 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예로써, 재조합 기술 또는 펩티드 합성으로 만들어진다.

[0408] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 항체는 종양 선평적화(tumor pretargeting)에 이용되는 “수용체” (가령, 스트렙타비딘)에 공액되는데, 여기서 상기 길항물질-수용체 공액체가 환자에 투여되고, 이후, 결합되지 않은 공액체가 소거제(clearing agent)에 의해 순환계로부터 제거되고, 치료제(가령, 방사성뉴클레오타이드)에 공액된 “리간드” (가령, 비오틴)가 투여된다.

[0409] 특정 구체예에서, 치료 처방은 본 발명의 조성물의 항-CD19 항체의 세포독성 효과를 완화시키는 화합물을 포함한다. 이런 화합물에는 진통제(가령, 아세트아미노펜(acetaminophen)), 비스포스포네이트(bisphosphonates), 항히스타민제(가령, 클로로페닐아민 말레인산염(chlorpheniramine maleate)), 스테로이드(가령, 덱사메타손(dexamethasone), 레티노이드(retinoid), 델토이드(deltoid), 베타메타손(betamethasone), 코르티솔(Cortisol), 코르티손(cortisone), 프레드니손(prednisone), 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 미네랄로코르티코이드(mineralocorticoid), 에스트로겐(estrogen), 테스토스테론(testosterone), 프로제스틴(progestin))가 포함된다.

[0410] 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 면역요법과 조합으로 이용되는 치료제는 소형 분자(즉, 대략 2500 달톤(dalton) 이하의 분자량을 갖는 무기 또는 유기 화합물)이다. 가령, 소형 분자 라이브러리는 Specs and BioSpecs B.V.(Rijswijk, The Netherlands), Chembridge Corporation(San Diego, CA), Comgenex USA Inc.(Princeton, NJ), Maybridge Chemicals Ltd.(Cornwall PL34 OHW, United Kingdom)로부터 상업적으로 구입 가능하다.

[0411] 특정 구체예에서, 항-CD19 면역요법은 항균제와 조합으로 투여될 수 있다. 항균제의 무-제한적 실례는 세균 감염을 저해 및/또는 감소시키거나, 세균의 복제를 저해 및/또는 감소시키거나, 또는 세균의 다른 세포 또는 개체로의 확산을 저해 및/또는 감소시키는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 항체, 핵산 분자, 유기 분자, 무기 분자, 소형 분자이다. 항균제의 구체적인 실례에는 페니실린(penicillin), 세팔로스포린(cephalosporin), 이미페넴(imipenem), 악스트레남(axtreonam), 반코마이신(vancomycin), 사이클로세린(cycloserine), 바시트라신(bacitracin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 에리트로마이신(erythromycin), 클린다마이신(clindamycin), 테트라사이클린(tetracycline), 스트렙토마이신(streptomycin), 토브라마이신(tobramycin), 겐타마이신(gentamicin), 아미카신(amikacin), 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 트리메토프림(trimethoprim), 노르플록사신(norfloxacin), 리팜핀(rifampin), 폴리믹신(polymyxin), 암포테리신(amphotericin) B, 니스타틴(nystatin), 케토카나졸(ketocanazole), 이소니아지드(isoniazid), 메트로니다졸(metronidazole), 펜타미딘(pentamidine)과 같은 항생제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0412] 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 면역요법은 항-진균제와 조합으로 투여될 수 있다. 항-진균제의 구체적인 실례에는 아졸(azole) 약제(가령, 미코나졸(miconazole), 케토코나졸(ketoconazole)(NIZORAL), 카스포펑진 아세테이트(caspofungin acetate)(CANCID AS), 이미다졸(imidazole), 트리아졸(triazole)(가령, 플루코나졸(fluconazole)(DIFLUCAN)), 이트라코나졸(itraconazole) (SPORANOX)), 폴리엔(polyene)(가령, 니스타틴(nystatin), 암포테리신(amphotericin) B(FUNGIZONE), 암포테리신 B 액상 복합체("ABLC")(ABELCET), 암포테리신 B 콜로이드성 분산액("ABCD")(AMPHOTEC), 리포좀성 암포테리신 B(AMBISONE)), 요오드화칼륨(potassium iodide)(KI), 피리미딘(pyrimidine)(가령, 플루시토신(flucytosine)(ANCOBON)), 보리코나졸(voriconazole)(VFEND)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 항균제와 항진균제의 투여는 환자의 B 세포를 현저하게 고갈시키는 본 발명의 방법에서 발생할 수 있는 감염성 질환의 효과 또는 점증(escalation)을 완화시킬 수 있다.

[0413] 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 면역요법은 본 발명의 조성물의 투여에 동반되는 독성 부작용을 완화시키기 위하여 앞서 기술된 하나 이상의 약제와의 조합으로 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항-CD19 면역요법은 항체 투여, 화학요법, 독소, 또는 약물의 부작용을 완화시키기 위하여 이용되는, 당분야에 널리 공지된 하나 이상의 약제와의 조합으로 투여될 수 있다.

[0414] 다발성 골수종을 치료하기 위하여 본 발명의 항-CD19 면역요법이 투여되는 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 고용량 화학요법(멜팔란, 멜팔란/프레드니손(MP), 빈크리스틴/독소루비신/텍사메타손(VAD), 리포좀 독소루비신/빈크리스틴, 텍사메타손(DVd), 사이클로포스파마이드, 에토포시드/텍사메타손/시타라빈, 시스플라틴(EDAP)), 줄기 세포 이식물(가령, 자가 줄기 세포 이식(autologous stem cell transplantation) 또는 동종 줄기 세포 이식(allogeneic stem cell transplantation) 및/또는 미니-동종(mini-allogeneic)(비-골수형성(non-myeloablative)) 줄기 세포 이식), 방사선 요법(radiation therapy), 스테로이드(가령, 코르티코스테로이드, 텍사메타손, 탈리도마이드/텍사메타손, 프레드니손, 멜팔란/프레드니손), 지지 요법(supportive therapy)(가령, 비스포스포네이트, 성장 인자, 항생제, 정맥내 면역글로불린, 저-선량 방사선요법, 및/또는 정형외과 개입(orthopedic intervention)), THALOMID™(thalidomide, Celgene) 및/또는 VELCADE™(bortezomib, Millennium)과의 조합으로 또는 치료 처방으로 투여된다.

[0415] 본 발명의 항-CD19 면역요법이 다른 항체 및/또는 약제와의 조합으로 투여되는 본 발명의 구체예에서, 부가적인 항체 및/또는 약제가 본 발명의 항체의 투여에 상대적인 임의의 순서로 투여될 수 있다. 가령, 부가적인 항체 또는 항체는 본 발명의 항-CD19 항체 또는 면역공액체의 인간 개체에 투여에 앞서, 투여와 동시에 및/또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 이와 같은 부가적인 항체는 본 발명의 항체와 동일한 약학적 조성물 내에 존재하거나, 또는 상이한 약학적 조성물 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 항체의 용량과 투여 방식 및 부가적인 항체의 용량은 본 명세서에 기술되고 당분야에 널리 공지된 용량과 투여 방식의 임의의 교시에 따라, 동일하거나 상이할 수 있다.

[0416] 7. B 세포 악성종양의 진단에서 항-CD19 항체의 용도

[0417] 본 발명은 또한, 인간 CD19 항원에 면역특이적으로 결합하는 항-CD19 항체와 이의 조성물을 포함하는데, 상기 항-CD19 항체는 진단이나 검출가능 작용제에 공액된다. 바람직한 구체예에서, 항체는 인간 또는 인간화 항-CD19 항체이다. 이런 항-CD19 항체는 임상적 검사 절차, 예를 들면 특정 치료제의 효능을 결정하는 절차의 일부로서 B 세포 악성종양의 발생 또는 진행을 모니터하거나 예측하는데 이용될 수 있다. 이런 진단과 검출은 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase), 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 또는 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다양한 효소; 스트렙타비딘/비오틴과 아비딘/비오틴이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 보결분자족(prosthetic group); 움벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인(dichlorotriazinylamine fluorescein), 염화단실(dansyl chloride), 피코에리트린(phycoerythrin)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 형광 물질; 루미놀(luminol)이 포함되지만 이에 국한되지 않는 발광 물질; 루시페라제(luciferase), 루시페린(luciferin), 에퀘린(aequorin)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 생물발광 물질; 요오드(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 트리튬(³H), 인듐(¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 테크네튬(technetium)(⁹⁹Tc), 탈륨(thallium)(²⁰¹Tl), 갈륨(gallium)(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(palladium)(¹⁰³Pd), 몰리브덴(molybdenum)(⁹⁹Mo), 제논(xenon)(¹³³Xe), 플루오르(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, ¹¹⁷Tm이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 방사성 물질; 다양한 양성자 방출 단층촬영(positron emission tomography)에 이용되는 양전자 방출 금속(positron emitting metal), 비방사성 상자성 금속 이온(noradioactive paramagnetic metal ion), 방사성표지되거나 특정 방사성동위원소에 공액된 분자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 검출가능 물질에 인간 CD19 항원에 특이적으로 결합하는 항-CD19 항체를 연결함으로써 달성될 수 있다. 용이하게 측정될 수 있는 임의의 검출가능 라벨이 항-CD19 항체에 공액되고 B 세포 악성종양의 진단에 이용될 수 있다. 검출가능 물질은 당분야에 공지된 기술을 이용하여 항체에 직접적으로, 또는 중간물질(가령, 당분야에 공지된 링커)을 통하여 간접적으로 연결되거나 공액된다. 본 발명에 따른 진단제로서 이용을 위하여 항체에 공액될 수 있는 금속 이온은 U.S. Patent No. 4,741,900을 참조한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 진단이나 검출가능 작용제에 공액된 항-CD19 항체를 포함하는 진단 키트를 제시한다.

[0418] 8. 키트

[0419] 본 발명에서는 B 세포 악성종양, 또는 B 세포 악성종양에 의해 강화되거나 B 세포 악성종양을 강화시키는 B 세포 악성종양의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 완화를 위한 본 발명의 조성물로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제시한다.

[0420] 본 발명에서는 앞서-기술된 방법에 이용될 수 있는 키트를 제시한다. 한 구체예에서, 키트는 하나이상의 용기 내에 본 발명의 조성물을 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 하나이상의 용기 내에 본 발명의 조성물 및 하나 이상의 다른 용기 내에 B 세포 악성종양, 또는 B 세포 악성종양에 의해 강화되거나 B 세포 악성종양을 강화시키는 B 세포 악성종양의 하나이상의 증상의 예방, 관리 또는 치료에 유용한 하나이상의 다른 예방제 또는 치료제를 포함한다. 바람직하게는, 키트는 B 세포 악성종양을 예방, 치료, 관리 또는 완화하기 위한 사용설명서 및 투여 방법에 대한 부작용과 용량 정보를 더욱 포함한다. 선택적으로, 이들 용기에는 조제약 또는 생물학적 산물의 제조, 이용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지서가 첨부될 수 있는데, 이러한 통지서는 인간 투여용으로 제조, 이용 또는 판매에 관한 감독기관의 승인을 반영한다.

[0421] 실시예

[0422] 하기 실시예에서, 인간 CD19 지향된 면역요법을 평가하기 위하여 유전자도입 생쥐 모형을 이용하였다. 이들 테이터는 CD19 항원에 결합하고 ADCC를 매개하는 항체가 Fc γ R(바람직하게는, Fc γ RIII 또는 Fc γ RIV)을 발현하고 ADCC를 운반하는 작동체 세포를 보유하는 개체 내에서, 생체내 B 세포 고갈을 유도하는데 효과적이라는 것을 입증한다. 이들 항체는 생체내에서 B 세포의 지속적인 고갈을 유도하고, 특정 구체예에서, 순환계, 비장, 림프절로부터 거의 모든 B 세포를 제거하는데 이용될 수 있다. 놀랍게도, CD19 항원을 상대적으로 낮은 밀도로 발현하는 골수 B 세포와 이들의 전구체 역시 고갈된다. B 세포 고갈의 유효성은 항-CD19 항체가 인간 CD19의 어떤 영역에 결합하는 지에 의존하지 않지만 CD19 밀도(환자 샘플 내에서)의 영향을 받는다. B 세포 소거의 효율은 ADCC를 매개하는 항-CD19 항체의 능력과 상관한다. 항-CD19 항체를 이용한 B 세포 소거의 효율은 호스트 작동체 Fc γ R 발현/기능과도 상관한다.

[0423] 1. 재료와 방법

[0424] 본 명세서에 기술된 뮤린 HB12a와 HB12b 항-CD19 항체는 인간 CD19에 결합하는 항체의 전형이다. 이들 항체는 상기 섹션 “항-CD19 항체의 생성”에서 기술된 기술을 이용하여 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD19 항체를 제조하는데 이용될 수 있다. 인간 CD19 또는 이의 일부분에 대하여 HB12a와 HB12b 항체와 동일한 특이성을 갖는 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD19 항체가 본 발명의 조성물과 방법에 이용이 고려된다. 특히, HB12a 또는 HB12b와 동일하거나 유사한 중쇄 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역을 보유하는 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD19 항체가 본 발명의 조성물과 방법에 이용이 고려된다.

[0425] 1.1. 재료와 방법

[0426] 항체 생성과 서열 분석. HB12a와 HB12b 항체는 인간 CD19를 인코딩하는 cDNA로 형질감염된 생쥐 전구-B 세포주로 면역된 Balb/c 생쥐에서 산출하였다(Zhou et al., Mol Cell Biol, 14:3884-94 (1994)). 양쪽 항체는 1993년 11월 3-7에 보스턴에서 개최된 the Fifth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens에 제출되었다.

[0427] 중쇄 유전자 이용은 RNEASYMini Kit(QIAGEN, Valencia, CA)를 이용하여 1-5 x 10⁶개 하이브리도마 세포로부터 추출된 RNA를 이용하여 결정하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 INVITROGEN(Carlsbad, CA)으로부터 200 단위(unit)의 SUPERScript III역전사효소와 첫 번째 가닥 cDNA 합성 완충액, PROMEGA(Madison, WI)으로부터 20 ng 무작위 헥사머 프라이머(random hexamer primer)와 20 단위의 RNase 저해물질, Denville(Metuchen, NJ)로부터 80 nmole의 dNTP를 이용하여 2 μ g의 전체 RNA로부터 20 μ l 부피로 합성하였다. 중쇄(V_H) 유전자의 PCR 증폭을 위한 주형으로 1 μ l의 cDNA 용액을 이용하였다. PCR 반응은 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 5 mM NH₄Cl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 800 μ M dNTP(Denville), 400 pmol의 각 프라이머 및 10% pfu 교정(proofreading) 중합효소(Stratagene, LaJolla, CA)가 소량 추가된 2.5 U의 Taq DNA 중합효소(Invitrogen)로 구성되는 50- μ l 부피의 반응 혼합물 내에서 수행하였다. V_L의 경우, PCR 반응은 20 mM Tris-HCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 800 μ M dNTP(Denville), 400 pmol의 각 프라이머 및 10% pfu 교정(proofreading) 중합효소(Stratagene, LaJolla, CA)가 소량 추가된 2.5 U의 Taq DNA 중합효소(Invitrogen)로 구성되는 50- μ l 부피의 반응 혼합물 내에서 수행하였다. 3분 변성 단계이후, 32회 주기(1분간 94 $^{\circ}$ C, 1분간 58 $^{\circ}$ C, 1분간 72 $^{\circ}$ C)로 증폭하고, 이후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 신장하였다(Thermocycler, Perkin Elmer). 중쇄 cDNA는 기존 문헌(Kantor et al., J. Immunol., 158:1175-1186 (1997))에서 기술된 바와 같은 불규칙한 센스 5' V_H 프라이머(M₅V_HE; 5' GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G 3')(SEQ ID NO: 19) 및 C γ 코딩 영역에 상보적인 안티센스 프라이머(프라이머 C γ 1; 5' GAG TTC CAG GTC ACT GTC ACT GGC TCA GGG A 3')(SEQ ID NO:20)를 이용하여 증폭하였다.

- [0428] 경쇄 유전자 이용은 중쇄에서 기술된 바와 같이 추출된 세포질 RNA를 이용하여 결정하였다. 5' 가변 영역 뉴클레오티드 서열은 GeneRacer™ 키트(Invitrogen)를 이용하여 산출된 cDNA로부터 획득하였다. 전체 RNA는 송아지 장내 포스파타아제(calf intestinal phosphatase)로 탈인산화시켰다. 5' 캡 구조는 담배산 피로포스파타아제(tobacco acid pyrophosphatase)로 완전한 전장 mRNA로부터 제거하였다. 상기 mRNA가 cDNA로 역전사된 이후 GeneRacer PCR 프라이머에 대한 공지된 5' 증폭 부위(priming site)를 제공하는 T4 RNA 리가아제를 이용하여 GeneRacer RNA 올리고를 상기 mRNA의 5' 말단에 결합시켰다. 결합된 mRNA는 Superscript™ III RT와 GeneRacer 무작위 프라이머로 역전사시켰다. 첫 번째 가닥 cDNA는 GeneRacer 5' 프라이머(GeneRacer RNA 올리고에 상동함) 및 불변 영역 특이적인 안티센스 3' 프라이머(GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT TAA CTG)(SEQ ID NO:21)를 이용하여 증폭하였다. 터치다운(touchdown) PCR 증폭은 10% pfu 고정 중합효소(Stratagene)가 추가된 2.5 U의 Taq DNA 중합효소(Invitrogen)를 이용하여, Invitrogen에 의해 추천된 50- μ l 부피의 완충액 내에서 수행하였다. 2분 변성 단계이후, Taq와 pfu를 추가하고, 증폭은 3 단계로 수행하였다: 30초간 94℃, 60초간 72℃의 5회 주기; 30초간 94℃, 60초간 72℃의 5회 주기; 30초간 94℃, 30초간 65℃, 60초간 72℃의 20회 주기; 이후, 72℃에서 10분간 신장. 2.5 U의 Taq를 추가하고, 추가로 10분간 신장시켜 완전한 3' A-오버행(overhang)을 담보하였다. 증폭된 PCR 산물은 염기서열분석을 위하여 pCR4-TOPO 벡터 내로 클론하고 OneShotTOP10 적격 세포 내로 형질전환시켰다. 8개의 클론으로부터 DNA 삽입체(insert)는 중쇄에서 기술된 바와 같이, pCR4-TOPO 벡터 특이적인 "M13 전방"과 "M13 후방" 프라이머를 이용하여 각 mAb 경쇄를 염기서열분석하였다.
- [0429] 정제된 중쇄와 경쇄 PCR 산물은 경쇄에서 기술된 바와 같이, AmpliTaqDNA 중합효소 및 초기 PCR 증폭에 이용된 동일한 프라이머 또는 pCR4-TOPO 벡터 특이적인 프라이머로 Perkin Elmer Dye Terminator Sequencing 시스템을 이용한 증폭이후 ABI 377 PRISMDNA 염기서열분석기를 이용하여 양 방향으로 직접 염기서열분석하였다. HB12a와 HB12b 중쇄와 경쇄 영역은 센스와 안티센스 DNA 가닥 모두에서 완전하게염기서열분석하였다.
- [0430] 항체와 면역형광 분석(immunofluorescence analysis). 본 발명에 이용된 인간 CD19 항원에 결합하는 단클론 생쥐 항-CD19 항체는 HB12a(IgG1)와 HB12b(IgG1), FMC63(IgG2a, Chemicon International, Temecula, CA), B4(IgG1, Beckman Coulter, Miami, FL)(Nadler et al., J. Immunol, 131:244-250 (1983)), HD37 항체(Pezzutto et al., J. Immunol, 138:2793-2799 (1987))의 아이소타입 전환 변이체인 HD237(IgG2b, Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna, Austria, 1989) 등이다. 다른 항체에는 생쥐 CD19에 결합하는 단클론 생쥐 항-CD19 항체, MB19-1(IgA)(Sato et al., J. Immunol, 157:4371-4378 (1996)); 단클론 생쥐 CD20-특이적인 항체(Uchida et al., Intl. Immunol, 16:119-129 (2004)); B220 항체 RA3-6B2(DNAX Corp., Palo Alto, CA); Thy1.2 항체(CALTAG™ Laboratories, Burlingame, CA); CD5, CD43과 CD25 항체(BD PHARMINGEN™, Franklin Lakes, NJ) 등이 포함된다. 아이소타입-특이적인 항-생쥐 Ig 또는 IgM 항체는 Southern Biotechnology Associates, Inc.(Birmingham, AL)로부터 입수하였다.
- [0431] hCD19 cDNA (Tedder and Isaacs, J. Immunol, 143:712-717 (1989))로 형질감염된 생쥐 전구-B 세포주, 300.19(Alt et al., Cell, 27:381-388 (1981)), 또는 단일-세포 백혈구 현탁액은 확립된 방법(Zhou et al., Mol. Cell. Biol, 14:3884-3894 (1994))에 따라, 20-30분간 미리 결정된 최적 농도의 각 항체를 이용하여 얼음 위에서 염색하였다. 림프구의 전방과 측면 광 산란(light scatter) 속성을 갖는 세포는 FACSCAN또는 FACSCALIBUR유세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA) 상에서 분석하였다. 배경 염색(background staining)은 세포의 $\geq 98\%$ 을 배제하도록 배치된 관문(gate)을 보유하는 비반응성 대조 항체(CALT AG™ Laboratories, Burlingame, CA)를 이용하여 결정하였다. 검사된 각 샘플에서, 가능하다면, 단핵 세포의 전방과 측면 광 산란 속성을 갖는 만개의 세포를 분석하고, 형광 강도를 4-데케이드(four-decade) 대수 척도(log scale)로 표시하였다.
- [0432] 생쥐. 인간 CD19를 발현하는 유전자도입 생쥐(h19-1)와 이들의 야생형(WT) 한배 새끼는 기존 문헌(Zhou et al., Mol. Cell. Biol, 14:3884-3894 (1994))에서 기술된 바와 같이 생산하였다. TG-1 생쥐는 최초 h19-1 설립체(C57BL/6 x B6/SJL)로서부터 산출하고, 적어도 7세대 동안 C57BL/6 배경과 교잡하였다. TG-2 생쥐는 최초 h19-4 설립체(C57BL/6 x B6/SJL)로부터 산출하였다. 복수 세대의 역교잡(backcrossing)이후, TG-1^{+/+} 생쥐를 획득하였는데, 이의 B 세포는 인간 B 세포에서 관찰되는 밀도와 거의 동일한 세포 표면 밀도로 인간 CD19를 발현하였다. 인간 CD19를 발현하는 생쥐는 여러 연구에서 더욱 보고되고 모형으로서 이용되었다(Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11558-11562 (1995); Sato et al., J. Immunol, 157:4371-4378 (1996); Tedder et al., Immunity, 6:107-118 (1997); Sato et al., J. Immunol, 158:4662-4669 (1997); Sato et al., J. Immunol, 159:3278-3287 (1997); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13158-13162 (1997); Inaoki et al.J. Exp. Med., 186:1923-1931 (1997); Fujimoto et al., J.

Immunol, 162:7088-7094 (1999); Fujimoto et al., Immunity, 11:191-200 (1999); Satterthwaite et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97:6687-6692 (2000); Fujimoto et al., Immunity, 13:47-57 (2000); Sato et al., J. Immunol, 165:6635-6643 (2000); Zipfel et al., J. Immunol, 165:6872-6879 (2000); Qian et al., J. Immunol, 166:2412-2419 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol, 167:2469-2478 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol, 167:3190-3200 (2001); Fujimoto et al., J. Biol. Chem., 276:44820-44827 (2001); Fujimoto et al., J. Immunol, 168:5465-5476 (2002); Saito et al., J. Clin. Invest., 109:1453-1462 (2002); Yazawa et al., Blood, 102:1374-80 (2003); Shoham et al., J. Immunol, 171:4062-4072 (2003)). CD19-결핍(CD19^{-/-}) 생쥐와 이들의 WT 한배 새끼 역시 기존 문헌(Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995))에서 보고되었다. 유전자 도입 생쥐 내에서 인간 CD19의 발현은 내인성 생쥐 CD19 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌고(Sato et al., J. Immunol, 157:4371-4378 (1996); Sato et al., J. Immunol, 158:4662-4669 (1997)), 내인성 생쥐 CD19 발현의 이와 같은 감소와 관련된 가설 역시 평가되었다(Shoham et al., J. Immunol, 171 :4062-4072 (2003)). 인간 CD19를 발현하는 유전자도입 생쥐 내에서 CD19 발현의 밀도 역시 평가되었다(Sato et al., J. Immunol, 165:6635-6643 (2000)).

[0433] TG-1^{+/+} 생쥐는 Taconic Farms(Germantown, NY)로부터 FcR(Fc 수용체) 통상적인 γ 사슬(FcR γ)-결핍 생쥐(FcR γ ^{-/-}, B6.129P2-Fcergl^{tm1})와 교배하여 hCD19^{+/+} FcR γ ^{-/-}와 WT 한배 새끼를 산출하였다. c-Myc 도입유전자에 반접합성(hemizygous)인 생쥐(E μ -cMycTG, C57Bl/6J-TgN(IghMyc); The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)는 기존 문헌(Harris et al., J. Exp. Med., 167:353 (1988); Adams et al., Nature, 318:533 (1985))에서 기술되었다. c-MycTG 생쥐(B6/129 배경)는 hCD19TG-1^{+/+} 생쥐와 교배하여 PCR 스크리닝에 의한 측정에서, 반접합성 hCD19TG-1^{+/+} cMycTG^{+/+} 후손을 산출하였다. Rag1^{-/-} (B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J) 생쥐는 The Jackson Laboratory로부터 입수하였다. 대식세포-결합 생쥐는 표준 방법(Van Rooijen and Sanders, J. Immunol. Methods, 174:83-93 (1994))에 따라, -2, 1, 4일에 C57BL/6 생쥐 내로 클로드로네이트(clodronate)-캡슐화된 리포솜(0.1 ml/체중 10 gram; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)의 꼬리 정맥 주입으로 산출하였다. 모든 생쥐는 특정 병원균-없는 장벽 시설에서 사육하고 6-9주령 시점에 이용하였다.

[0434] ELISA. 혈청 Ig 농도는 기존 문헌(Engel et al., Immunity, 3:39 (1995))에서 기술된 바와 같이, 친화성-정제된 생쥐 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA(Southern Biotechnology Associates, Inc.)를 이용한 ELISA로 측정하여 표준 곡선(standard curve)을 산출하였다. dsDNA, ssDNA와 히스톤에 대한 혈청 IgM과 IgG 자기항체 수준은 기존 문헌(Sato et al., J. Immunol., 157:4371 (1996))에서 기술된 바와 같이, 송아지 흉선 이중-가닥(ds) DNA(Sigma-Aldrich), 끊어진 송아지 흉선 DNA(이는 단일-가닥(ss) DNA를 보유한다), 또는 히스톤(Sigma-Aldrich) 코팅된 마이크로역가 평판을 이용한 ELISA로 측정하였다.

[0435] 면역요법. 200 μ l 인산염-완충된 염수(PBS)에 담긴 무균 항-CD19와 비반응성 아이소타입 대조 항체(0.5-250 μ g)는 측면 꼬리 정맥을 통하여 주입하였다. 모든 실험에는 달리 명시하지 않는 경우에 250 μ g의 항체가 이용되었다. 혈액 백혈구 총수는 적혈구 용해(red cell lysis)이후 혈구계(hemocytometer)로 정량하고, B220⁺ B 세포 빈도수는 유세포분석과 함께, 면역형광 염색으로 측정하였다. 인간과 생쥐에서 항체 용량은 the Oncology Tool Dose Calculator(www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm)를 이용하여 비교하였다.

[0436] 면역접종(immunization). 21개월령 WT 생쥐는 염수에 담긴 50 μ g의 2,4,6-트리니트로페닐(TNP)-공액된 지질다당류(LPS)(Sigma, St. Louis, MO) 또는 25 μ g 2,4-디니트로페놀-공액된(DNP)-FICOLL(Biosearch Technologies, San Rafael, CA)로 i.p. 면역접종하였다. 생쥐는 또한, 완전 Freund 어쥬번트에 담긴 100 μ g의 DNP-공액된 키홀 림펫 헤모시아닌(DNP-KLH, CALBIOCHEMCorp., La Jolla, CA)로 i.p. 면역접종하고, 21일후, 불완전 Freund 어쥬번트에 담긴 DNP-KLH로 추가로 면역접종하였다. 생쥐는 지시된 바와 같은 면역접종 전후에 채혈하였다. 개별 항체 내에서 DNP- 또는 TNP-특이적인 항체 역가는 표준 방법(Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995))에 따라, DNP-BSA(CALBIOCHEMCorp., La Jolla, CA) 또는 TNP-BSA(Biosearch Technologies, San Rafael, CA)로 코팅된 ELISA 평판을 이용하여 중복 측정하였다. ELISA 분석을 위하여, TNP-LPS 면역접종된 생쥐로부터 혈청은 1:400 희석하고, DNP-FICOLL과 DNP-BSA 면역된 생쥐로부터 혈청은 1:1000 희석하였다.

[0437] 종양 연구. hCD19TG-1^{+/+} c-mycTG^{+/+} 생쥐로부터 자생적 림프절 종양은 분리하고 생체내에서 확장시켰다. 종양 세포(10⁵/생쥐)는 0일에 Rag^{-/-} 수용자 생쥐에 i.v. 주입하고, FMC63과 아이소타입-합치된 대조 mAb(250 μ g/ml)는

1일과 7일에 i.v. 주입하였다. 수용자 생쥐로부터 혈액 백혈구는 매주 분리하고, 순환 생쥐 CD19⁺ B220⁺ 세포의 총수는 유세포분석과 함께, 면역형광 염색으로 정량하였다.

[0438] 통계학적 분석. 모든 데이터는 표준± SEM으로 표시된다. 스튜던트 t-검증(Student's t-test)을 이용하여 샘플 평균간 차이의 유의성(significance)을 결정하였다.

[0439] 2. 실시예 1: 유전자도입 생쥐 내에서 인간 CD19 발현

[0440] 본 명세서에 기술된 유전자도입 hCD19TG 생쥐 또는 인간 CD19를 발현하는 다른 유전자도입 동물이 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD19 항체를 포함하는 상이한 치료 처방, 예를 들면, 투약 농도, 양, 시기에서 변화를 평가하는데 이용될 수 있다. 상이한 치료 처방의 인간 환자에서 효능은 아래에 기술된 2가지 지표, 다시 말하면, 특정 체액 내에서 B 세포 고갈 및/또는 조직 및 B 세포에 결합하는 단클론 인간 또는 인간화 항-CD19 항체의 능력을 이용하여 예측할 수 있다. 특정 구체예에서, 인간에서 B 세포 악성종양을 치료하기 위하여, 인간 CD19 유전자도입 생쥐에서 효과적인 치료 처방이 본 발명의 조성물과 방법과 병용될 수 있다.

[0441] 인간 CD19가 인간 CD19 도입유전자를 발현하는 유전자도입 생쥐(반접합성 TG-1^{+/-})로부터 B 세포에서 발현되는 지를 결정하기 위하여, 이들 생쥐의 골수, 혈액, 비장, 복막 세척액(peritoneal lavage)으로부터 B 세포를 추출하였다. 이들 세포 내에서 인간 CD19와 생쥐 CD19 발현은 CD19에 결합하는 생쥐 단클론 항-CD19 항체와 이들 세포를 접촉시킴으로써 평가하였다. B 계열 세포에 항체의 결합은 유세포분석과 함께, 이색 면역형광 염색(two-color immunofluorescence staining)을 이용하여 검출하였다.

[0442] 결과는 도 1A에서, 골수(BM), 혈액, 비장, 복막 세척액(PL)에 대한 인간 CD19(hCD19)의 검출된 발현(y-축)에 대하여 구획된 무린 CD19(mCD19)의 검출된 발현(x-축)의 그래프로 도시된다. 축 단위는 왼쪽 아래에서 1부터 4 데케이드 대수 척도를 나타낸다. 인간 CD19에 결합하는 B4 항-CD19 항체(Beckman/Coulter)는 인간 CD19 발현을 가시화하는데 이용하고, 생쥐 CD19에 결합하는 1D3 CD19 항체(PharMingen)는 생쥐 CD19 발현을 가시화하는데 이용하였다(도 1B와 1C에서 동일하게 이용됨). 인간 CD19 발현은 인간 B 세포 발생동안 점진적으로 증가하는 반면, 무린 CD19는 생쥐 골수 B 세포 발생동안 높은 수준에서 발현된다. 도 1A에서는 인간 CD19 발현이 혈액, 비장, 복막 세척액(PL) 내에서 관찰되는 말초 B 세포 상에서 생쥐 CD19 발현에 필적한다는 것을 보여주는데, 이는 생쥐 항-hCD19 항체(인간 CD19에 결합)가 말초 B 세포 개체군에 결합한다는 것을 입증한다. 이에 더하여, 골수(BM) 유래된 B 세포의 소규모 개체군은 내인성 생쥐 CD19를 발현하지만 인간 CD19를 발현하지 않는다(인간 CD19에 결합하는 단클론 생쥐 항-CD19 항체). 따라서, 골수 B 세포는 반접합성 TG-1^{+/-} 생쥐에서 2가지 종류: hCD19⁺mCD19⁺인 성숙한 B 계열 세포 및 단순히, mCD19⁺인 덜 성숙한 B 계열 세포로 구분된다(도 1A). 이들 결과는 유전자도입 생쥐에서 인간 CD19 발현이 B 세포 성숙과 상관한다고 지적한 Zhou et al. (Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994))의 연구 결과와 일치한다. 혈액, 비장, 복강 내에 모든 성숙 B 세포는 hCD19⁺와 mCD19⁺ 양쪽 모두였다.

[0443] 각각, 평균 형광 강도(hCD19의 경우에 생쥐 항-CD19 및 mCD19의 경우에 생쥐 항-CD19)를 측정함으로써 평가된, mCD19와 hCD19의 상대적 발현 수준은 도 1B에 도시된다. hCD19 도입유전자에 동형접합성 TG-1^{+/+} 생쥐(TG-1^{+/+}) 중 에서, 혈액 유래된 B 세포 상에서 hCD19 발현은 인간 B 세포 상에서 hCD19 발현과 비교하였다. TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, TG-2^{+/+} 유전자도입 생쥐 세포주 내에서 hCD19와 mCD19 발현의 상대적 밀도를 비교하기 위하여, 앞서 기술된 바와 같이, 혈액 유래된 B 세포를 추출하고 CD19 발현을 분석하였다. 이들 결과는 도 1B에서, hCD19TG 생쥐로부터 인간 혈액 B 세포, TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, TG-2^{+/+} 혈액 B 세포에 대한 인간 CD19 발현 비율(왼쪽) 및 hCD19TG 생쥐로부터 야생형(WT) 생쥐 혈액 B 세포, TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, TG-2^{+/+} CD19⁺ 혈액 B 세포에 대한 생쥐 CD19 발현 비율(오른쪽)을 보여주는 히스토그램으로 도시된다. 수치(평균 형광 강도의 선형 수치)는 인간 또는 야생형(WT) 생쥐로부터 혈액 B 세포(100%로 표시됨)와 비교하여, CD19 발현의 평균 상대적 밀도(± SEM)를 나타낸다. 이들 결과는 동형접합성 TG-1^{+/+} 생쥐 내에서 혈액 B 세포가 평균 형광 밀도에 의한 측정에서, 인간 혈액 B 세포보다 대략 72% 높은 밀도로 hCD19를 발현한다는 것을 입증한다. TG-1^{+/-} 생쥐 내에서 혈액 B 세포는 인간 혈액 B 세포에서와 유사한 밀도로 hCD19를 발현하는 반면, TG-2^{+/+} 생쥐 내에서 혈액 B 세포는 인간 혈액 B 세포보다 65% 낮은 밀도로 hCD19를 발현하였다.

- [0444] TG-1^{+/-} 생쥐 조직으로부터 B 세포 내에서 hCD19와 mCD19 발현의 상대적 밀도의 추가적인 비교는 도 1C에서, hCD19(왼쪽)와 mCD19(오른쪽)에 대한 골수, 혈액, 비장, 림프절, PL로부터 B 세포의 항-CD19 항체 염색의 평균 형광 강도(MFI ± SEM)를 보여주는 히스토그램으로 도시된다. 이들 결과는 TG-1^{+/-} 생쥐에서 hCD19가 골수(인간 혈액 수준의 63%) < 혈액(100%) < 비장(121%) = 림프절(120%) < 복강(177%) 내에서 B220⁺ 세포에 의해 증가된 수준으로 발현된다는 것을 입증한다. 인간 CD19 발현은 mCD19 발현에 경미한 영향을 주었다. hCD19와 mCD19에 대한 mRNA의 수준은 변하지 않았다.
- [0445] IgG1(HB12a, HB12b, B4), IgG2a(FMC63), IgG2b(HD237) 아이소타입의 생쥐 항-hCD19 항체(인간 CD19에 결합)가 상이하게 반응하는 지를 결정하기 위하여, 혈액과 비장 B220⁺ B 세포를 TG-1^{+/-} 생쥐로부터 분리하였다. 분리된 세포는 시험관내에서 앞서 언급된 항-CD19 항체와 접촉시키고, 유세포분석과 함께, 아이소타입-특이적인 PE-공액된 이차 항체를 이용하여 가시화된 단클론 항체 염색으로 인간 CD19를 발현하는 유전자도입 생쥐(hCD19TG) B 세포에 결합하는 능력을 평가하였다.
- [0446] 이들 결과는 도 1D에서, 형광 강도(x-축) vs. 5 µg/ml에서, IgG2b(무린 아이소타입), IgG2a(무린 아이소타입), IgG1(무린 아이소타입) 항-CD19 항체에 대한 상대적인 B 세포 수(y-축)의 그래프로 도시된다. 항-CD19 항체로 염색된 B220⁺ 세포의 형광 강도는 실선으로 표시되고, 아이소타입-합치된 대조(CTL)의 형광 강도는 점선으로 표시된다. 각 항체는 5 µg/ml 농도에서, 비장 B 세포와 반응성(reactivity)의 포화 수준에 도달하였다. 이들 결과는 TG-1^{+/-} 생쥐로부터 생쥐 혈액과 비장 B220⁺ B 세포 상에서 항-CD19 항체 결합 밀도가 검사된 항체 아이소타입 및 혈액과 비장 B 세포 모두에서 균등하다는 것을 입증한다.
- [0447] 평균 형광 강도가 항-CD19 항체 아이소타입과 독립적인 지를 결정하기 위하여, 개별 항-CD19 항체(5 µg/ml에서)의 결합 활성은 hCD19 cDNA로 형질감염된 생쥐 전구-B 세포주, 300.19를 동일한 항-생쥐 Ig 이차 항체를 이용하여 염색함으로써 평가하였다. 항체 염색(MFI ± SEM)은 유세포분석과 함께, 생쥐 Ig-특이적인 PE-공액된 이차 항체를 이용하여 가시화시켰다. 이들 결과는 도 1E에서, HB12a, HB12b, B4, FMC63, HD237 항-CD19 항체 및 대조 항체(CTL)에 대하여 hCD19 cDNA-형질감염된 300.19 세포에 항-CD19 항체 결합(염색 강도에 의해 표시됨, y-축)의 히스토그램으로 도시된다. 각 항체는 항-CD19 항체 아이소타입과 독립적인 특징적인 평균 형광 강도를 갖는 세포를 염색하였는데, HB12b가 가장 낮은 수준의 염색을 보이고 HD237이 가장 높은 수준의 염색을 보였다. 따라서, 도시된 이들 결과는 300.19 세포가 시험관내에서, CD19에 결합하는 항-CD19 항체의 능력을 비교하기 위한 시험관내 모형 시스템을 입증한다.
- [0448] 따라서, 종합하면, 도 1에 도시된 결과는 hCD19TG 생쥐와 300.19 세포가 hCD19가 일정 범위 이상의 밀도로 발현될 때 B 세포에 결합하는 항-hCD19 항체의 능력을 평가하는데 적합한 시험관내와 생체내 모형 시스템을 대표한다는 것을 입증한다. 도 1A-D에서는 각 유전형(genotype)의 > 3마리 생쥐로 획득된 결과를 나타낸다.
- [0449] **3. 실시예 2: 생체내에서 B 세포의 항-CD19 항체 고갈**
- [0450] 생쥐 항-CD19 항체(인간 CD19에 결합)는 생체내에서 hCD19TG(TG-1^{+/-}) 혈액, 비장, 림프절 B 세포를 고갈시키는 능력을 평가하였다. 각 항체는 인간의 항-CD20 요법에서 주로 4회 제공되는 375 mg/m² 용량보다 10 내지 50-배 적은 250 또는 50 µg/생쥐의 단일 용량으로 생쥐에 주입하였다(Maloney et al., J. Clin. Oncol, 15:3266-74(1997); McLaughlin et al., 12:1763-9 (1998)).
- [0451] 이들 결과는 도 2A에서, HB12a, HB12b, 또는 FMC63 항-CD19 항체 또는 대조로 CD19 또는 아이소타입-합치된 대조(CTL) 치료이후 7일 시점에 B 세포량의 플랏(plot)으로 도시된다. 각 항-CD19 항체에서 림프절, 비장, 혈액 조직에 대하여 별개의 곡선이 제공된다. 각 플랏에 도시된, 7일 시점에 고갈된 관문 림프구(gated lymphocyte)의 비율은 유세포분석과 함께 면역형광 염색으로 측정된, TG-1^{+/-} 생쥐의 혈액, 비장, 림프절로부터 전형적인 B 세포 고갈을 입증한다. 도 2B에서는 항-CD19(단원 원) 또는 아이소타입-대조(열린 원) 항체로 치료이후 B220⁺ 혈액 B 세포의 평균 수(± SEM/ml)를 도시한다. 0시 이후에 도시된 수치는 1시 시점에 획득된 데이터를 나타낸다. 도 2C와 도 2D에서는 지정된 용량에서 항-CD19(채워진 막대) 또는 대조(빈 막대) 항체로 TG-1^{+/-} 생쥐의 치료이후, 각각 비장과 림프절 B 세포 총수(± SEM)를 도시한다. 도 2B-D에서, 대조와 비교하여 항-CD19 또는 아이소타입-대조 항체 치료된 생쥐(데이터 포인트(data point)마다 > 3마리 생쥐)에 대한 평균 결과 사이의 유의한 차이(significant difference)는 지시된다; *p<0.05, **p<0.01. 각 항체는 1시간 치료 이내에 대부분의 순

환 B 세포를 고갈시켰고(도 2B), 7일까지 비장과 림프절 B 세포 빈도수(도 2A)와 총수(도 2C-D)에 고갈 효과를 발휘하였다. HB12a 항체는 7일까지 98%의 혈액 B 세포 및 90-95%의 비장과 림프절 B 세포를 고갈시켰다. 유사하게, HB12b, B4, FMC63, HD237 항체는 각각, 99%, 96%, 99%, 97%의 혈액 B 세포를 고갈시켰다. HB12b, B4, FMC63, HD237 항체는 각각, 88-93%, 64-85%, 72-95%, 88-90%의 비장과 림프절 B 세포를 고갈시켰다. 극소의 남아있는 말초 B 세포는 주로, 골수로부터 잠재적으로 이주하는 표현형에서 미성숙한 세포를 나타냈다. CD19 항체 중에서 어느 것도 WT 생쥐에 제공될 때 현저한 효과를 나타내지 않았고, 동일한 조건 하에 제공된 아이소타입-합치된 대조 항체는 B 세포 총수에 영향을 주지 않았다(도 2 A-D). 따라서, 항-hCD19 항체는 7일까지 hCD19TG 생쥐의 순환계, 비장, 림프절로부터 B 세포를 효과적으로 고갈시켰다. TG-1^{+/-} 생쥐 내에서 B 세포 고갈의 요약은 표 1에 제공된다.

표 1

조직	B 부분집합 ^a	대조 mAb ^b	CD19 mAb	고갈 %
BM:	B220 ⁺	3.41 ± 0.57(11)	0.82 ± 0.13(11)	76**
	프로-B	0.75 ± 0.1(5)	0.97 ± 0.22(5)	0
	전구-B	1.74 ± 0.58(5)	0.10 ± 0.01(5)	94**
	미성숙	0.70 ± 0.16(5)	0.04 ± 0.01(5)	93**
	성숙	0.86 ± 0.14(5)	0.004 ± 0.0004(5)	99**
혈액:	B220 ⁺	0.82 ± 0.14(11)	0.004 ± 0.0006(11)	99**
비장:	B220 ⁺	25.2 ± 2.2(11)	1.7 ± 0.2(11)	93**
LN:	B220 ⁺	0.89 ± 0.11(11)	0.06 ± 0.01(11)	93**
복막:	B220 ⁺	1.16 ± 0.11(11)	0.37 ± 0.03(11)	68**
	B1a	0.86 ± 0.12(5)	0.31 ± 0.06(5)	61**
	B2	0.34 ± 0.06(5)	0.08 ± 0.02(5)	73**

^aB 세포 부분집합은 골수(BM) 프로-B(CD43⁺IgM⁻B220^{lo}), 전구-B(CD43⁻IgM⁻B220^{lo}), 미성숙 B(IgM⁺B220^{lo}), 성숙 B(IgM⁺B220^{hi}); 복막 B1a(CD5⁺B220^{lo}), B2(CD5⁻β 220^{hi})이었다.

^b수치(± SEM)는 항체 치료(250 μg)이후 7일 시점에 생쥐 내에 존재하는 세포 수(x 10⁻⁶)를 지시한다. BM 수치는 양측 대퇴부에 대한 수치이다. 혈액 수치는 per/ml이다. LN 수치는 양측 서혜(inguinal)와 겨드랑이 림프절(axillary node)에 대한 수치이다. 생쥐 숫자는 괄호 안에 지시된다. 평균간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; *p<0.05, **p<0.01.

3.1. 골수 B 세포의 고갈

공지된 항-CD19 항체는 이런 항체가 다양한 체액과 조직으로부터 B 세포를 고갈시키는데 효과적인 지를 결정하기 위하여 hCD19TG 생쥐에서 검사하였다. 본 명세서에 기술된 측정법을 이용하여 다른 항-CD19 항체, 예를 들면, 인간 CD19 항원의 특정한 부분에 결합하는 항-CD19 항체가 B 세포를 효과적으로 고갈시키는 지를 결정할 수 있다. B 세포를 고갈시킬 수 있는 것으로 확인된 항-CD19 항체를 이용한 결과는 인간에서 이용과 상관될 수 있다. 확인된 항체의 특성을 보유하는 항체는 인간에서 B 세포 악성종양의 치료를 위하여 본 발명의 조성물과 방법에 이용될 수 있다. 도 3A-3F에서는 CD19 항체 치료이후 골수 B 세포 고갈을 도시한다.

도 3A에서는 형광 강도(x-축) vs. 림프구의 전방-과 측면-산란 특성을 갖는 세포의 유세포분석(flow cytometry analysis)에서 4색 면역형광 염색으로 평가된, TG-1^{+/-} 골수 B 세포 부차집단에 의한 hCD19와 mCD19 발현에 대한 상대적 B 세포 수(y-축)의 그래프를 도시한다. 프로-B 세포는 CD43⁺IgM⁻B220^{lo}로서 한정되었고, 전구-B 세포는 CD43⁻IgM⁻B220^{lo}로서 한정되었고, 미성숙 B 세포는 IgM⁺B220^{lo}로서 한정되었고, 성숙 B 세포는 IgM⁺B220^{hi}로서 한정되었다. 막대그래프(오른쪽)는 각 B 세포 부분집합(≥ 3마리 생쥐/데이터 포인트)에 의한 CD19 발현의 상대적인 평균 MFI(± SEM) 수치를 보여준다. hCD19TG 생쥐(도 1A)에서처럼, CD19 발현은 인간에서 이중성인데, 그 이

유는 B 세포가 성숙하면 골수를 빠져나가기 때문이다. 단지 소량의 프로-B 세포(20%, $CD43^{hi} IgM^{-} B220^{lo}$)만 $TG-1^{+/-}$ 생쥐에서 hCD19를 발현하는 반면, 대부분의 전구-B 세포는 $hCD19^{+}$ 이고, 골수 내에서 대부분의 성숙 B 세포는 hCD19를 상대적으로 높은 수준으로 발현하였다. 프로-B 세포의 절반 정도(55%, $IgM^{-} B220^{+}$)가 $TG-1^{+/-}$ 생쥐에서 mCD19를 발현하는 반면, mCD19는 골수 내에서 대부분의 전구-B 세포와 성숙 B 세포에 의해 상대적으로 높은 수준으로 발현되었다.

[0458] 도 3B에서는 유세포분석에서 2색 면역형광 염색으로 평가된 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μg) 치료이후 7일 시점에, hCD19TG 생쥐에서 $hCD19^{+}$ 세포의 고갈을 도시한다. 숫자는 지정된 관문 내에서 세포의 상대적인 빈도수를 나타낸다. 결과는 각 생쥐 유전형의 한배 새끼 3쌍으로 획득된 결과를 나타낸다. CD19 항체 치료이후, $TG-1^{+/+}$, $TG-1^{+/-}$, $TG-2^{+/+}$ 생쥐의 골수 내에서 $hCD19^{+}$ 세포의 상당수가 250 μg /생쥐로 제공된 FMC63 항체에 의해 고갈되었다.

[0459] 도 3C에서는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 항-CD19 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μg) 치료이후 7일 시점에 골수에서 전형적인 $B220^{+}$ B 세포 고갈을 도시한다. 막대그래프 수치는 항체 치료된 생쥐의 양측 대퇴부 내에 $B220^{+}$ 세포의 총수(\pm SEM)를 나타낸다. 샘플 평균(\geq 3마리 생쥐/군)간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 예상치 않게, 검출되지 않은 만큼 낮은 수준으로 hCD19를 발현하는 대량의 mCD19⁺ 전구-B 세포 역시 골수로부터 고갈되었다. 이와 일목상통하게, FMC63, HB12a, HB12b, B4, HD237 항체는 대부분의 골수 $B220^{+}$ 세포를 고갈시켰다.

[0460] 도 3D에서는 3색 면역형광 염색으로 평가된, $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μg) 치료이후 7일 시점에 전형적인 골수 B 세포 부분집합 고갈을 도시한다. $IgM^{-} B220^{lo}$ 프로-/전구-B 세포는 CD43 발현에 기초하여 더욱 세분화되었다(아래쪽 패널). 도 3E에서는 2색 면역형광 염색으로 평가된, hCD19TG 생쥐 세포주의 FMC63 또는 아이소타입-합치된 대조 항체(250 μg) 치료이후 7일 시점에, 골수의 $CD25^{+} B220^{lo}$ 전구-B 세포의 전형적인 고갈을 도시한다. 결과는 관문이 동일하지 않도록 상이한 일자에서 수행된 실험으로 산출된다. 개별 골수 부차집단을 분석하는 경우에, 대부분의 $CD43^{hi} IgM^{-} B220^{lo}$ 프로-B 세포(도 3D)는 $TG-1^{+/+}$, $TG-1^{+/-}$ 또는 $TG-2^{+/+}$ 생쥐 내에서 FMC63 항체 치료에 의해 영향을 받지 않는 반면, 대부분의 $CD25^{+} CD43^{lo} IgM^{-} B220^{lo}$ 전구-B 세포(도 3E)가 고갈되었다. 도 3F에서는 ≥ 3 의 한배 새끼 쌍(littermate pair)의 FMC63(단한 막대) 또는 대조(열린 막대) 항체 치료이후 7일 시점에, 양측 대퇴골(bilateral femur) 내에서 프로-B, 전구-B, 미성숙, 성숙 B 세포의 총수(\pm SEM)를 나타내는 막대를 도시한다. 이들 결과는 대부분의 미성숙과 성숙 B 세포 역시 $TG-1^{+/+}$, $TG-1^{+/-}$ 또는 $TG-2^{+/+}$ 생쥐의 골수 내에서 고갈된다는 것을 입증한다. 따라서, hCD19를 낮은 수준으로 발현하는 전구-B 세포를 비롯한 대부분의 hCD19⁺ 세포는 CD19 항체 치료에 의해 골수로부터 고갈된다.

[0461] 3.2. 복막 B 세포의 고갈

[0462] $TG-1^{+/-}$ 생쥐 내에서 복강 B 세포는 일차적으로, 통상적인($B2$) B 세포의 $CD5^{+} IgM^{lo} B220^{hi}$ 부분집합보다 대략 25% 높은 밀도로 hCD19를 발현하는 $CD5^{+} IgM^{hi} B220^{lo}$ B1 세포의 존재로 인하여, 다른 조직 B 세포(도 1A와 도 1C)보다 높은 수준으로 hCD19를 발현한다(도 4A). 도 4B-4C에서는 복강 B 세포가 항-CD19 항체 치료에 민감하다는 것을 입증한다.

[0463] 도 4A에서는 인간과 생쥐 CD19 발현(x-축) vs. 복강 $CD5^{+} B220^{+}$ B1a와 $CD5^{-} B220^{hi}$ B2(통상적인) B 세포의 상대적 수의 플랏을 도시한다. 복강 림프구의 단일-세포 현탁액은 유세포분석과 함께 3색 면역형광 염색으로 검사하였다. 막대그래프는 $TG-1^{+/-}$ 생쥐의 한배 새끼 3쌍에 의한 CD19 발현에 대한 평균 MFI(\pm SEM) 수치를 나타낸다. 도 4B에서는 CD19(250 μg 에서 HB12a, HB12b, FMC63; 50 μg 에서 B4와 HD237) 항체 또는 대조 항체(250 μg)로 치료된 $TG-1^{+/-}$ 생쥐로부터 복강 $B220^{+}$ 세포의 고갈을 도시한다. 숫자는 7일에, 지정된 관문 내에서 $B220^{+}$ 세포의 상대적인 빈도수를 나타낸다. 막대그래프 수치는 항체 치료된 생쥐(\geq 3마리 생쥐/군)의 복막 내에 $B220^{+}$ 세포의 총수(\pm SEM)를 나타낸다. 샘플간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 이들 결과는

250 μg /생쥐에서 항-CD19 항체 치료가 7일까지 복막 B220⁺ B 세포의 상당 부분을 고갈시킨다는 것을 입증한다. 도 4B에 도시된 결과는 B1과 통상적 B2 세포 모두의 고갈에 의해 부분적으로 설명된다. hCD19가 TG-1^{+/+} 생쥐에서 최대 밀도로 발현되는 경우에, 대부분의 B1과 B2 세포가 고갈되었다. 하지만, B1과 B2 세포의 CD19-매개된 고갈은 hCD19 수준이 낮은 TG-1^{+/-}과 TG-2^{+/+} 생쥐에서 덜 효율적이었다. 따라서, 비록 복막 B 세포가 비장과 림프절 B 세포보다 항-CD19 항체-매개된 고갈에 더욱 저항하긴 하지만, CD19 항체 치료는 평균 형광 강도를 이용한 평가에서 CD19 발현의 밀도에 따라 복막 B1과 B2 세포를 고갈시켰다.

[0464] 도 4C에서는 hCD19TG 생쥐의 항-CD19 항체 또는 대조 항체 치료이후 7일 시점에, CD5⁺B220⁺ B1a와 CD5⁻B220^{hi} B2 B 세포의 전형적인 고갈을 도시한다. 숫자는 지정된 관문 내에서 각 B 세포 부분집합의 상대적인 빈도수를 나타낸다. 막대그래프 수치는 항체 치료된 생쥐(≥ 3 마리 생쥐/군)의 복막 내에 각 세포 부분집합의 총수(\pm SEM)를 나타낸다. 샘플간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; *p<0.05, **p<0.01.

[0465] 3.3. 상이한 항-CD19 항체가 B 세포 소거를 매개한다

[0466] HB12a와 HB12b 항-CD19 항체가 공지된 항-CD19 항체와 별개인 지를 결정하기 위하여, 본 발명에 이용된 각 항-CD19 항체 가변 영역의 아미노산 서열을 분석하였다(도 5A와 5B, 6A와 6B, 7A와 7B).

[0467] 도 5A에서는 HB12a 항-CD19 항체의 중쇄 V_H-D-J_H 접합 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO:1) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO:2) 서열을 도시한다. 5' PCR 프라이머와 겹쳐지는 서열은 이중선으로 지시되고 실제 DNA 서열과 상이한데, 그 이유는 중복 프라이머(redundant primer)가 이용되기 때문이다. V, D, J 서열 사이에 대략의 접합 경계(junctional border)는 수직 막대(|)로 서열 내에 지정된다. 아래쪽 문자 내에 뉴클레오티드는 접합 경계, 또는 체세포 극돌연변이(somatic hypermutation)에 대한 잠재적 부위에서 뉴클레오티드 부가를 지시한다. 항체(E)의 아미노-말단 잔기는 잔기 1로서 표기된다.

[0468] 도 5B에서는 HB12b 항-CD19 항체의 중쇄 V_H-D-J_H 접합 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO:3) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO:4) 서열을 도시한다. 5' PCR 프라이머와 겹쳐지는 서열은 이중선으로 지시되고 실제 DNA 서열과 상이한데, 그 이유는 중복 프라이머(redundant primer)가 이용되기 때문이다. V, D, J 서열 사이에 대략의 접합 경계(junctional border)는 수직 막대(|)로 서열 내에 지정된다. 아래쪽 문자 내에 뉴클레오티드는 접합 경계, 또는 체세포 극돌연변이(somatic hypermutation)에 대한 잠재적 부위에서 뉴클레오티드 부가를 지시한다. 항체(E)의 아미노-말단 잔기는 잔기 1로서 표기된다.

[0469] 도 6A에서는 HB12a 항-CD19 항체의 경쇄 서열 V_K-J_K에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO: 15) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO: 16) 서열을 도시한다. 도 6B에서는 HB12b 항-CD19 항체의 경쇄 V-J 접합 서열에 대한 뉴클레오티드(SEQ ID NO: 17) 및 예측된 아미노산(SEQ ID NO: 18) 서열을 도시한다. 아미노산 서열 분석으로 추정된 성숙 분비된 단백질의 아미노-말단 아미노산은 1번으로 넘버링된다. 3' PCR 프라이머와 겹쳐지는 서열은 이중선으로 지시된다. V-J-C 영역에 대한 예측된 접합 경계는 (/)로 지시되고, 체세포 극돌연변이에 대한 잠재적 부위를 나타내는 J 영역 뉴클레오티드는 굵은 글씨체로 기재된다.

[0470] 도 7A-7B에서는 공개된 생쥐 항-CD19 항체의 아미노산 서열 정렬을 도시한다. 도 7A에서는 일치 서열(SEQ ID NO:5), HB12a(SEQ ID NO:2), 4G7(SEQ ID NO:6), HB12b(SEQ ID NO:4), HD37(SEQ ID NO:7), B43(SEQ ID NO:8), FMC63(SEQ ID NO:9)을 보유하는 중쇄 V_H-D-J_H 접합 서열에 대한 서열 정렬을 도시한다. 각 항체 V, D, J 영역에 대한 코딩 서열의 기원의 아미노산 넘버링과 지정은 통상적인 방법(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest., U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD (1991))에 따르는데, 여기서 아미노산 위치 1-94 및 상보성-결정 영역 CDR1과 2는 VH 유전자에 의해 인코딩된다. 점선은 유사한 아미노산 서열의 정렬을 극대화하기 위하여 서열 내에 삽입된 갭(gap)을 지시한다. 반점은 항-CD19 항체 및 모든 항체에서 공통 아미노산 서열 사이에 동일성을 지시한다. CDR 영역은 명료하게 하기 위하여 강조된다. 도 7B에서는 항-CD19 항체의 경쇄 V_K 아미노산 서열 분석 결과를 도시한다. 일치 서열(SEQ ID NO:10), HB12a(SEQ ID NO:16), HB12b(SEQ ID NO:18), HD37(SEQ ID NO:11), B43(SEQ ID NO:12), FMC63(SEQ ID NO:13), 4G7(SEQ ID NO:14)이 정렬된다. 각 항-CD19 항체에 대한 코딩 서열의 기원의 아미노산 넘버링과 지정은 통상적인 방법(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest., U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD (1991))에 따른다. 예측된 신호 서열 절단 부위 이후의 아미노산은 1번으로 넘버링된다. 점선은 유사한 아미노산 서열의 정렬을 극대화하기 위하여 서열 내에 삽입된 갭(gap)을 지시한다. CDR 영역은 명료하게 하기 위하여 강조(박스로 표시됨)된다.

[0471] 본 연구에서 검사된 각 항-CD19 항체가 생체내에서 상당수의 B 세포를 고갈시켰기 때문에, 이들 항체가 서열에서 상이하고 서로 다른 CD19 에피토프에 잠재적으로 결합하는 지를 결정하기 위하여 각 항-CD19 항체 가변 영역의 아미노산 서열을 평가하였다. 항체는 각 항체 분자의 가변 영역 내에서 특정 아미노산에 의해 매개되는 분자 상호작용을 통하여 표적 항원에 결합한다. 따라서, 단백질 항원 및 이들 항원 상의 특정 에피토프에 결합하는 항체 사이에 복잡한 상호작용은 각 항체 및 이의 특이적인 아미노산 서열 마다 상당히 독특하다. 항원과 항체 상호작용에서 이와 같은 수준의 복잡성은 많은 단백질 항원에 대한 다양한 항체 레퍼토리의 반영이다. 표적 항원과의 항체 상호작용이 일차적으로, 항체 분자의 상보성-결정 영역(CDR) 내에 아미노산에 의해 매개되긴 하지만, 골격 아미노산 역시 항원-결합 활성화에 중요하다. 따라서, 구조적으로 유사한 항체는 표적 분자의 동일한 항원 또는 영역에 결합할 가능성이 높은 반면, 서로 다른 V와 CDR 영역을 보유하는 구조적으로 상이한 항체는 상이한 분자 상호작용을 통하여 항원의 서로 다른 영역과 상호작용할 가능성이 높다.

[0472] 표적 항원의 동일한 분자 영역(또는 에피토프)과 상호작용하고 이에 결합하는 항체는 정의에 의해 구조적으로 유사하기 때문에, HD37(Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods, 196:51-62(1996); Le Gall et al., FEBS Letters, 453:164-168 (1999)), 2G7(Meeker et al., Hybridoma, 3:305-320 (1984); Brandl et al., Exp. Hematol, 27:1264-1270 (1999)), B43(Bejcek et al., Cancer Res., 55:2346-2351 (1995)) 항체를 비롯하여 HB12a, HB12b, FMC63 및 다른 공개된 항-CD19 항체의 아미노산을 비교하였다. 항-CD19 항체의 중쇄는 V1S39, V1S56, V1S136, 또는 V2S1 유전자 분절로부터 유래된 V 영역, FL16.1 유전자 분절로부터 유래된 D 영역, J2 또는 J4 유전자 분절로부터 유래된 J 영역 및 V(D)J 유전자 분절의 상이한 조합을 통하여 산출되었다(표 2). B43과 HD37 항체의 공개된 중쇄와 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열(도 7A-B)과 거의 일치하였다. 이와 같은 보존 수준은 이들 각 항체가 또한, 뉴클레오티드 수준에서 현저하게 유사하고 동일한 $V_H(D)_{J_H}$ 와 $V_L J_L$ 접합을 보유하며, 최대 차이가 각 cDNA 서열을 PCR 증폭하기 위한 증폭 프라이머의 이용에 의해 유발된다는 사실을 반영한다. 이는 HD37과 B43 항체가 일치하지는 않지만 공통의 기원을 공유하고, 따라서 CD19 단백질 상에 동일한 에피토프에 결합한다는 것을 암시한다. HB12a와 4G7 항체 역시 다른 항-CD19 항체로부터 구별된다. HB12a와 4G7 항체의 중쇄 영역이 유사하고 동일한 생식세포주 $V_H(D)_{J_H}$ 유전자 분절로부터 유래될 가능성이 높긴 하지만, D- J_H 어셈블리(assembly)에 상이한 접합 경계가 이용되었다(도 7A). HB12b 항체는 상이한 V_H 유전자 분절(표 2)을 이용하고 다른 항-CD19 항체와 명백하게 구별되는 CDR3 서열(도 7A)을 보유하였다. FMC63 항체 역시 다른 항-CD19 항체로부터 명백하게 구별되는 아미노산 서열을 보유하였다.

표 2

	중쇄				경쇄		
	V^a	D	J	수탁번호 ^b	V	J	수탁번호 [#]
					V1-133*	J2*	
HB12a	V1S136(12,8)	FL16.1	J2		01	01	
						J4*	
HB12b	V1S56(27,14)	FL16.1	J2		V3-2*01	01	
4G7	V1S136(10,8)	FL16.1	J2	AJ555622	V2-137	J5	AJ555479
B43	V1S39(37,17)	FL16.1	J4	S78322	V3-4	J1	S78338
HD37	V1S39(34,16)	FL16.1	J4	X99230	V3-4	J1	X99232
FMC63	V2S1(20,16)	FL16.1	J4	Y14283	V10-96	J2	Y14284

[0474] N.D., 결정되지 않음.

[0475] ^a괄호 안에 숫자는 CD19 항체 인코딩 유전자 및 PCR 프라이머와 겹쳐지는 영역을 배제하고 현재 데이터베이스에서 확인된 가장 상동한 생식세포주 서열 사이에 뉴클레오티드 차이의 번호를 지시한다.

[0476] 도 7B에 도시된 바와 같이, HB12a, HB12b, FMC63, 4G7, HD37/B43 항체 각각은 별개의 경쇄 유전자(도 7B)를 이용한다. 경쇄는 복수의 V와 J 유전자 분절로부터 산출되었다. 이들 6개의 항-CD19 항체 H와 L 사슬 서열 사이에 균일성(homogeneity)의 부족은 이들 항체가 인간 CD19 상에서 별개의 부위에 결합한다는 것을 암시한다. 짝을 이룬 중쇄와 경쇄의 아미노산 서열의 비교는 이들 항-CD19 항체의 대부분이 구조적으로 상이하고, 이런 이유로 상이한 분자 상호작용을 통하여 인간 CD19에 결합한다는 것을 더욱 암시한다. 따라서, 생체내에서 B 세포를 고

갈시키는 항-CD19 항체의 능력은 동일한 부위에서 CD19에 결합하는 한정된 수의 항체에 국한되지 않고 한 분류로서 항-CD19 항체의 전반적인 특징이다.

[0477] 3.4. CD19 밀도는 CD19 항체-유도된 B 세포 고갈의 효능에 영향을 준다

[0478] B 세포를 고갈시키는 항-CD19 항체의 능력이 CD19 밀도에 의존하는 지를 결정하기 위하여, HB12b와 FMC63 항-CD19 항체를 다양한 수준의 CD19 발현을 보유하는 생쥐에 투여하였다. 이의 결과는 B 세포와 항체 아이소타입 상에서 인간 CD19 밀도가 항-CD19 항체의 존재에서 B 세포의 고갈에 영향을 줄 수 있다는 것을 입증한다. 동일한 측정법을 이용하여 다른 항-CD19 항체가 B 세포를 효과적으로 고갈시키고, 이들 결과가 다양한 수준의 CD19 발현을 보유하는 인간 환자의 치료에 상관될 수 있는 지를 결정할 수 있다. 따라서, 특정 항-CD19 항체가 B 세포를 고갈시킬 수 있는 환자 또는 환자 개체군을 확인하고 및/또는 적절한 용량을 결정하기 위하여, 섹션 “샘플과 개체 내에서 CD19 밀도 측정”에 기술된, 인간 개체에서 CD19 존재와 밀도를 검사하는 방법이 이용될 수 있다.

[0479] 앞서 제시된 결과는 비록 검사된 5개의 항-CD19 항체 모두가 250 또는 50 μg 으로 투여되는 경우에 TG-1^{+/-} 생쥐에서 유사하게 효과적인 것은 아니지만, 혈액 골수와 비장으로부터 B 세포에 대한 B 세포 고갈의 정도가 항체 아이소타입, IgG2a>IgG1>IgG2b와 상관한다는 것을 암시한다(도 2A-2D). 이런 이유로, 상이한 밀도에서 CD19를 발현하는 동형접합성 TG-1^{+/+}, 이형접합성 TG-1^{+/-}, 동형접합성 TG-2^{+/+} 생쥐에서 HB12b(IgG1)와 FMC63(IgG2a) 항체의 효능을 비교하였다(도 1A-E).

[0480] CD19 밀도가 항-CD19 항체-유도된 B 세포 고갈의 효능에 영향을 주는 지를 결정하기 위하여, HB12b(도 8A) 또는 FMC63(도 8B) 항체 치료(7일, 250 μg /생쥐)이후 hCD19TG 생쥐에서 전형적인 혈액과 비장 B 세포 고갈을 검사하였다. 숫자는 관문 B220⁺ 림프구의 비율을 지시한다. 막대그래프는 항-CD19 항체(단한 막대) 또는 아이소타입-대조(빈 막대) 항체로 치료이후 혈액(mL 당)이나 비장(총수) B 세포의 개수(\pm SEM)를 지시한다. 항-CD19 항체 또는 아이소타입-대조 항체 치료된 생쥐(테이터 포인트마다 ≥ 3 마리 생쥐)에 대한 평균 결과간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[0481] 도 8A-8D에 제시된 결과는 CD19 밀도가 생체내에서 항-CD19 항체에 의한 B 세포 고갈의 효율에 영향을 준다는 것을 입증한다. TG-2^{+/+} 생쥐에서 낮은 수준 CD19 발현은 7일에, HB12b 항체에 의한 순환 또는 조직 B 세포 고갈에 현저한 영향을 주었다(도 8A). TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, TG-2^{+/+} 생쥐에 의한 CD19 발현에서 차이 역시 FMC63 항체에 의한 순환과 조직 B 세포 고갈에 영향을 주긴 했지만 순환 B 세포 고갈을 현저하게 변화시키지는 못하였다(도 8B).

[0482] CD19 밀도가 CD19 mAb-매개된 B 세포 고갈에서 중요한 인자임을 더욱 확증하기 위하여, CD19TG-1^{+/+}과 CD19TG-2^{+/+} B 세포의 상대적인 고갈 속도를 직접적으로 비교하였다. CD19TG-1^{+/+}와 CD19TG-2^{+/+} 생쥐로부터 비장림프구(splenocyte)는 제조업체의 지시에 따라, hCD19TG-1^{+/+}과 hCD19TG-2^{+/+} 생쥐로부터 분획되지 않은 비장림프구를 각각, 0.1과 0.01 μM Vybrant™ CFDA SE(CFSE; Molecular Probes)로 표지함으로써 CFSE로 차별적으로 표지하였다. CFSE-표지된 비장림프구 중에서 B220⁺ 세포의 상대적 빈도수는 유세포분석과 함께, 면역형광 염색으로 측정하였다. 이후, 동수의 CFSE-표지된 B220⁺ hCD19TG-1^{+/+}과 hCD19TG-2^{+/+} 비장림프구(2.5×10^5)를 3마리의 야생형 B6 생쥐의 복강 내에 주입하였다. 1시간후, 이들 생쥐는 FMC63 또는 대조 mAb(250 μg , i.p.)를 제공하였다. 24시간후, 유세포분석법으로 평가된, CFSE-표지된 B220⁺과 B220⁻ 세포의 상대적 빈도수를 갖는 표지된 림프구를 회수하였다. 도 8C에서 각 막대그래프에서 관문은 CD19TG-1^{+/+}(CFSE^{high})과 CD19TG-2^{+/+}(CFSE_{low}) 비장림프구 개체군 내에서 B220⁺ 세포의 빈도수를 지시한다. 막대그래프는 대조 mAb-치료된 생쥐와 비교하여, 항-CD19 mAb 치료된 생쥐 내에 존재하는 CFSE 표지된 세포 개체군의 개수를 지시한다. 결과는 ≥ 3 마리 야생형 수용자 생쥐로 이전된 hCD19TG-1^{+/+} 비장림프구(채워진 막대)와 hCD19TG-2^{+/+} 비장림프구(빈 막대)를 나타내고, 샘플 평균(\pm SEM)간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; ** $p < 0.01$.

[0483] B 세포 소거는 개별 생쥐의 항-CD19 또는 대조 mAb 치료이후 24시 시점에 평가하였다. CD19TG-1^{+/+} B220⁺ B 세포는 대조 mAb-치료된 생쥐와 비교하여 항-CD19 mAb-치료된 생쥐 내에서 CD19TG-2^{+/+} B 세포보다 훨씬 빠른 속도

($p < 0.01$)로 고갈되었다(도 8C). 더 나아가, 항-CD19 mAb 치료된 생쥐 내에서 CD19TG-2^{+/+} B220⁺ B 세포에 대한 CD19TG-1^{+/+} B220⁺ B 세포의 상대적인 빈도수는 대조 mAb 치료된 생쥐 내에서 CD19TG-2^{+/+} B220⁺ B 세포에 대한 CD19TG-1^{+/+} B220⁺ B 세포의 비율보다 현저하게 낮았다($p < 0.01$). 유사하게, 항-CD19 또는 대조 mAb 생쥐 내에서 CD19TG-1^{+/+}과 CD19TG-2^{+/+} CFSE-표지된 B220⁺ 세포의 개수 역시 비교하였다. 따라서, CD19를 높은 밀도로 발현하는 CD19TG-1^{+/+} B 세포는 CD19를 낮은 밀도로 발현하는 CD19TG-2^{+/+} B 세포보다 더욱 빠른 속도로 고갈되었다.

[0484]

도 8D에서는 CD19(두꺼운 선), CD20(가느다란 선) 또는 아이소타입-함치된 대조 (CTL, 점선) 항체($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 염색된 B220⁺ B 세포의 형광 강도를 도시하는데, 항체 염색은 유세포분석과 함께, 아이소타입-특이적인 PE-공액된 이차 항체를 가시화시켰다. 결과는 4가지 실험에서 획득된 결과를 나타낸다. 이들 결과는 TG-1^{+/+} 생쥐로부터 비장 B220⁺ B 세포 상에서 상대적인 항-hCD19와 항-mCD20 항체 결합 밀도를 보여준다. 항-mCD20 항체 결합의 밀도는 각 항체에 이용된 항체 아이소타입과 무관하게, 항-CD19 항체 결합보다 10-64% 높았다(도 8D). 비록 mCD20 발현이 hCD19 발현보다 전반적으로 낮은 하지만, TG-1^{+/+} 생쥐 내에서 hCD19 발현의 수준은 인간 B 세포에서 관찰되는 hCD19 발현의 수준에 여전히 필적한다(도 1B). 따라서, TG-1^{+/+}와 TG-1^{+/+} B 세포에 의한 높은 수준 CD19 발현이 IgG2a와 IgG1 항체의 효능에서 상대적인 차이를 혼란스럽게 하지만, 항-CD19 항체는 hCD19를 상대적으로 낮은 밀도로 발현하는 TG-2^{+/+} B 세포를 효과적으로 고갈시켰다(도 1B). TG-1과 TG-2 유전자도입 생쥐 내에서 B 세포의 개수와 hCD19 발현의 밀도 사이에 직접적인 역 상관관계가 존재하긴 하지만, hCD19의 밀도는 B 세포의 고갈에 기여하는 중요한 인자이다. 항-CD19 항체 수준은 $250 \mu\text{g}/\text{생쥐}$ 로 투여되는 경우에 포화되었다(도 12에서 포화 수준 참조). 따라서, 유리 항-CD19 항체 수준은 B 세포 수에 상관없이 과잉이었다.

[0485]

4. 실시예 3: 조직 B 세포 고갈은 Fc γ R-의존성이다

[0486]

아래의 측정법을 이용하여 항-CD19 항체에 의한 B 세포 고갈이 Fc γ R 발현에 의존하는 지를 결정하였다. 특정 Fc γ R의 발현이 부재하는 생쥐와 hCD19tg를 교배하는 과정을 통하여, hCD19를 발현하고 특정 Fc γ R의 발현이 부재하는 생쥐를 산출하였다. 이들 생쥐는 Fc γ R 발현을 수반하는 경로, 예를 들면, ADCC를 통하여 B 세포를 고갈시키는 항-CD19 항체의 능력을 평가하였다. 따라서, 이들 측정에서 확인된 항-CD19 항체는 상기 섹션 “항-CD19 항체의 생성”에 기술된 기술을 이용하여 키메라, 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 도모하는데 이용될 수 있다. 이들 항체는 인간에서 B 세포 악성종양의 치료를 위하여 본 발명의 조성물과 방법에 이용될 수 있다.

[0487]

선천성 면역계(innate immune system)는 Fc γ R-의존성 과정을 통하여 항-CD20 항체 치료이후 B 세포 고갈을 매개한다. 생쥐 작동체 세포는 IgG에 대한 4가지 상이한 Fc γ R 분류, 고-친화성 Fc γ RI(CD64) 및 저-친화성 Fc γ RII(CD32), Fc γ RIII(CD16), Fc γ RIV 분자를 발현한다. Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV는 헤테로-올리고머 복합체인데, 여기서 개별 리간드-결합 α 사슬은 통상적인 γ 사슬(FcR γ)과 협력한다. FcR γ 사슬 발현은 Fc γ R 어셈블리(assembly) 및 식세포에 의한 식세포작용을 비롯한 작동체 기능의 Fc γ R 유인에 요구된다. FcR γ ^{-/-} 생쥐는 고-친화성 Fc γ RI(CD64) 및 저-친화성 Fc γ RIII(CD16)와 Fc γ RIV 분자가 부재하기 때문에, hCD19를 발현하는 FcR γ ^{-/-} 생쥐를 이용하여 항-CD19 항체 치료이후 조직 B 세포 고갈에서 Fc γ R의 역할을 평가하였다. 도 9A에서는 FcR γ ^{+/+} 또는 FcR γ ^{-/-} 한배 새끼의 항-CD19 또는 아이소타입-대조 항체 치료이후 7일 시점에 전형적인 혈액과 비장 B 세포 고갈을 도시한다. 숫자는 지정된 관문 내에서 B220⁺ 림프구의 비율을 지시한다. 도 9B에서는 0일에 FcR γ ^{-/-} 한배 새끼의 항체 치료이후 7일 시점에 혈액과 조직 B 세포 고갈을 도시한다. 혈액의 경우에, 0시 이후에 도시된 수치는 1시 시점에 획득된 데이터를 나타낸다. 막대그래프는 생쥐(≥ 3 마리 생쥐/군)의 항-CD19(채워진 막대) 또는 아이소타입-대조(빈 막대) 항체 치료이후 평균 B220⁺ B 세포 수(\pm SEM)를 나타낸다. 항-CD19 또는 아이소타입-대조 항체 치료된 생쥐에 대한 평균 결과간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 도 9A와 9B에 도시된 결과는 항-CD19 30 항체 치료이후 B 세포 고갈이 FcR γ -의존성이라는 것을 입증한다. 대조 IgG2a 항체로 치료된 FcR γ ^{-/-} 한배 새끼와 비교하여, FMC63 항체 치료이후 FcR γ ^{-/-} 생쥐에서 골수, 혈액, 비장, 림프절, 복강 B 세포의 개수에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 대조적으로, 항-CD19 항체 치료는 FcR γ ^{+/+} 한배 새끼에서 대부분의 B 세포를 고갈시켰다. 따라서, 항-CD19 항체 치료는 Fc γ RI와 Fc γ RIII 발현을 필요로 하는 경로를 통하여 혈액과 조직 B 세포를 일차적으로 고갈시킨다.

- [0488] 도 9C에서는 단핵구-고갈된 hCD19TG-1^{+/+} 생쥐에서 전형적인 B 세포 총수를 도시한다. 생쥐는 -2, 1, 4일에 클로드로네이트-리포솜으로 치료하고, 0일에 FMC63(n=9), 아이소타입 대조(n=6), 또는 CD20(n=3) mAb(250 μ g)을 제공하였다. PBS-리포솜과 FMC63 항-CD19 항체로 치료된 생쥐(n=3)는 대조로서 기능하였다. 전형적인 혈액과 비장 B 세포 고갈은 항체 치료이후 7일 시점에 나타나는데, 지정된 관문 내에서 림프구의 비율이 지시된다.
- [0489] 도 9D에서는 (C)에서처럼 항체 치료이후 7일 시점에, 혈액과 조직 B 세포 고갈을 도시한다. 막대그래프는 생쥐 (≥ 3 마리 생쥐/군)의 항체 치료이후 평균 B220⁺ B 세포 수(\pm SEM)를 나타낸다. 혈액의 경우에, 수치는 FMC63 항-CD19 항체(단한 삼각형)로 치료된 PBS-처리된 생쥐, 또는 대조 항체(열린 원), CD20 항체(단한 사각형) 또는 FMC63 항-CD19 항체(단한 원)로 치료된 단핵구-고갈된 생쥐 내에서 순환 B 세포 수를 나타낸다. 아이소타입-대조 mAb-치료된 생쥐와 다른 군에 대한 평균 결과 사이의 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; *p<0.05, **p<0.01.
- [0490] 도 9에 제공된 결과는 항-CD19 항체 치료이후 B 세포 고갈이 FcR γ 과 단핵구-의존성임을 입증한다. 리포솜-캡슐화된 클로드로네이트 처리에 의해 대식세포-결합된 생쥐는 FMC63, 항-CD20(MB20-11) 또는 대조 항-CD19 항체 치료이후 1일 시점에 순환 B 세포를 별로 고갈시키지 못하는 반면, FMC63 항체 치료는 PBS-적하된 리포솜으로 치료된 생쥐 내에서 순환 B 세포를 고갈시켰다(도 9C-D). 4-7일후, 순환 B 세포 수는 FMC63와 항-CD20 항체 치료 모두에 의해 현저하게 고갈되었는데, 항-CD19 항체 치료가 클로드로네이트-처리된 생쥐 내에서 B 세포 수에 대해 더욱 극적인 효과를 나타냈다. 유사하게, 항-CD19와 항-CD20 항체 치료는 7일에, 대조 항체 치료된 한배 새끼에 비하여 클로드로네이트-처리된 생쥐에서 골수 B220⁺ 세포 수를 55% 감소시킨 반면, 항-CD19 항체 치료는 PBS-처리된 생쥐에서 골수 B220⁺ 세포 수를 88% 감소시켰다. 항-CD19 항체 치료는 7일에, 대조 항체 치료된 한배 새끼에 비하여 클로드로네이트-처리된 생쥐에서 비장 B 세포 수를 52% 감소시킨 반면, 항-CD20 항체는 B 세포를 최소한으로 고갈시키고, 항-CD19 항체 치료는 PBS-처리된 생쥐에서 비장 B 세포 수를 89% 감소시켰다. 항-CD19와 항-CD20 항체 치료 모두 7일에, 대조 항체 치료된 한배 새끼에 비하여 클로드로네이트-처리된 생쥐에서 림프절 B 세포 수를 48-53% 감소시키고, 항-CD19 항체 치료는 PBS-처리된 생쥐에서 림프절 B 세포 수를 93% 감소시켰다. 혈액, 비장, 림프절에서, 항-CD19 항체 치료는 PBS-처리된 한배 새끼에서보다 클로드로네이트-처리된 생쥐에서 효과가 훨씬 덜하였다(p<0.01). 이들 조사결과는 생체내에서 CD19⁺와 CD20⁺ B 세포의 고갈을 위한 주요 작동체 세포로서 대식세포를 암시하고, 단핵구 수 또는 기능이 축소되는 경우에 항-CD19 항체 요법이 항-CD20 항체 요법보다 더욱 효과적이라는 것을 지시한다.
- [0491] **5. 실시예 4: 항-CD19 항체-유도된 B 세포 고갈은 지속적이다**
- [0492] B 세포 고갈의 효능과 지속 기간을 평가하기 위하여, hCD19TG 생쥐에 항-CD19 항체의 단일 저용량 250 μ g을 주입하였다. 도 10A-10C에서는 항-CD19 항체 치료이후 B 세포 고갈의 지속 기간과 용량 반응(dose response)을 예증한다. 도 10A에서는 0일에 TG-1^{+/+} 생쥐의 FMC63 또는 아이소타입-대조 항체 치료이후, 혈액 B220⁺ B 세포와 Thy-1⁺ T 세포의 총수를 도시한다. 수치는 각 군에서 6마리 생쥐로부터 평균(\pm SEM) 결과를 나타낸다. 이들 결과는 순환 B 세포가 13주 동안 고갈되고, 이어지는 13주 동안 혈액-기원 B 세포가 점진적으로 회복된다는 것을 입증한다. Thy-1⁺ T 세포 표현은 항-CD19 치료의 결과로서 변화되지 않았다.
- [0493] 도 10B-C에서는 항체 치료이후 11, 16, 30주 시점에, 도 10A에 도시된 생쥐에서 전형적인 조직 B 세포 고갈을 도시한다. 숫자는 지정된 관문 내에서 B220⁺ 림프구의 비율을 지시한다. 도 10B에서 결과는 항체 치료이후 11주 시점에, 골수, 혈액, 비장, 림프절, 복강에 B 세포가 본질적으로 결여된다는 것을 입증한다(샘플간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; *p<0.05, **p<0.01). 순환 B 세포의 첫 번째 출현이후, 순환 B 세포 수가 정상 범위에 도달하는데 >10주 추가로 소요된다. 항체 치료이후 16주 시점에, 혈액, 비장, LN과 PL B 세포 수는 회수되기 시작하는 반면, BM B 세포 구획은 도 10C에 도시된 바와 같이, 치료되지 않은 대조와 별다른 차이가 없었다. 30주에, 모든 조직에는 정상 대조에서 수준에 필적하는 수준으로 B 세포가 다시 거주하였다.
- [0494] 도 10D에서는 혈액, 골수와 비장 B 세포 고갈에 대한 항-CD19 항체 용량 반응을 도시한다. 생쥐는 0일에 항-CD19 항체로 치료하고, 조직 B 세포 표현은 7일에 평가하였다. 결과는 각 항체 용량에 대하여 각 군 내에 3마리 생쥐로 획득된 결과를 나타낸다. 대조 항체 용량은 250 μ g이었다. 샘플간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; *p<0.05, **p<0.01. 2 μ g/생쥐 정도의 낮은 단일 FMC63 항체 용량이 순환 B 세포의 상대수를 고갈시킨 반면, HB12b 항체는 순환 B 세포 수를 현저하게 감소시키는데 10 μ g이 필요하였다(도 10D). 7일에 골수와 비장 B 세포

의 현저한 고갈은 10-50 μg /생쥐의 5배 많은 항체 용량을 필요로 하였다. 따라서, 상대적으로 낮은 용량에서 CD19 항체 치료가 상당한 기간 동안 대부분의 순환과 조직 B 세포를 고갈시킬 수 있다.

[0495] 5.1. CD19는 항-CD19 항체의 투여이후 B 세포 표면에서 존속한다

[0496] CD19 내재화(internalization)가 생체내에서 B 세포 고갈에 영향을 주는 지의 여부는 HB12a, HB12b와 FMC63 항체 치료(250 μg)이후 세포-표면 CD19 발현을 비교함으로써 평가하였다.

[0497] 도 11A-11C에서는 생체내에서 HB12a(도 11A), HB12b(도 11B), FMC63(도 11C) 또는 아이소타입-함치된 대조 항체(250 μg)로 치료된 TG-1^{+/+} 생쥐에서 세포 표면 CD19 발현 및 B 세포 제거를 도시한다. 0시(항-CD19 투여에 앞서) 및 항체 투여이후 1, 4, 24시 시점에, 비장 B 세포는 수거하고, 유세포분석과 함께 시험관내에서 아이소타입-특이적인 이차 항체로 세포를 치료함으로써 CD19(두꺼운 선)와 대조(가는 선) 항체 결합을 평가하였다. 분리된 B 세포 역시 유세포분석과 함께, 시험관내에서 포화 농도의 각 CD19 항체 + 아이소타입-특이적인 이차 항체로 치료하였다. 각 시점은 1마리의 생쥐에서 획득된 결과를 나타낸다. 도 11A-11C에 제공된 결과는 세포 표면 CD19가 생체내에서 항체 결합이후 세포 표면으로부터 제거되지 않고, 비록 B 세포의 부분집합이 FMC63 항체 치료이후 1시 시점에 감소된 수준의 hCD19를 발현하지만(도 11C) 대부분의 비장 B 세포가 항체 치료이후 최대 24 시간동안 균일하고 높은 수준의 세포 표면 hCD19를 발현한다는 것을 입증한다. 도 11A-11C에 도시된 결과는 또한, B 세포의 표면 상에서 CD19의 양이 불변하다는 것을 입증하는데, 이는 ADCC를 매개하는 B 세포의 능력이 유지된다는 것을 암시한다.

[0498] 이들 결과는 놀랍게도, CD19가 항-CD19 항체의 투여이후 예상된 것보다 낮은 수준의 내재화를 나타낸다는 것을 입증한다. 특히, 이들 결과는 CD19가 항-CD19 항체의 결합이후 세포 표면상에서 예상치 않게 존속하고, 따라서 B 세포가 ADCC 활성화에 계속 접근하기 용이한 상태로 유지된다는 것을 입증한다. 이들 결과는 본 발명의 항-CD19 항체와 치료 처방이 B 세포 악성종양을 치료하는데 왜 유효한 지를 부분적으로 설명한다.

[0499] 도 12A-12C에서는 B 세포 고갈의 정도 및 hCD19에 결합하고, 따라서 다른 항-hCD19 항체의 결합을 저해하는 항-hCD19 항체의 능력을 보여준다. 도 12A의 결과는 TG-1^{+/+} 생쥐에 FMC63(250 μg)의 단일 투여가 항체 투여후 1시간 이내에 혈액과 비장 B 세포 모두의 현저한 고갈을 유도한다는 것을 입증한다. 이 실험에서, 혈액과 비장 세포는 수거하고, 항-CD19 항체의 투여 이전에 또는 투여 이후 다양한 시점(1, 4, 또는 24시)에 B 세포 빈도수를 평가하였다. 혈액 샘플은 항-Thy1.2와 항-B220으로 염색하여 아래쪽 우측 사분면 내에서 B 세포를 확인하였다. 비장 세포는 항-IgM과 항-B220 항체로 염색하여 지정된 관문 내에서 B 세포를 확인하였다. 각 시점은 1마리 생쥐에서 획득된 결과를 나타낸다. 예상치 않게, 혈액 B 세포는 비장 B 세포보다 더욱 급속하게 소거되었다.

[0500] 도 12A에 기술된 B 세포 고갈은 투여된 항체가 투여후 1시간 이내에 hCD19 상에서 가용한 항체-결합 부위를 급속하게 포화시킨다는 것을 암시하였다. 이러한 관찰 결과를 확증하기 위하여, 생쥐는 FMC63(hCD19 결합 항체) 또는 아이소타입-대조 항체로 치료하였다. 이후 다양한 시점에서, 혈액과 비장 B 세포는 형광색소-공액된 B4 항체로 염색하여 mCD19⁺ 또는 mCD20⁺ B 세포의 표면 상에서 결합되지 않은 항체 결합 부위를 확인하였다. 위쪽과 아래쪽 우측 사분면 내에서 세포의 빈도수는 지시된다. 각 시점은 1마리의 생쥐에서 획득된 결과를 나타낸다. 이들 결과는 FMC63 치료가 실험 과정 동안 hCD19 보유 세포의 점진적인 고갈을 유도한다는 것을 입증하는데, 혈액 B 세포가 비장보다 더욱 빠르게 고갈된다. 각 시점에 존속하는 B 세포는 그들의 mCD19 또는 mCD20 발현으로 확인될 수 있긴 하지만, B4에 의해 염색되지 않는데, 이는 투여된 FMC63이 존속하는 B 세포에 결합된다는 것을 암시한다. 이들 조사결과는 생체내에서 B 세포에 결합하고 이를 고갈시키는 FMC63의 능력을 확증한다. 게다가 FMC63은 B4 결합을 예방하는데, 이는 이들 항체가 hCD19 상에서 중복 에피토프를 인식한다는 것을 암시한다. 도 12C에서 결과는 HB12b 항체 치료(250 μg) 역시 투여후 1시간 이내에 hCD19 상에서 항체-결합 부위를 포화시키고, hCD19 양성 B 세포의 고갈을 유도한다는 것을 확증한다. 예상치 않게, HB12b 항체는 B4 항체의 결합을 완전하게 저해하지 못하였는데, 이는 FMC63과 달리, HB12b가 hCD19 상에서 B4에 의해 인식되는 에피토프와 상이한 에피토프를 인식한다는 것을 암시한다. 도 12B-12C에 도시된 결과는 대부분의 항-CD19 항체가 대부분의 다른 항-CD19 항체의 결합을 저해한다는 것을 입증하는데, 이는 대부분의 항-CD19 항체가 CD19 단백질 상에서 유사하거나, 동일하거나, 또는 중복되는 영역 또는 에피토프에 결합한다는 것을 암시한다. 대안으로, 이들 관찰 결과는 항체 분자의 크기와 비교하여 CD19 세포외 도메인의 상대적으로 작은 크기에 기인할 수도 있다.

[0501] 6. 실시예 5: 항-CD19 항체 치료는 체액 면역과 자가면역을 제거한다

[0502] 본 실시예에 기술된 측정법은 항-CD19 항체가 면역 반응을 제거하거나 약화시킬 수 있는 지를 결정하는데 이용

될 수 있다. 이들 측정법에서 확인된 항-CD19 항체는 상기 섹션 “항-CD19 항체의 생성”에서 기술된 기술을 이용하여 키메라, 인간 또는 인간화 항-CD19 항체를 도모하는데 이용될 수 있다. 이들 항체는 인간에서 B 세포 악성종양의 치료를 위하여 본 발명의 조성물과 방법에 이용될 수 있다.

[0503] 혈청 항체 수준에 대한 항-CD19 항체-유도된 B 세포 고갈의 효과는 hCD19TG^{+/-} 생쥐에 항-CD19 항체의 단일 주사를 제공함으로써 평가하였다. 도 13A에서는 항-CD19 항체 치료가 TG-1^{+/-} 생쥐에서 혈청 면역글로불린 수준을 감소시킨다는 것을 예증한다. 2개월령 한배 새끼는 0일에 FMC63(단힌 원) 또는 대조(열린 원) 항체(250 μ g)의 단일 주사로 처리하였다. ELISA로 항체 수준을 결정하여 ≥ 5 마리 생쥐의 각 군에 대한 평균 수치(\pm SEM)를 획득하였다. CD19 또는 대조 mAb-치료된 생쥐 사이에 차이는 유의하였다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 이들 결과는 1 내지 2주후, 혈청 IgM, IgG2b, IgG3, IgA 항체 수준이 현저하게 축소되고, 적어도 10주 동안 축소된 상태로 유지된다는 것을 입증한다(도 13A). IgG1과 IgG2a 혈청 수준은 치료이후 6주와 4주 시점에 정상보다 현저하게 낮았다.

[0504] hCD19TG^{+/-} 생쥐가 2개월령이후 검출가능한 자기항체(autoantibody)를 생산하기 때문에(Sato et al., J. Immunol, 157:4371(1996)), ssDNA, dsDNA, 히스톤에 결합하는 혈청 자기항체를 평가하였다. 도 13B에서는 항-CD19 항체 치료가 항-CD19 항체 치료이후 자기항체 항-dsDNA, 항-ssDNA, 항-히스톤 자기항체 수준을 축소시킨다는 것을 보여준다. 이들 결과는 항-CD19 항체 치료가 2주후에 혈청 IgM 자기항체 수준을 현저하게 축소시키고, 최대 10주 동안 아이소타입-전환된 IgG 자기항체의 생성을 예방한다는 것을 입증한다(도 13B). 따라서, B 세포 고갈은 단기와 장기 항체 반응을 실질적으로 축소시키고, 정상과 병리 면역 반응의 클래스-전환을 약화시켰다.

[0505] T 세포-독립된 1형(TI-1)과 2형(TI-2) 항체 반응에 대한 B 세포 고갈의 영향은 항-CD19 항체(FMC63) 또는 대조 항체 치료이후 7일 시점에, hCD19TG^{+/-} 생쥐를 TNP-LPS 또는 DNP-Ficoll(0일에서)로 면역접종함으로써 평가하였다. 이들 항원으로 면역접종된 항-CD19 항체-치료된 생쥐 내에서 현저한 함텐-특이적인 IgM, IgG, IgA 항체 반응은 관찰되지 않았다(도 14A와 14B). T 세포-의존성(TD) Ag, DNP-KLH에 대한 항체 반응 역시 면역접종이전 7일 시점에, 항-CD19 항체로 치료된 생쥐를 이용하여 평가하였다(도 14B). 도 14C에서는 항-CD19 항체로 치료된 DNP-KLH 면역접종된 생쥐가 축소된 체액 반응성(humoral immunity)을 나타낸다는 것을 보여준다. 한배 새끼는 지정된 일자에 획득된 혈청으로, 0일에 일차 면역접종이전 7일 시점에, FMC63(단힌 원) 또는 대조(열린 원) 항체(250 μ g)로 치료하였다. DNP-KLH 면역접종을 위하여, 모든 생쥐는 21일에, 100 μ g의 DNP-KLH로 공격접종하였다. 모든 수치는 각 군의 5마리 생쥐로부터 혈청을 이용하여 획득된 평균(\pm SEM) ELISA OD 단위이다. 항-CD19 항체 또는 대조 항체-치료된 생쥐 사이에 차이는 유의하였다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 이들 결과는 대조 항체-치료된 한배 새끼가 DNP-KLH 면역접종이후 7일 시점에 일차 IgM 항체 반응 및 21일에 항원 공격이후 이차 반응을 발생시킨다는 것을 입증한다(도 14C). 하지만, 현저한 함텐-특이적인 IgM, IgG 또는 IgA 항체 반응은 항원으로 면역접종되거나 제-공격된 CD19 mAb-치료된 생쥐 내에서 검출되지 않았다. 이차 항체 반응에 대한 B 세포 고갈을 평가하기 위하여, 생쥐는 DNP-KLH로 면역접종하고 14일(화살표)후, 항-CD19 항체로 치료하였다(도 14D). 21일에, 혈청 IgM, IgG, IgA 항-DNP 항체 반응은 CD19 mAb-치료된 생쥐 내에서, 대조 mAb로 치료된 면역접종된 생쥐에서보다 낮은 수준으로 감소하였다. 하지만, 21일에 대조 mAb-치료된 생쥐의 DNP-KLH로 제-공격은 현저한 이차 항체 반응을 유도하는 반면, CD19 mAb-치료된 생쥐는 DNP-KLH 재공격이후 항-DNP 항체를 생산하지 않았다. 따라서, CD19 mAb-유도된 B 세포 고갈은 일차와 이차 항체 반응을 모두 현저하게 축소시키고, 체액 면역 반응 동안 클래스-전환을 예방하였다.

[0506] 7. 실시예 6: 항-CD20 항체 치료와 공동으로 항-CD19 항체 치료

[0507] 본 실시예에 기술된 측정법은 다른 복합이나 공액체 요법, 예를 들면, 화학요법, 독소요법 또는 방사선요법과 공동으로 항-CD19 항체가 유의한 효과, 예를 들면, B 세포의 부가적인 고갈을 나타내는 지를 결정할 수 있다. 동물 모형에서 검사된 복합 요법의 결과는 당분야에 널리 공지된 수단에 의해 인간에 상관될 수 있다.

[0508] 항-CD20 항체는 생체내에서 인간과 생쥐 B 세포를 고갈시키는데 유효하다. 이런 이유로, 항-CD19(FMC63) 및 항-CD20(MB20-11) 항체와의 공동 치료의 이점은 이러한 치료가 B 세포 고갈을 강화시키는 지를 결정함으로써 평가하였다. 생쥐는 2 μ g 최적화 용량의 각 항체 단독 또는 1 μ g에서 양쪽 항체의 조합으로, 또는 통합된 2 μ g 용량으로 치료하였다. 도 15에서는 0일에, 대조(250 μ g), FMC63(CD19, 2 μ g), MB20-11(CD20, 2 μ g), FMC63+MB20-11(각각 1 μ g), 또는 FMC63+MB20-11(각각 2 μ g) 항체로 치료된 TG-1^{+/-} 생쥐에 대한 결과를 보여준다. 혈액 B 세포 수는 0시, 1시, 1일, 4일, 7일에 측정하였다. 조직 B 세포 수는 7일에 측정하였다. 수치는 3마리 생쥐의 군

으로부터 평균(\pm SEM)을 나타낸다. 도 15에 도시된 결과는 항-CD19와 항-CD20 항체의 공동 치료가 유익하다는 것을 입증한다. 1 μ g에서 양쪽 항체의 조합으로 치료된 생쥐에서 B 세포 고갈은 2 μ g의 각 개별 항체로 생쥐의 치료이후 관찰되는 고갈과 비교하여 중간 정도이거나 유사하였다(도 15). 하지만, 2 μ g에서 양쪽 항체로 생쥐의 공동 치료는 항체 단독에서 관찰되는 것보다 훨씬 많은 B 세포 고갈을 유도하였다. 따라서, 통합된 항-CD19와 항-CD20 항체 요법은 B 세포 고갈을 강화시키는 유익한 효과를 결과하였다. 이는 아마도, 개별 B 세포의 표면 상에서 더욱 치료 효과적인 항체 분자의 축적에 기인하는 것으로 생각된다.

[0509] **8. 실시예 7: 피하(S.C.) 항-CD19 항체 투여가 치료 효과적이다**

[0510] 본 실시예에 기술된 측정법은 항-CD19 항체의 피하 경로 투여가 B 세포를 효과적으로 고갈시킬 수 있는지를 결정하는데 이용될 수 있다. 동물 모형에서 검사된 상이한 전달 경로의 효능의 결과는 당분야에 널리 공지된 수단에 의해 인간에 상관될 수 있다.

[0511] i.v. 제공된 항-CD19 항체가 순환과 조직 B 세포를 효과적으로 고갈시키기 때문에, s.c. 또는 i.p. 제공된 항-CD19 항체가 B 세포를 동등한 정도로 고갈시키는 지를 평가하였다. 야생형 생쥐는 250 μ g에서 FMC63 항체를 피하(s.c), 복강내(i.p.) 또는 i.v. 제공하였다. 수치는 유세포분석법에 의한 평가에서, 7일에 평균(\pm SEM) 혈액(mL당), 골수, 비장, 림프절, 복강 B220⁺ B 세포 수($n \geq 3$)를 나타낸다. 대조와 비교하여, 각 생쥐 군에 대한 평균 결과간 유의한 차이는 아래와 같이 표시된다; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 도 16에서 결과는 CD19 항체의 피하(s.c), 복강내(i.p.), i.v. 투여가 생체내에서, 순환과 조직 B 세포를 효과적으로 고갈시킨다는 것을 입증한다. 250 μ g의 항-CD19 항체가 i.v., i.p., 또는 s.c. 제공된 생쥐 내에서 대다수의 순환과 조직 B 세포가 고갈되었다(도 16). 예상치 않게, i.p. 제공된 항-CD19 항체는 i.v. 치료보다 더욱 효과적으로 복막 B 세포를 고갈시키지는 못하였다. 따라서, 항-CD19 항체는 ≤ 64 mg s.c. 주사로서 제공되는 경우에 순환과 조직 B 세포 모두를 효과적으로 고갈시킬 수 있다. 항-CD19 항체가 10 μ g i.v. 용량에서도 효과적이기 때문에(도 10D), 이보다 낮은 s.c 항체 용량이 효과적일 것으로 생각된다.

[0512] **9. 실시예 8: 항-CD19 항체 치료는 생체내에서 종양 성장을 소멸시킨다**

[0513] 인간에서 B 세포 악성종양인 버키트 림프종은 c-myc 프로토-종양유전자(proto-oncogene)의 Ig 유전자 프로모터 영역으로의 전좌로 특성화되는데, 이는 이상형 c-Myc 과다-발현을 유발한다. 유사하게, c-myc 프로토-종양유전자가 Ig 중쇄 인핸서(enhancer)의 통제 하에 있는 E μ -cMyc 유전자도입(cMycTG) 생쥐는 조기에 침습성 B 세포-유래된 림프종이 발병하고, 20주령까지 대략 90% 치사율을 나타내며, 대략 12주의 평균 생존 연령을 갖는다(Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988); Adams et al., Nature 318:533(1985)). c-MycTG 생쥐로부터 종양은 특정 B 세포 발달 단계에 국한되지 않고, 전구-B 또는 미성숙 B 세포의 특징적인 Ig 유전자 재정렬과 표현형을 나타낸다(Adams et al., Nature 318:533(1985)). 생체내에서 CD19-지향된 면역요법의 효능을 평가하기 위하여, hCD19TG-1^{+/+}과 cMycTG 생쥐를 교배하여 조기에 침습성 B 세포-유래된 림프종이 발병하는 hCD19TG-1^{+/-} cMycTG^{+/-} 생쥐를 산출하였다. 1마리의 생쥐로부터 유래된 종양 세포는 분리하고, 시험관내에서 확장하고, hCD19⁺ 및 생쥐 CD19⁺ CD20⁻ CD43⁻ IgM⁺ IgD⁻ B220⁺ 림프아구(lymphoblast)인 지를 표현형적으로 특성화하는데, 이들은 c-mycTG^{+/-} 생쥐에서 발생하는 프리-B/미성숙 B 세포 종양의 전형이다(Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988); Adams et al., Nature 318:533 (1985)). hCD19TG-1^{+/-} c-mycTG⁺ 생쥐로부터 종양 세포(10^5)는 0일에 20마리의 Rag^{-/-} 생쥐 내로 i.v. 이식하였다. 동수의 무작위로 선별된 생쥐를 1일과 7일에, FMC63(채워진 원) 또는 대조(비어있는 원) 항체(250 μ g)로 치료하였다. 도 17A에서는 6주 기간 동안 유세포분석법으로 정량된 순환 종양 세포(\pm SEM)의 수를 도시하고, 도 17B에서는 7주 기간 동안 생쥐 생존율을 도시한다. 각 수치는 검사 일에 생존한 생쥐의 비율을 지시한다. 도 17에서 결과는 항-CD19 항체 치료가 생체내에서 hCD19⁺ 림프종 성장을 저해한다는 것을 입증한다. 이들 종양 세포의 20마리 Rag^{-/-} 생쥐 내로 이식은 대조 mAb로 치료된 10마리의 무작위로 선별된 수용자에서 2주 시점에 순환 생쥐 CD19⁺와 B220⁺ 림프아구의 출혈 및 3.5주 시점에 폐사를 유발하였다. 대조적으로, 종양 이식이후 10마리 생쥐의 항-CD19 항체의 치료(1일과 7일)는 최대 7주 동안 10마리의 모든 수용자에서 순환 종양 세포의 출현을 예방하였다. 1마리의 항-CD19 항체-치료된 생쥐가 채혈 기간 동안 폐사하였지만 순환 종양 세포를 결코 보이지 않았다. 따라서, 항-CD19 항체 치료는 B 세포 계열 악성종양을 앓는 환자, 특히, CD20을 발현하지 않거나 CD20을 낮은 수준으로 발현하는 종양을 앓는 환자를 치료하는데 효과적인 치료제를 제공한다.

- [0514] 본 발명은 본 명세서에 기술된 특정 구체예의 범위에 결코 한정되지 않는다. 실제로, 본 명세서에 기술된 것들 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상기한 상세한 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이런 변형은 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 속한다.
- [0515] 본 명세서에 언급된 다양한 간행물은 순전히 참고로 한다.
- [0516] 본 발명은 본 명세서에 기술된 특정 구체예의 범위에 결코 한정되지 않는다. 실제로, 본 명세서에 기술된 것들 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상기한 상세한 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이런 변형은 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 속한다.
- [0517] 본 명세서에 언급된 다양한 간행물은 순전히 참고로 한다.

수탁번호

[0518]

기탁기관명 : AMERICA TYPE CULTURE COLLECTION

수탁번호 : PTA-6580

수탁일자 : 20050211

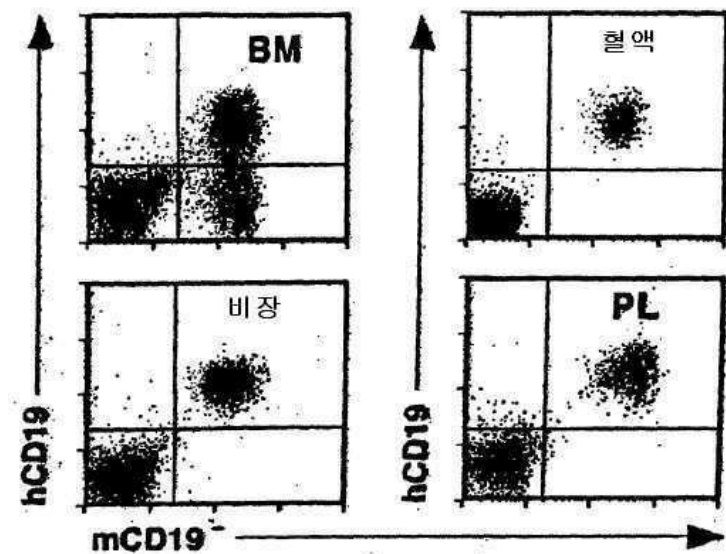
기탁기관명 : AMERICA TYPE CULTURE COLLECTION

수탁번호 : PTA-6581

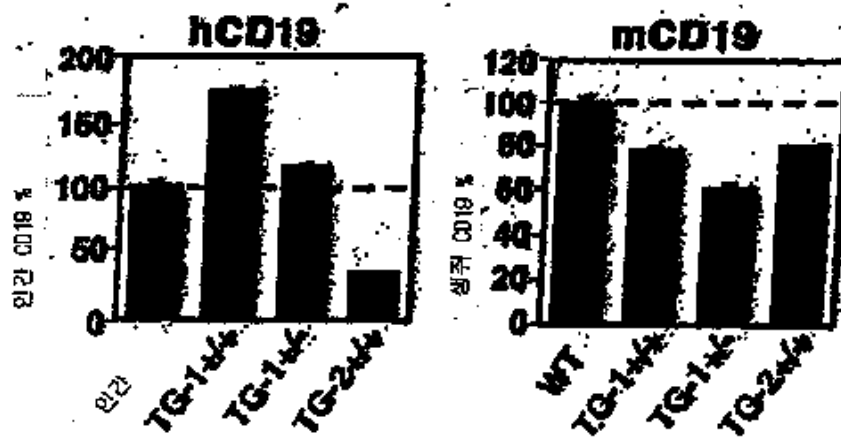
수탁일자 : 20050211

도면

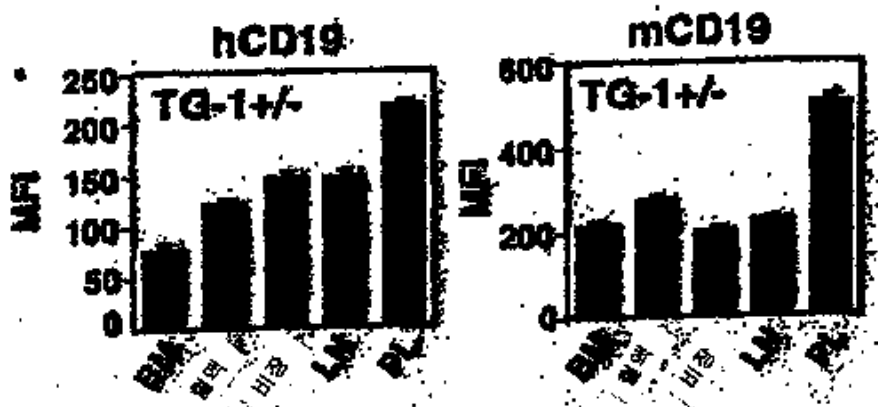
도면1a



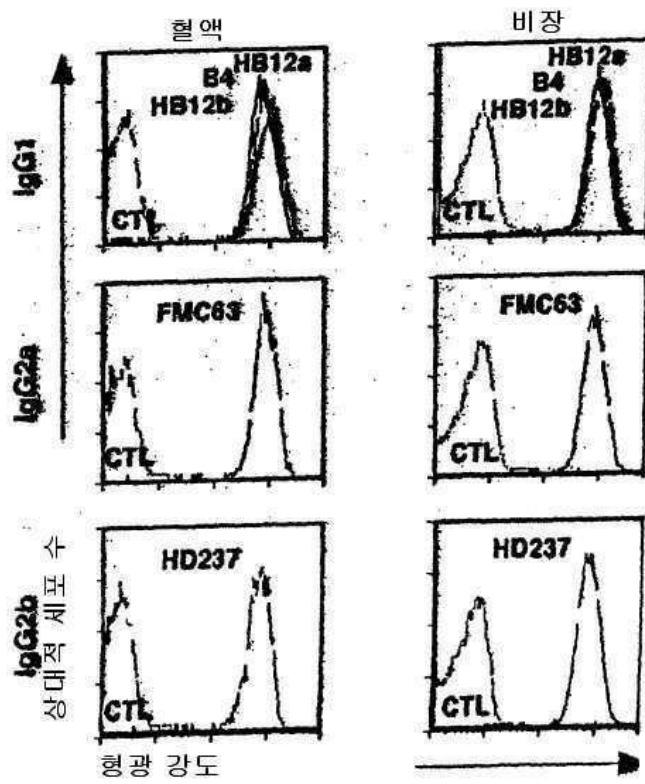
도면1b



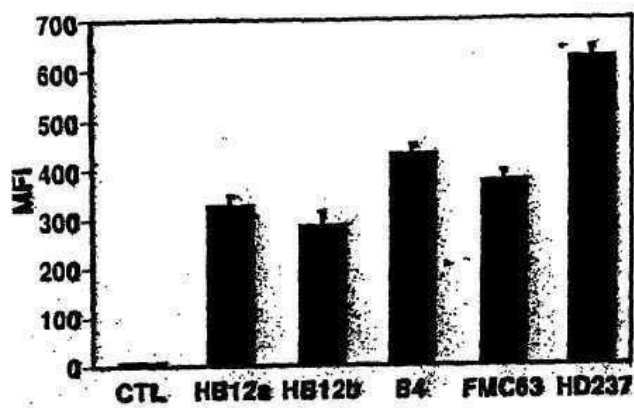
도면1c



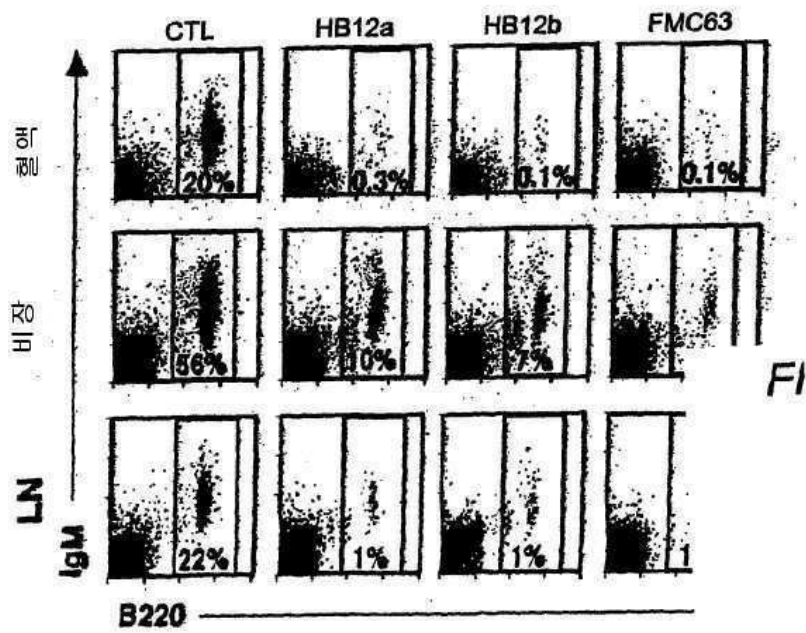
도면1d



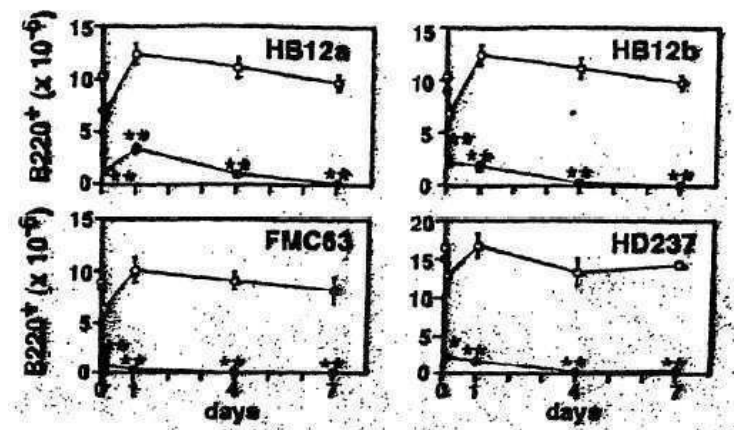
도면1e



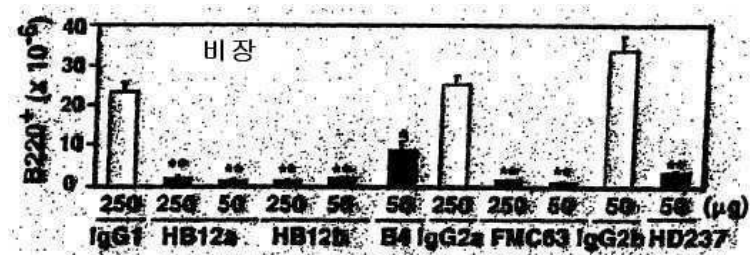
도면2a



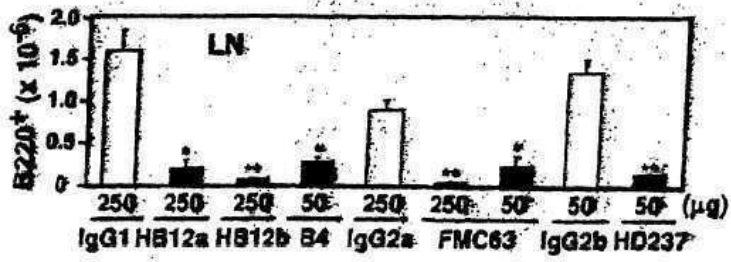
도면2b



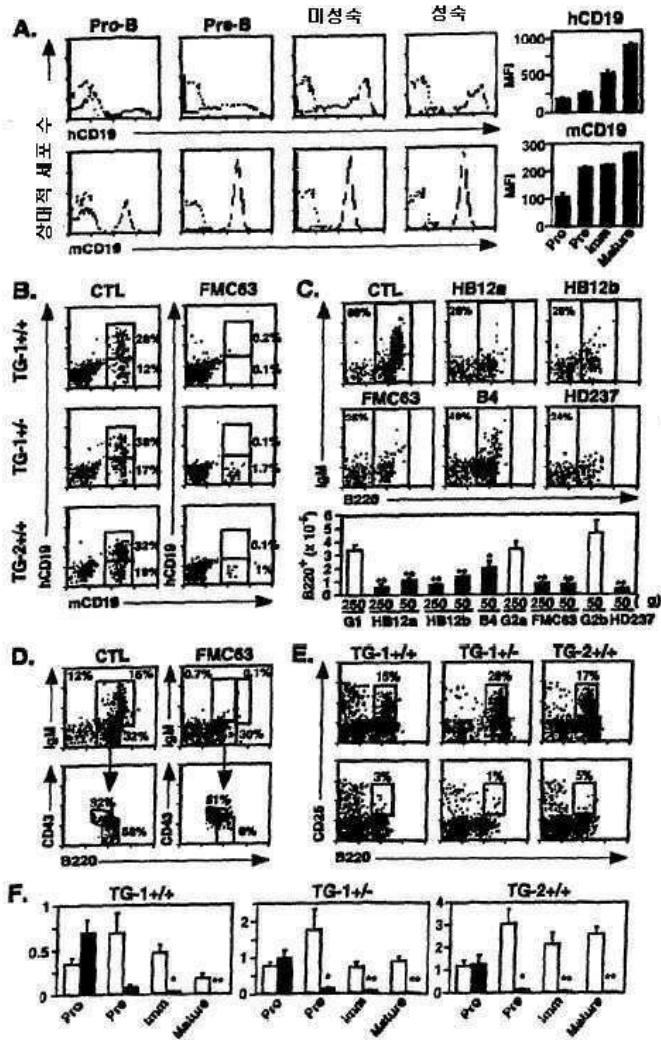
도면2c



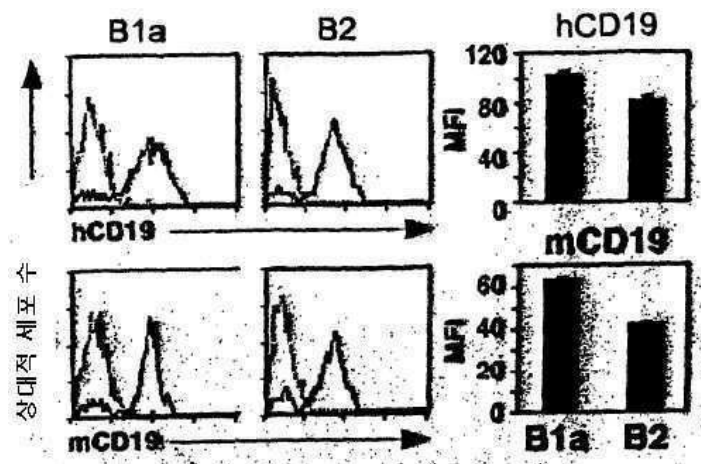
도면2d



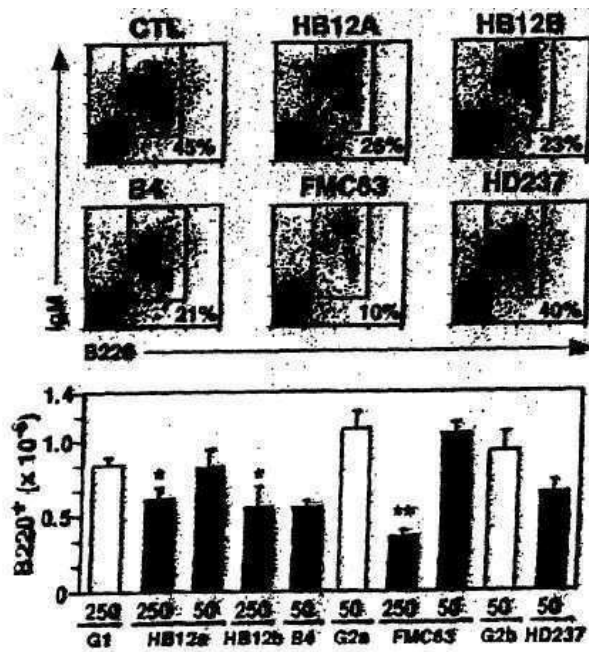
도면3



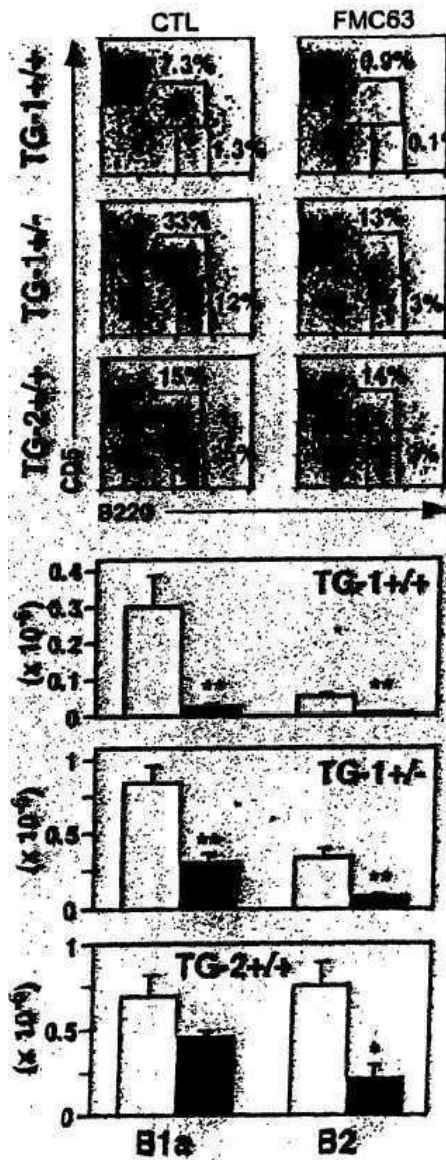
도면4a



도면4b



도면4c



도면5a

HB12a HC

```

1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
GAA TTC GAG GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG 60

21      30      38
K M S C K A S G Y T F T S Y V M H W V K
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT AGC TAT GTT ATG CAC TGG GTG AAG 120

41      50      58
Q K P G Q G L E W I G Y F N P Y N D G T
CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT TTT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT 180

61      70      78
D Y Y E K F K G K A T L T S D K S S S T
GAT TAC TAT GAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA 240

81      90      98
A Y M A L S S L T S E D S A V Y Y C A R
GCC TAC ATG GCG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA 300

101     110     118
G T Y Y Y G S S Y P F D Y W G Q G T T L
GGG ACC TAT TAC TAC GGT AGT AGC T AC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC 360

122
T V S S
ACA GTC TCC TCA G 373
  
```

도면5b

HB12b HC

```

      1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
GAA TTC GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG 60

      21      30      38
K I S C K A S G Y A F S S S W M N W V I
AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG ATA 120

      41      50      58
Q R P G Q G L E W I G R I Y P G D G D T
CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT 180

      61      70      78
N Y N G K F K G K A T L T A D K S S S T
AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGT ACA 240

      81      90      98
A Y M Q L S S L T S V D S A V Y F C A R
GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA 300

      101      110      118
S G F I T T V L D F D Y W G H G T T L T
TCA GGA TTT ATT ACT ACG GTT TTA G AC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC ACT CTC ACA 360

      121
V S S
GTC TCC TCA G 370
  
```

도면6a

HB12a LC

```

CATGGACTGAAGGAGTAGAAAACTGATCACTCTCCTATGTTTATTTCTCCTCAAAATG 56

H S P A Q F L F L L V L W I Q E T N G
ATG AGT CCT GCC CAG TTC CTG TTT CTG TTA GTG CTC TGG ATT CAG GAA ACC AAC GGT 113

      1      10      20
D V G M T Q T P L T L S V T I G Q P A S
GAT GTT GGG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTC ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCT 173

      21      30      40
F S C K S S Q S L L Y S N G K T Y L N W
TTC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA TAT AGT AAT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG 233

      41      50      60
L L Q R P G Q S P K R L I H L V S K L D
TTA TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC CAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC 293

      61      70      80
S G V P D R P T G S G S G T D F T L K I
TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC 353

      81      90      100
G R V E A E D L G V Y Y C V Q G T H F P
GGC AGA GTG CAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT TTT CCG 413

      101      110      120
Y T F G G G T K L E I K R A D A A P T V
TA C ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTA GAA ATA AAA C GG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA 473

      121      127
S I F P P S S
TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT 494
  
```

도면6b

HB12D LC

CATGGACTGAAGGAGTAGAAAAAGCATTCCTCTCTCCAGTTCTCAGAG 47

M E K D T L L L W V L L L W V P G S T G 107
ATG GAG AAA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTC CTG CTT CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACA GGT

1 D I V L T Q S F T S L A V S L G Q R A T 20
GAC ATT GTG CTG ACG CMG TCT CCA ACC TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CMG AGG GCC ACC 167

21 I S C R A S E S V D T F G I S F M N W F 40
ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT ACT TTT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC 227

41 Q Q K P G Q P P K L L I H A A S N Q G S 60
CAA CMG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC CAT GCT GCA TCC AAT CAA GGA TCC 287

61 G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H 80
GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGT AGT GGG TCT GGG ACG GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 347

81 P M E E D D S A M Y F C Q Q S K E V P F 100
CCT ATG GAG GAG GAT GAT AGT GCA ATG TAT TTC TGT CMG CAA AGT AAG GAG GTT CCA TT C 407

101 T F G S G T K L E I K R A D A A P T V S 120
ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCG 467

121 I F P P S S 126
ATC TTC CCA CCA TCC AGT 485

도면7a

	1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	60	70	80
Conse.	EVQLQESGP	ELVKPGAS	VRMSCKAS	GYTFTS	YVMD	AVKQKPG	QGLEWIG	YFNYFD	GTQY	NEKFKG	KATLTSDKSSSTAYM
HB12a
4G7
HB12b
HD37
B43
FMC63

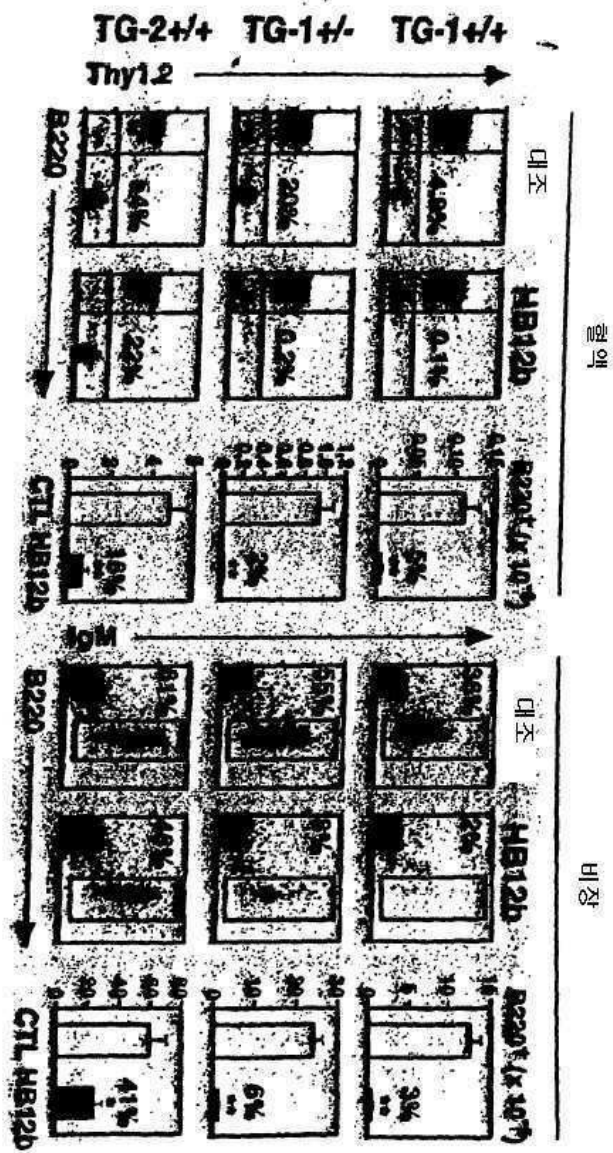
	90	100	CDR3	110	120	130	140	150	160	170	180
Conse.	ALSSLTSE	DSAVVYCA	NGTYYG	SSVYF	PDYNG	GTTLTV	SS	124	(SEQ ID NO:5)		
HB12a
4G7
HB12b
HD37
B43
FMC63

도면7b

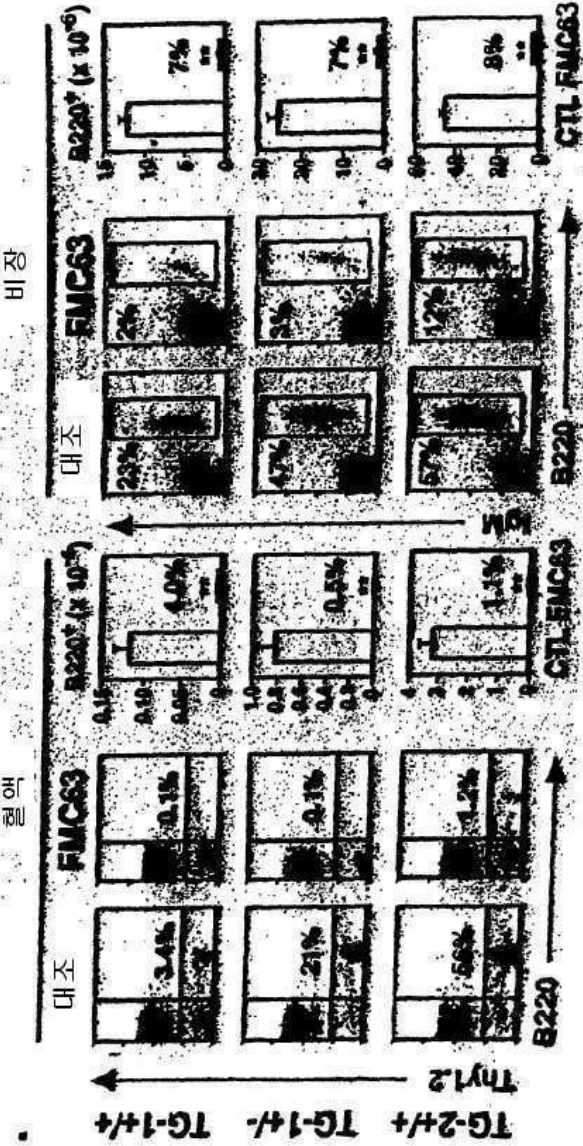
	1	10	20	CDR1	30	40	50	CDR2	60
Conse.	DIVMTQT	PASLAV	SLGORAT	ISCKASQ	SVDTY	NGDSYLA	WYQOR	PGQPPK	LLIYDASN
HB12a
4G7
B43
HD37
HB12b
FMC63

	70	80	90	CDR3	100	110	120	130	140	150	160
Conse.	VPDRFSG	SGSGTDF	TLNHP	VEKEDAA	TYTCQ	OSTED	PFYF	GGGK	LEIKR	AD	(SEQ ID NO:10)
HB12a
4G7
B43
HD37
HB12b
FMC63

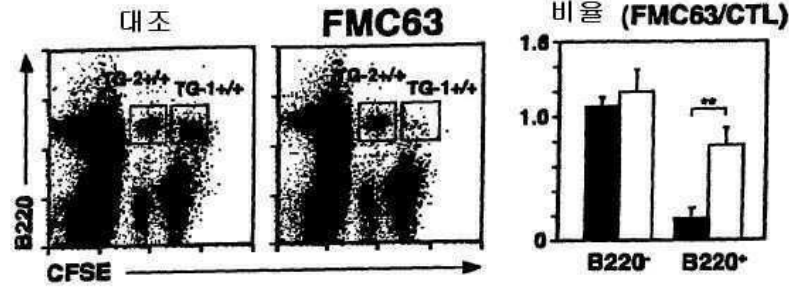
도면8a



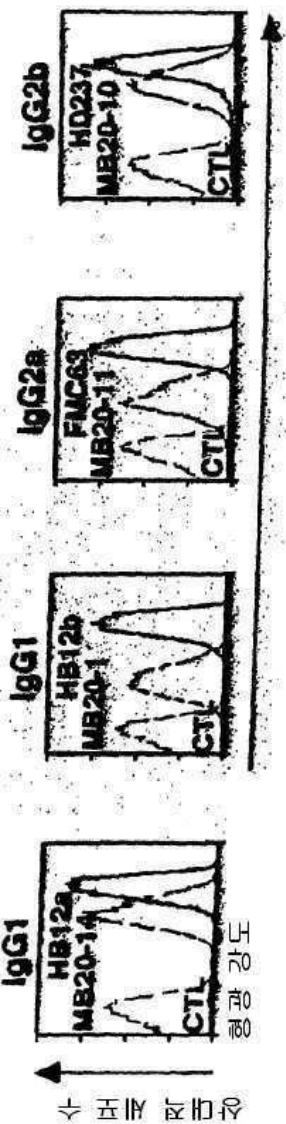
도면8b



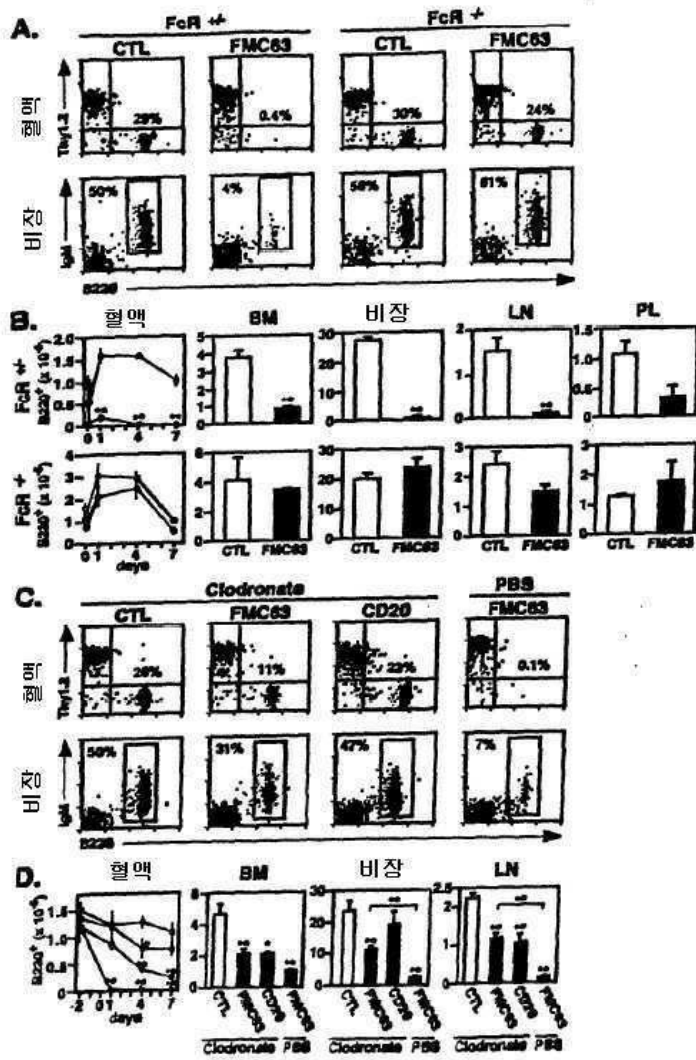
도면8c



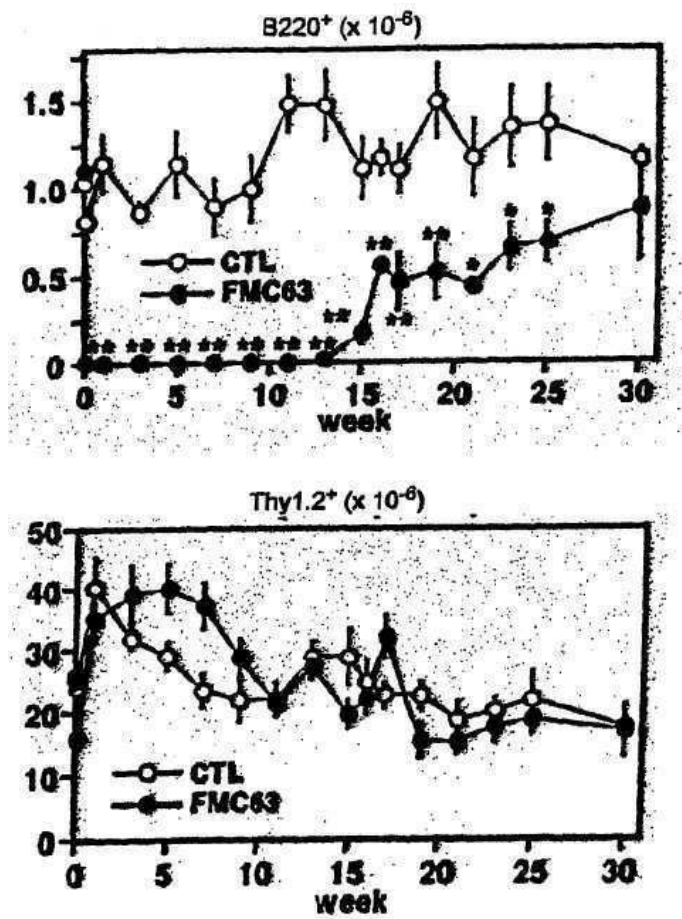
도면8d



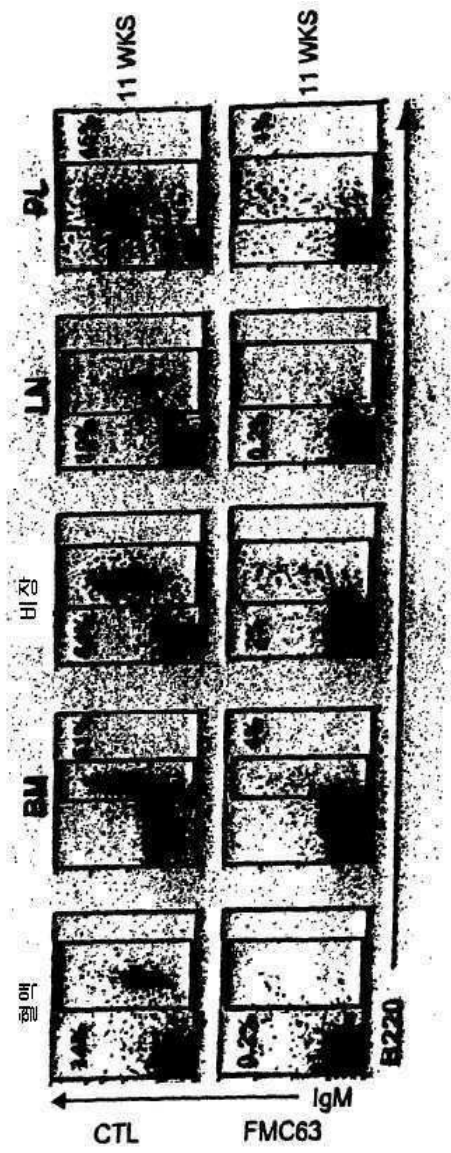
도면9



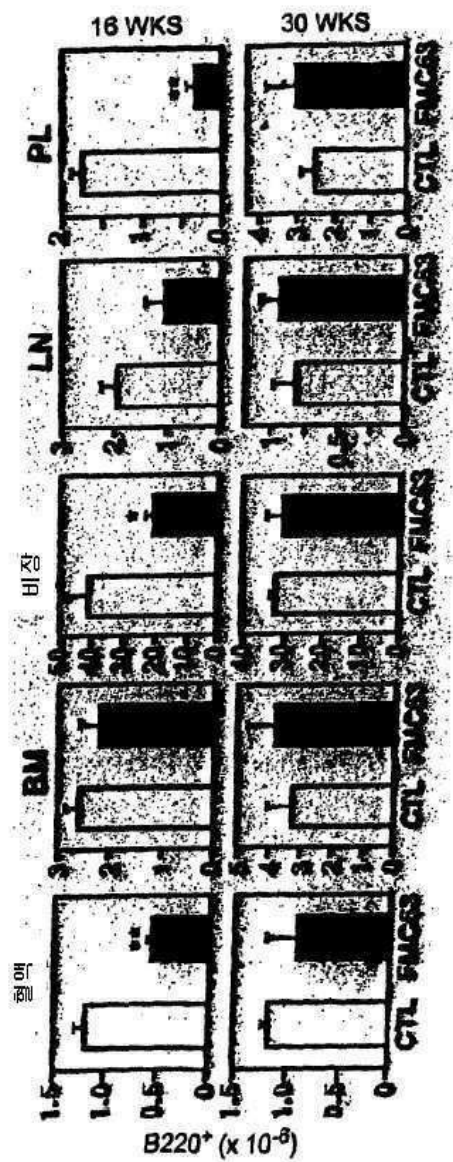
도면10a



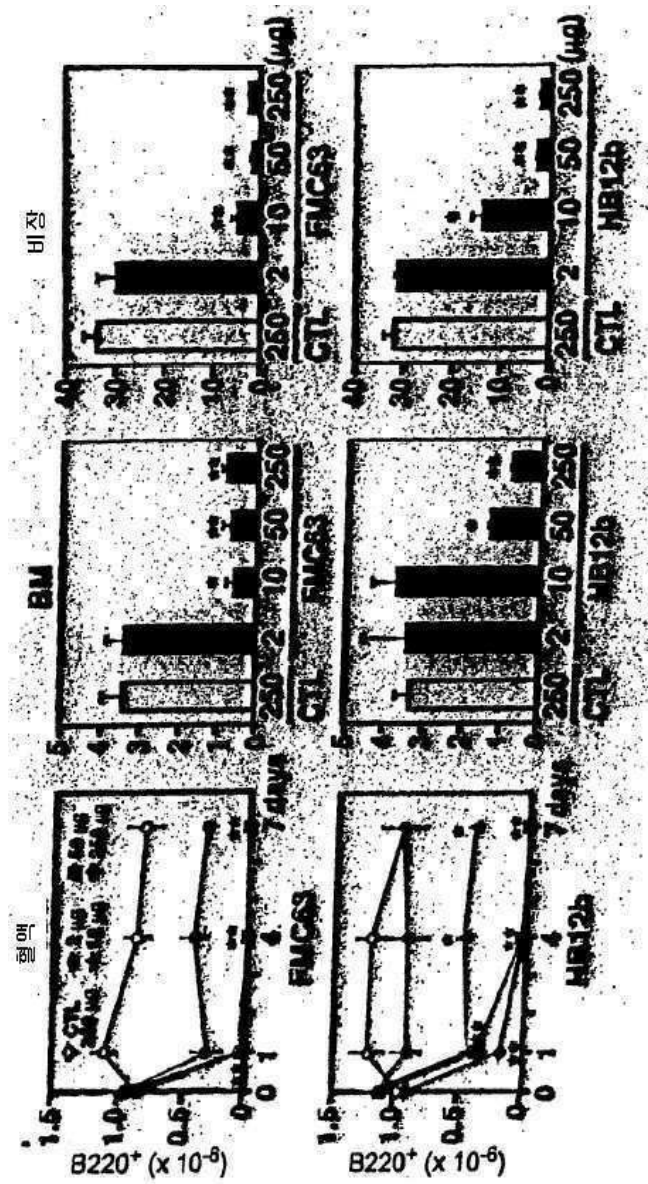
도면10b



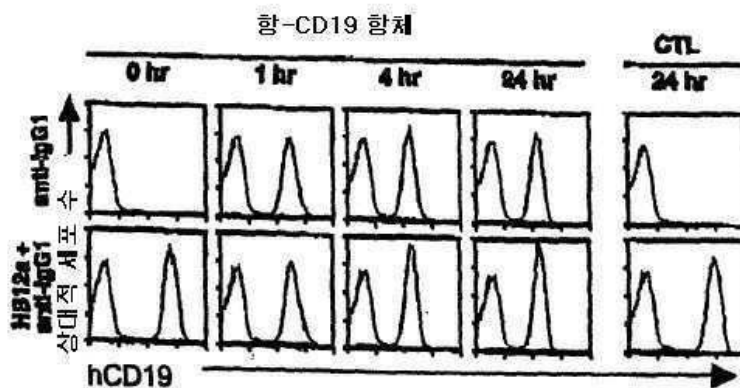
도면10c



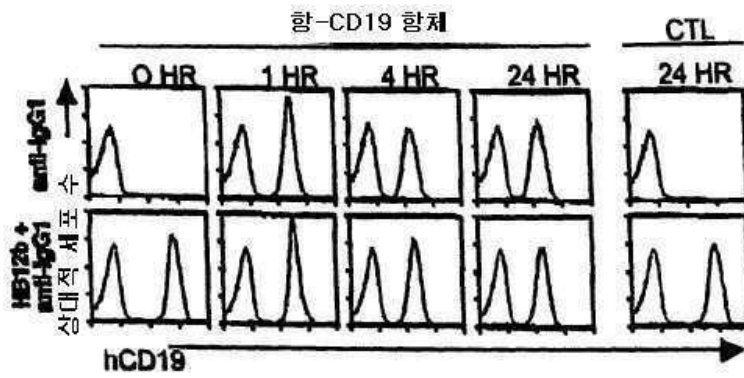
도면10d



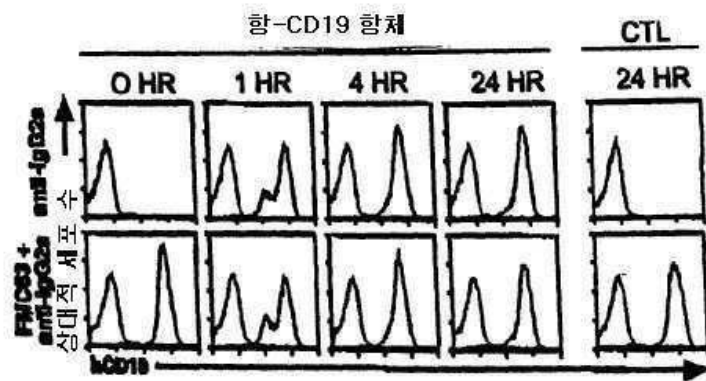
도면11a



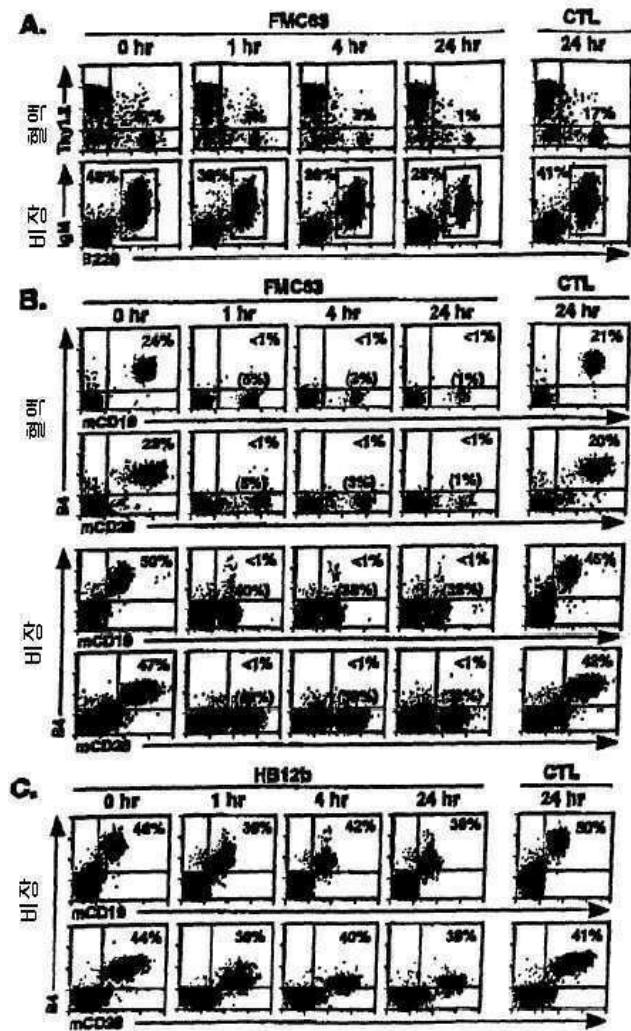
도면11b



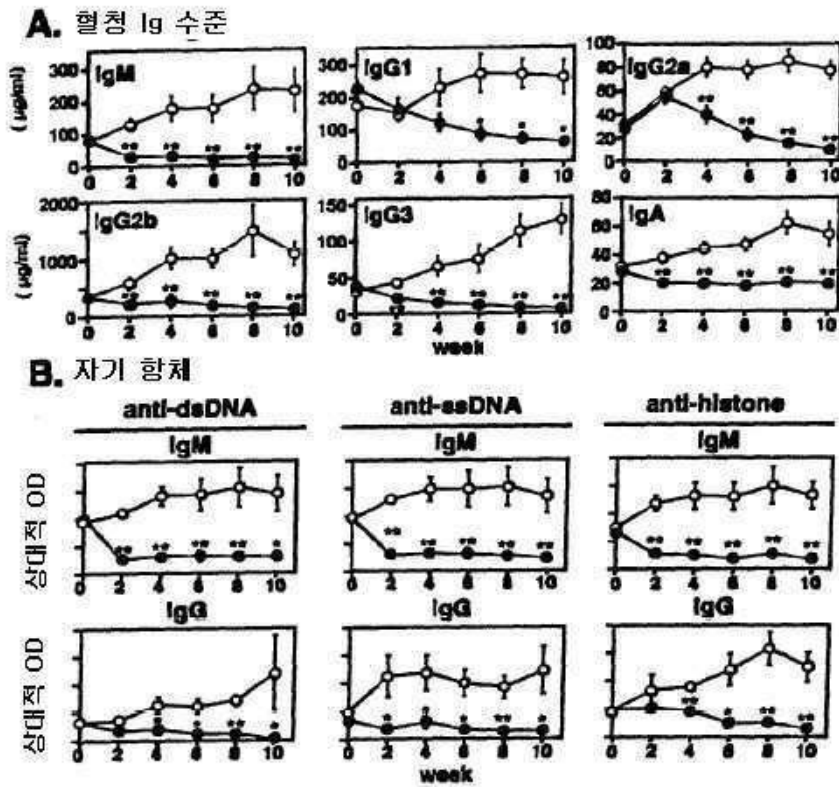
도면11c



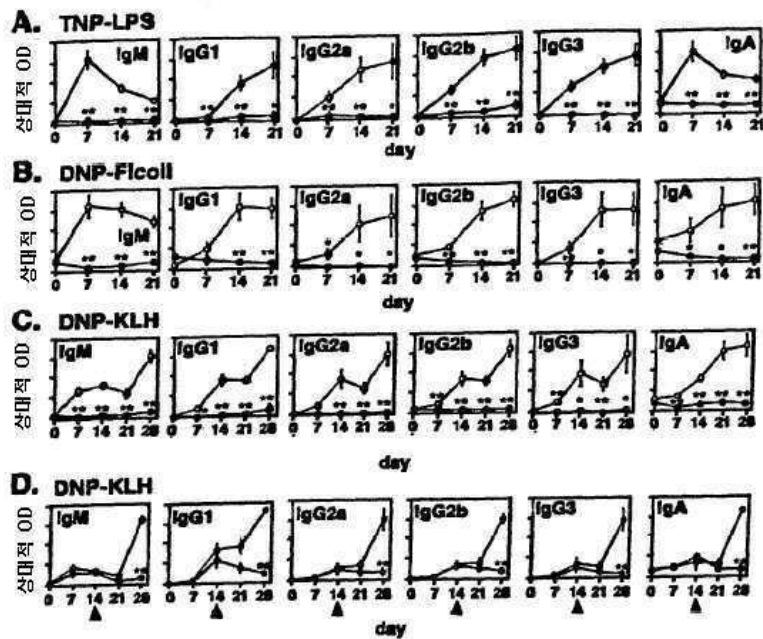
도면12



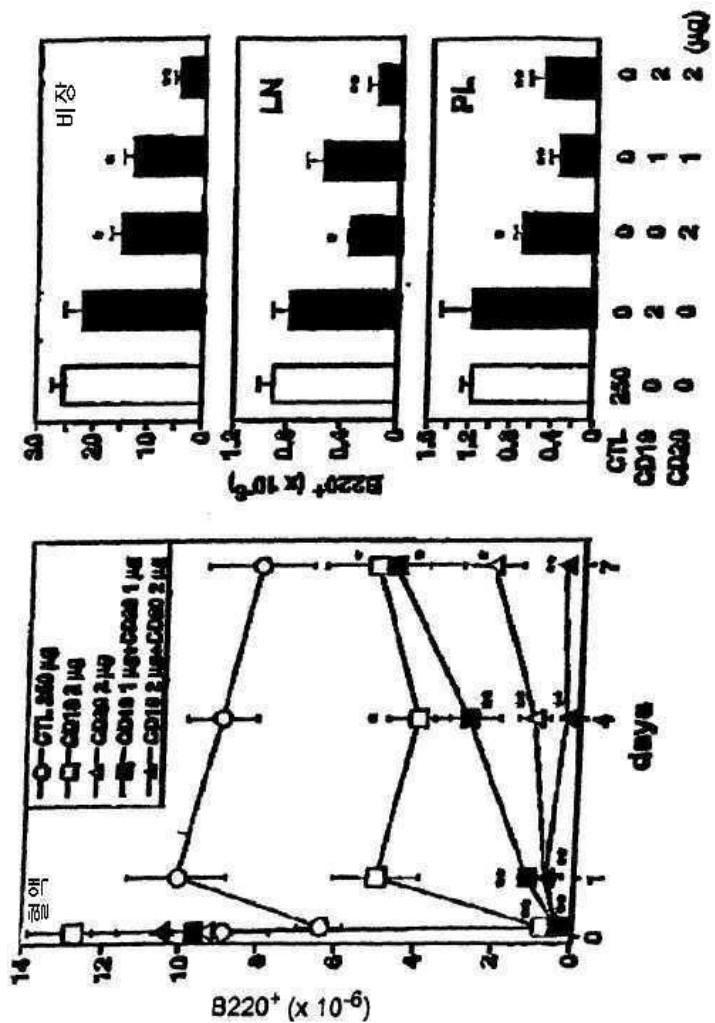
도면13



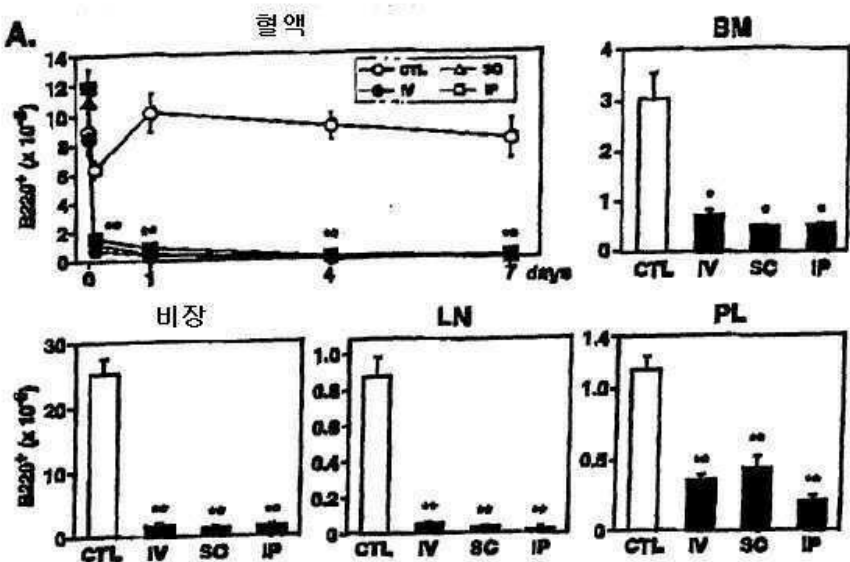
도면14



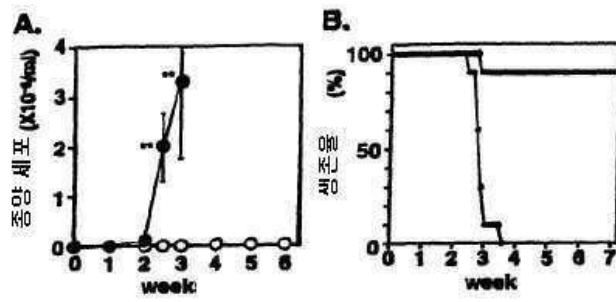
도면15



도면16



도면17



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)