(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월13일
(11) 등록번호 10-0837715
(24) 등록일자 2008년06월05일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7006991(분할)
(22) 출원일자 2007년03월28일
심사청구일자 2007년04월27일
번역문제출일자 2007년03월28일
(65) 공개번호 10-2007-0050979
(43) 공개일자 2007년05월16일
(62) 원출원 특허 10-2001-7013313
원출원일자 2001년10월19일
심사청구일자 2005년04월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/010781
국제출원일자 2000년04월21일
(87) 국제공개번호 WO 2000/64474
국제공개일자 2000년11월02일
(30) 우선권주장
60/130,847 1999년04월22일 미국(US)
60/137,214 1999년06월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
국제공개특허공보 제9718838호
전체 청구항 수 : 총 12 항

(73) 특허권자
바이오겐 아이덱 엠에이 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02142 캠브리지 캠브리지 센터 14
(72) 발명자
갓월스 필립
미국 매사추세츠 02132 웨스트 록스베리 라그란지 스트리트 692
로브 로이 알.
미국 매사추세츠 02090 웨스트우드 캔톤 스트리트 569
(74) 대리인
강승옥, 김성기, 김진희

심사관 : 박정민

(54) 인테그린 알파-4 서브유닛의 길항 물질을 사용하는섬유증의 치료 방법

(57) 요 약

본 발명은 인간 또는 동물 개체에서 섬유증의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 유효량의 VLA-4 인테그린 또는 이의 절편에 대한 길항 물질을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 레소토, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

특허청구의 범위

청구항 1

초 후기 항원-4(Very Late Antigen-4; VLA-4) 및 알파4 베타7 둘다와 이들 각각의 알파4 리간드와의 상호 작용을 길항시키는 항-알파4 항체 상동체 또는 VLA-4와 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 항-알파4 항체 상동체 또는 알파4 베타7과 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 항-알파4 항체 상동체의 유효량을 포함하는, 섬유증을 보유하는 개체를 치료하기 위한 약학 조성물로서, 상기 항-알파4 항체 상동체는 인간화된 항체, 인간 항체 또는 키메라 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물이 체중 1 ㎏당 0.1~20 ㎎으로 제공되기 위한 투여량으로 투여되도록 구성되는 것인 조성물.

청구항 4

알파4 서브유닛 보유 인테그린과 알파4 서브유닛 보유 인테그린에 대한 리간드 사이의 상호 작용을 길항시키는 항-알파4 항체 상동체의 유효량을 포함하는 섬유증 치료용 약학 조성물로서, 상기 항-알파4 항체 상동체는 인간화된 항체, 인간 항체 또는 키메라 항체이고, 상기 조성물은 개체의 기관지 폐포 세척액 중 백혈구의 섬유증 유도성 증가를 감소시키기에 유효한 것인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항체 상동체가 VLA-4 및 알파4 베타7 둘다와 이들 각각의 리간드와의 상호작용을 길항시키거나 또는 VLA-4와 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키거나 또는 알파4베타7과 이의 리간드와의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 조성물이 개체의 체중을 기준으로 하여 체중 1 ㎏당 0.1~20 ㎎으로 제공되기 위한 투여량으로 투여되도록 구성되는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물이 체중 1 ㎏당 0.1~30 ㎎의 소분자 투여량으로 제공되기 위한 유효량으로 투여되도록 구성되는 것인 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 VLA-4 및 알파4 베타7 둘다와 이들 각각의 알파4 리간드와의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 VLA-4와 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 알파4 베타7과 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 16

제5항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 VLA-4 및 알파4 베타7 둘다와 이들 각각의 알파4 리간드와의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 17

제5항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 VLA-4와 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

청구항 18

제5항에 있어서, 상기 항-알파4 항체 상동체가 알파4 베타7과 이의 리간드의 상호 작용을 길항시키는 것인 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<1> **관련 출원**

<2> 본 출원은 1999년 4월 22일자로 출원된 가출원 제60/130,847호 및 1999년 6월 1일자로 출원된 가출원 제60/137,214호의 우선권 주장 출원이다.

<3> **배경 기술**

<4> 피브로넥틴 및 콜라겐은 결합 조직에서 관찰되는 세포외 기질의 완전성 (integrity)을 유지시키는데에 필수적인 단백질이다. 상기 단백질의 생성은 고도로 조절된 과정으로서, 이러한 과정에 장애가 생기면 조직 섬유증이 유발될 수 있다. 섬유 조직의 형성은 상처를 입은 이후에 진행되는 정상적인 유익한 치료 과정중의 일부인 반면에, 몇몇 경우에는 섬유 물질이 비정상적으로 축적되어 궁극적으로 기관에 해를 입힐 수 있다(Border 등의 문헌(1994), *New Engl. J. Med.* 331:1286-1292). 어떤 기관에 상처를 입으면 상동증성 생리학적 반응이 유발된다: 염증 세포 및 활성화된 섬유아세포의 유입이 수반되는 혈소판 유도성 지혈 작용. 상기 세포 유형들로부터 유래된 시토킨은 새로운 세포외 기질 및 혈관을 형성한다(육아 조직). 육아 조직의 생성은 프로테아제 억제제 및 세포외 기질 단백질의 발현이 상향 조절된 매우 정교하게 짜여진(carefully orchestraed) 프로그램이며, 이러한 프로테아제의 발현이 감소되면 세포외 기질을 축적시키게 된다.

<5> 유도성이거나 또는 자발적이거나 상관없이, 섬유증의 발병에 주요한 요소는 섬유아세포 활성의 촉진이다. 상처 입은 기관으로 염증 세포 및 활성화된 섬유아세포의 유입은 주로 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진 세포간 기질과 상호 작용하는 이들 세포 유형들의 능력에 의존성이다. 이들 세포-세포 또는 세포-세포외 기질의 상호 작용은 세포 부착 분자의 몇몇 패밀리를 통하여 매개되며, 상기 패밀리중 하나는 인테그린을 포함한다. 인테그린은 실질적으로 모든 포유 동물 세포 유형에서 여러가지 조합으로 발견되는 다양한 알파(알파1, 알파2로부터 현재 알파11 까지) 및 베타(베타1 및 베타7) 헤테로이량체성 경막 수용체 도메인으로 이루어진 구조적 및 기능적

으로 관련된 당단백이다(참조 문헌: E.C.Butcher, Cell, 67, 1033(1991); D.Cox 등의 문헌, "The Pharmacology of the Integrins"; Medicinal Research Rev. Vol.195(1994) 및 V.W.Engleman 등의 문헌, "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets" in Ann. Revs. Medicinal Chemistry, Vol.31, J.A.Bristol, Ed.; Acad. Press, NY, 1996, p.191). 2개의 알파4 서브유닛 함유 인테그린은 이미 기술된 바 있으며 각각 알파4베타1(VLA-4) 및 알파4베타7로서 명명된다.

<6> 간질성 폐 섬유증(IPF)은 폐의 유연성을 감소시키고 생체 가스 교환 기능을 손상시키는 다수의 간질성 폐병의 최종 단계이다. 병인학과는 상관없이, IPF는 폐의 염증성 및 섬유 증식성 변화와 간질내 콜라겐의 과다 축적을 특징으로 한다. 활성 폐 섬유증이 진행중인 IPF 환자에는 일반적으로 보충된 면역 세포 및 염증 세포가 존재하는데, 이는 곧 폐의 섬유증이 초기의 염증성 손상 이후의 비정상적 치료의 결과임을 시사하는 것이다. 보충된 염증성 세포는 다수의 경우에 초기 손상과 관련된 것으로 보인다. 더욱이, 상기 세포들은 수복 과정의 조절에서 복잡한 역할을 수행할 수 있다. 상기 두가지 경우중 하나의 경우에서, 폐로의 면역 세포 및 염증 세포의 보충은 섬유증 반응의 측정에 중요한 역할을 수행할 수 있다. 염증 세포 및 활성화된 섬유아세포의 손상된 폐로의 유입은 ECM 성분과 상호 작용하는 상기 세포 유형들의 능력에 의존성이다. 백혈구의 소통 및 활성화 상태는 다양한 인테그린에 의하여 조절된다. 염증 세포의 폐로의 유입을 방지하는 것은 후속적인 섬유 증 반응을 포함하는 경우에서 중요할 수 있다.

<7> 예를 들어, 경피증과 같은 피부병을 포함하는 섬유 조직의 증식과 관련된 다수의 질병들은 만성으로서 종종 무기력증을 동반한다. 현재 수행되고 있는 상기 질병에 대한 치료법이 심각한 부작용을 나타내고 일반적으로 섬유증 진행을 지연시키거나 또는 정지시키는데에 효율적이지 못하기 때문에 폐 섬유증을 포함하여 몇몇 질병은 부분적으로는 치명적일 수 있다[Nagler 등의 문헌, 1996, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 154:1082-86]. 따라서, 신규한 섬유증 치료제(anti-fibrotic agent)에 대한 요구가 계속되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<8> **발명의 개요**

<9> 본 발명은 개체에서 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명자들은 폐 섬유증을 앓고있는 마우스에 알파1 또는 알파4 서브유닛 함유 인테그린의 길항 물질을 투여함으로써 섬유증의 병인론에서 알파1 및 알파4 함유 인테그린 길항 물질의 개연적 역할을 연구해왔다. 본 발명과 관련된 사항에서 알파1 및/또는 알파4 서브유닛 함유 인테그린이 항섬유증 치료법의 적합한 표적이 될 수 있다는 것으로 제시된 바와 같이, 상기 길항 물질은 총 콜라겐 축적량 및 폐의 섬유증 병변의 정도 둘다에 유리한 효과를 나타낸다.

<10> 본 발명의 하나의 측면은 섬유증을 보유하는 개체에 알파4 서브유닛 보유 인테그린과 알파4 서브유닛 보유 인테그린에 대한 리간드 사이의 상호 작용의 길항 물질을 포함하는 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 길항 물질은 알파4 인테그린 결합제 또는 알파4 인테그린 리간드 결합제이다. 알파4 인테그린 결합제는 a) VLA-4 및 알파4 베타7 둘다와 이들 각각의 알파4 리간드의 상호 작용을 길항시키는 항체의 상동체; b) VLA-4와 이의 알파4 리간드의 상호 작용을 길항시키는 항체의 상동체; 및 c) 알파4베타7과 이의 알파4 리간드의 상호 작용을 길항시키는 항체의 상동체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 다른 구체예에서, 상기 항체의 상동체는 인간 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 및 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<11> 본 발명의 다른 측면은, 섬유증을 보유하는 개체에 알파4 서브유닛 보유 인테그린과 알파4 서브유닛 보유 인테그린에 대한 리간드 사이의 상호 작용의 길항 물질을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 기관지 폐포 세정액 시료중 백혈구의 섬유증 유도성 증가를 감소시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 임의의 구체예에서, 알파4 인테그린 결합제는 몇몇 엄격한 조건하에서 미국 특허 제 5,840,299 호의 표 6에 나타낸 서열 군으로부터 선택된 제한된 핵산 서열에 혼성화되는 핵산을 포함하는 핵산 서열 또는 상기 핵산 서열의 상보적 서열에 의하여 암호화된다. 본 발명의 방법의 다른 측면에서, 알파4 인테그린 결합제는 제한적으로 엄격한 조건하에서 미국 특허 제 5,932,214 호에서 확인된 제한된 폴리펩티드 또는 세포주 ATCC CRL 11175에 의하여 생산되는 제한된 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드 서열을 암호화하는 핵산 서열에 혼성화되는 핵산을 포함하는 핵산 서열에 의하여 암호화된다.

<12> 전술한 문단에서 언급된 문헌들 및 이하에 개시된 인용 문헌 및 등록 특허 모두는 본원에 참고 문헌으로 인용된다.

발명의 구성 및 작용

<13> **발명의 상세한 설명**

<14> **Ⅰ. 정의**

<15> 본 발명의 주제어를 명확하고 분명하게 규명하기 위하여, 이하에 기술된 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 특정 용어들에 다음의 정의들이 제공된다.

<16> 본 발명은 이하의 정의들이 포함된 다음의 상세한 설명을 참고로 하여 기술될 것이다.

<17> 인테그린 초 후기 항원(Very Late Antigen; VLA) 슈퍼패밀리는 거의 모든 포유 동물의 세포 유형에서 여러가지 조합으로 발견되는 (알파 및 베타) 헤테로이량체성, 경막 수용체 분자로 이루어진 구조적 및 기능적으로 관련된 당단백으로 구성되어 있다(참조 문헌: E.C.Butcher, Cell, 67, 1033(1991); D.Cox 등의 문헌, "The Pharmacology of the Integrins." Medicinal Research Rev.(1994) 및 V.W.Engleman 등의 문헌, "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets" in Ann. Report in Medicinal Chemistry, Vol. 31, J.A.Bristol, Ed.; Acad. Press, NY, 1996, p 191). VLA 패밀리의 인테그린은(현재) 각각의 분자들이 알파 사슬(α1, α2, α3, α4, α5, α6 등)에 비공유 결합된 β1 사슬을 포함하는, VLA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 및 11을 포함한다.

<18> 알파4 베타1(α4β1) 인테그린은 VCAM-1, 피브로넥틴 및 가능한 기타 리간드(후자의 리간드를 개별적으로 및 집합적으로 "알파4 리간드(들)"이라 칭함)에 대한 세포 표면 수용체이다. 그러므로 본원에서 α4β1 인테그린("VLA-4" 또는 a4b1" 또는 "알파4베타1 인테그린", 상호 호환적으로 사용 가능함)이란, 당 업계의 통상의 숙련자에 의하여 VLA-4에 대한 기타의 리간드가 존재할 수 있으며 통상의 방법을 사용하여 분석될 수 있다는 사실이 이해될 것임에도 불구하고, VCAM-1에 결합할 수 있는 폴리펩티드 및 상기 세포외 기질 단백질의 일원, 특히 피브로넥틴 또는 이들의 상동체 또는 단편을 칭하는 용어이다. 그럼에도 불구하고, 상기 알파4 서브유닛은 베타1 이외의 다른 베타 서브유닛과 관련되어 있으므로 본 발명자들에 의하여, 알파4 서브유닛이 베타 서브유닛중의 하나 또는 다른것과 결합된 인테그린과 같이 "알파(α)4 인테그린" 또는 "알파(α)4 서브유닛 함유 인테그린"이라는 용어로서 정의될 수 있을 것이라는 사실이 공지되어 있다. VLA4 이외에 "알파4" 인테그린의 다른 예로서는 알파4베타7이 있다(Lobb 및 Adams의 문헌 참조, 상동). 이와 유사하게, "알파1 인테그린" 또는 "알파1 서브유닛 함유 인테그린"은 알파1 서브유닛이 베타 서브유닛중 하나 또는 다른 것과 결합된 인테그린이다.

<19> 인테그린 "길항 물질"은 알파1 및/또는 알파4 서브유닛 함유 인테그린이 인테그린 리간드 및/또는 수용체와 결합하는 것을 억제하는 임의의 화합물을 포함한다. 항인테그린 항체 또는 항체의 상동체 함유 단백질(후술함) 및 인테그린에 대한 리간드 단백질의 가용성 형태와 같은 기타 분자들이 유용하다. 상기 알파4 서브유닛 함유 인테그린에 대한 리간드 단백질의 가용성 형태로서는 가용성 VCAM-1, VCAM-1 융합 단백질 또는 이작용성 VCAM-1/Ig 융합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 인테그린 리간드의 가용성 형태 또는 이의 단편은 인테그린에 결합하도록 투여될 수 있으며, 바람직하게는 세포상의 인테그린 결합 위치에 대하여 경쟁하여, 항인테그린(예를 들어, VLA-1, VLA-4) 항체와 같은 길항 물질 투여시와 유사한 효과를 나타낸다. 특히, 리간드와 결합은 하지만 인테그린 의존성 신호 전달 현상은 나타내지 않는 가용성 인테그린 돌연변이체는 야생형 인테그린 단백질의 경쟁적 억제제로서의 작용을 나타낼 수 있으므로 "길항 물질"로 간주된다. 본 발명의 방법에 사용된 기타의 길항 물질은 이하에 정의된 바와 같이, "소분자"이다.

<20> 본 발명은 또한 소분자 또는 VLA-4 및 알파4 베타7 둘다를 길항시키는 항체의 상동체와 같은 1 이상의 알파4 서브유닛 함유 인테그린 또는 기타 알파4 서브유닛 함유 인테그린의 조합체의 작용을 길항시키는 분자들을 사용하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 1 이상의 알파1 서브유닛 함유 인테그린의 작용을 길항시키는 분자를 사용하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 조합하여 VLA-4 및 알파4 베타7 둘다 또는 기타 알파4 서브유닛 함유 인테그린의 조합체를 길항시키는 몇몇 소분자 또는 항체의 상동체를 사용하는 방법과 같은, 분자의 조합체를 사용하여 상기 조합체가 1 이상의 인테그린의 작용을 길항시키는 방법을 포함한다.

<21> 본원에 논의된 바와 같이, 임의의 인테그린 길항 물질은, 예를 들어 면역글로불린 또는 이의 단편과 같은 항체의 상동체에 융합되거나 또는 그렇지 않은 경우 이에 접합될 수 있으며, 인테그린 또는 리간드 또는 기타 분자의 특정 유형 또는 구조에 한정되지 않는다. 그러므로, 본 발명의 목적을 위하여, 키메라 단백질(이하에 정의함)을 형성할 수 있고 인테그린 리간드에 결합할 수 있으며 알파4 및/또는 알파1 서브유닛 함유 인테그린을 효과적으로 차단하거나 피복할 수 있는 임의의 제제는 본원의 실시예에서 사용된 길항 물질의 균등물인 것으로

간주된다.

<22> "항체의 상동체"는 이황화결합에 의하여 연결된 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄로 이루어진 원형 그대로의 항체를 포함한다. "항체의 상동체"는 또한 1 이상의 항원(즉, 인테그린 또는 인테그린 리간드)에 결합할 수 있는 면역글로불린 경쇄, 면역글로불린 중쇄 및 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되는 1 이상의 폴리펩티드를 포함하는 단백질을 포함한다. 1 이상의 폴리펩티드로 이루어진 항체의 상동체의 성분 폴리펩티드는 필요에 따라 이황화결합되거나 또는 그렇지 않은 경우 공유적으로 가교 결합될 수 있다. 따라서, "항체의 상동체"는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM 유형(및 이들의 하위 유형)의 원형 면역글로불린을 포함하며, 상기 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 유형일 수 있다. "항체의 상동체"는 또한 예를 들어, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, F(v) 단편, 중쇄 및 경쇄 단량체 또는 이량체 또는 이들의 혼합물과 같은 항원 결합 특이성을 보유하는 원형의 항체의 일부를 포함하기도 한다.

<23> "인간화된 항체의 상동체"는 재조합 DNA 기법에 의하여 생성된 항체의 상동체로서, 항원 결합에 필요하지 않은 인간 면역글로불린의 경쇄 또는 중쇄의 아미노산중 몇몇 또는 모두는 인간이 아닌 포유 동물 면역글로불린의 경쇄 또는 중쇄로부터 얻어진 해당 아미노산으로 치환된다. "인간 항체의 상동체"는 면역글로불린의 경쇄 또는 중쇄의 모든 아미노산(이들이 항원 결합에 필요한지 여부에 상관 없이)이 인간 공급원으로부터 유래되는 항체의 상동체이다.

<24> 본원에 사용된 바와 같이, "인간 항체의 상동체"는 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 아미노산 모두가 인간 공급원으로부터 유래되는, 재조합 DNA 기법에 의하여 생성된 항체의 상동체이다.

<25> 인테그린 "작동 물질"은 상기 인테그린 리간드를 활성화시키는 임의의 화합물을 포함한다.

<26> "아미노산"은 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 단량체성 단위이다. 자연 발생적 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질에서 발견되는 아미노산은 20 가지가 존재하는데, 이들은 모두 L-이성체이다. 상기 용어에는 또한 아미노산 유사체 및 단백질 아미노산 및 이의 유사체의 D-이성체를 포함한다.

<27> "공유적으로 커플링된"이란 본 발명의 특정된 부분(예를 들어, PEG화된 알파4 및/또는 알파1 인테그린 길항 물질, 면역글로불린 단편/알파4 또는 알파1 인테그린 길항 물질)이 상호 공유적으로 직접 결합되거나 또는 스페이서 부(들)과 같은 개재부(들)(intervening moiety(moieties))를 통하여 상호 공유적으로 간접 결합된 경우를 의미한다. 개재부(들)를 "커플링군"이라 칭한다. "접합된"이란 용어는 "공유적으로 커플링된"이란 용어와 상호 호환 가능하게 사용된다. 이러한 관점에서 "스페이서"란 인테그린 길항 물질 또는 단편의 아미노산 또는 기타 성분과 상기 분자의 잔여부 사이에 삽입될 수 있는 부를 칭하는 것이다. 스페이서는 변형에 의하여 단백질 기능이 방해되는 것을 방지하고/방지하거나 상기 아미노산 또는 기타 성분이 다른 부에 보다 용이하게 결합되도록 만들기 위하여 아미노산 또는 기타 성분과 상기 분자의 나머지 부분 사이를 분리시킨다.

<28> "발현 조절 서열"이란 유전자에 작동적으로 결합될 경우 유전자 발현을 제어 및 조절하는 폴리뉴클레오타이드의 서열을 의미한다.

<29> "발현 벡터"란 발현 벡터가 숙주 세포에 도입될때 1 이상의 유전자를 발현시키는 DNA 플라스미드 또는 파아지(기타 통상의 예들중에서)와 같은 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 벡터는 세포내에서 복제될 수 있거나 또는 복제될 수 없을 수 있다.

<30> 본 발명의 제제의 "유효량"이란 처리될 특정 상태에 어떤 결과를 나타내거나 또는 영향을 미치는 양을 의미한다.

<31> 아미노산 잔기의 "기능적 균등물"이란 (i) 기능적 균등물에 의하여 치환되는 아미노산 잔기와 유사한 반응성을 보유하는 아미노산; (ii) 기능적 균등물에 의하여 치환되는 아미노산 잔기와 유사한 특성을 보유하는, 본 발명의 길항 물질의 아미노산; 및 (iii) 기능적 균등물에 의하여 치환되는 아미노산 잔기와 유사한 특성을 보유하는 비아미노산 분자를 의미한다.

<32> 본 발명의 단백질성 길항 물질을 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드는 다음의 조건중 1 이상을 충족시키는 경우 길항 단백질을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드와 비교되는 "기능적 균등물"이다.

<33> (a) "기능적 균등물"은 표준 혼성화 조건하에서 제2 폴리뉴클레오타이드와 혼성화되고/혼성화되거나 제1 폴리뉴클레오타이드 서열에 대하여 축퇴성인 제1 폴리뉴클레오타이드이다. 이는 인테그린 길항 단백질의 활성을 보유하는 돌연변이 단백질을 암호화하는 것이 가장 바람직하다.

<34> (b) "기능적 균등물"은 발현시 제2 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 아미노산 서열을 암호하는 제1 폴리뉴클레오타이드이다.

<35> 본 발명에 사용된 인테그린 길항 물질은 본원에 나열된 제제 및 이들의 기능적 균등물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같이, "기능적 균등물"이란 인테그린 길항 물질의 기능적 균등물인 것으로 생각되는 수용체상에 동일하거나 또는 개선된 유리한 효과를 나타내는 인테그린 길항 물질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 인테그린 길항 물질을 칭하는 것이다. 당 업계의 숙련자에 의하여 이해되는 바와 같이, 기능적으로 균등한 단백질은 재조합 기술, 예를 들어 "기능적 균등 DNA"의 발현에 의하여 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 자연 발생적 DNA 및 자연 발생적 DNA에 의하여 암호화되는 단백질과 동일한 단백질을 암호화하는 자연 발생적이지 않은 DNA에 의하여 암호화되는 인테그린 단백질을 포함한다. 뉴클레오타이드 암호화 서열의 축퇴성으로 인하여, 기타 폴리펩티드가 인테그린 단백질을 암호화하는데에 사용될 수 있다. 이는 서열내 동일한 아미노산 잔기를 암호화하는 상이한 코돈들이 치환에 의하여 변경되어, 침묵 변이를 형성하는 상기 서열들의 전부, 또는 일부를 포함한다. 이와같이 변경된 서열들은 이들 서열의 균등물로서 간주된다. 예를 들어, Phe(F)는 2개의 코돈, 즉 TTC 또는 TTT에 의하여 암호화되고, Tyr(Y)는 TAC 또는 TAT에 의하여 암호화되며 His(H)은 CAC 또는 CAT에 의하여 암호화된다. 한편, Trp(W)는 하나의 코돈, 즉 TGG에 의하여 암호화된다. 따라서, 특정 인테그린을 암호화하는 주어진 DNA 서열에 있어서, 이를 암호화할 다수의 DNA 축퇴성 서열이 존재할 것이라는 사실을 이해할 것이다. 이러한 축퇴성 DNA 서열은 본 발명의 범위내에 포함되는 것으로 간주된다.

<36> 본 발명의 길항 물질을 일컫는 경우 "키메라"란 용어는 상기 길항 물질이 이종의 구조를 보유하며/보유하거나 이종 공급원을 보유하는 2 이상의 단백질의 결합(화학적 결합 또는 공유 결합 등)으로 이루어진다는 것을 의미한다. 그러므로, 키메라 알파4 인테그린 길항 물질은 알파4 인테그린 길항 물질 또는 단편인 하나의 부와 알파4 인테그린 길항 물질이 아닌 다른 부를 포함할 수 있다. 키메라 알파1 인테그린 길항 물질은 알파1 인테그린 길항 물질 또는 단편인 하나의 부와 알파1 인테그린 길항 물질이 아닌 다른 부를 포함할 수 있다.

<37> '키메라' 단백질 종은 이의 각각의 펩티드 골격에 의한, 가장 바람직하게는 상기 단백질들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 분자의 유전자 발현을 통한 2 이상의 단백질 또는 이의 단편의 공-선형(co-linear), 공유 결합을 일컫는 "융합" 또는 "융합 단백질"이다. 그러므로, 바람직한 융합 단백질은 알파4 (또는 알파1) 인테그린 길항 물질이 아닌 제2 부에 공유적으로 결합된 알파4 (또는 알파1) 인테그린 길항 물질 또는 단편을 포함하는 키메라 단백질이다. 본 발명의 바람직한 융합 단백질은 항원 결합 특이성을 보유하는 원형의 항체중 일부, 예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, F(v) 단편, 중쇄 단량체 또는 이량체 및 경쇄 단량체 또는 이량체, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄로 이루어진 이량체등을 포함할 수 있다.

<38> 가장 바람직한 융합 단백질은 키메라로서 면역글로불린 경쇄, 중쇄 또는 둘 다의 힌지 및 불변 영역의 전부 또는 일부에 융합되거나 또는 결합된 인테그린 길항 물질부를 포함한다. 그러므로, 본 발명은 (1) 인테그린 길항 물질부, (2) 제2펩티드(예를 들어, 인테그린 길항 물질부(예, 면역글로불린 슈퍼패밀리의 일원 또는 이의 단편 또는 부분(예, IgG의 부분 또는 단편(예, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역(예, CH2, CH3 및 힌지 영역))))의 용해성 또는 생체내 생존 시간을 증가시키는 것)을 포함하는 분자를 특징으로 한다. 특히, "인테그린 길항 물질/Ig 융합체"는 예를 들어, VLA-4 또는 VLA-1 리간드와 같은 본 발명의 생물학적으로 활성인 인테그린 길항 물질 분자, 또는 면역글로불린의 N-말단의 일부가 인테그린 길항 물질로 치환된 면역글로불린 사슬의 N-말단에 결합된 이의 생물학적 활성 단편을 포함하는 단백질이다. 인테그린 길항 물질/Ig 융합체 종은 면역글로불린 불변 도메인의 최소한의 일부와 결합된 본 발명의 인테그린 길항 물질을 포함하는 단백질인 "인테그린/Fc 융합체"이다. 바람직한 Fc 융합체는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 도메인을 포함하는 항체의 단편에 결합된 본 발명의 인테그린 길항 물질을 포함한다.

<39> "융합 단백질"이란 용어는 또한 모노- 또는 헤테로-기능성 분자에 의하여 인테그린 길항 물질이 아니며(즉 "키메라" 분자) 이하에 기술된 바와 같이 정제된 단백질로부터 새롭게(de novo) 제조된 제2 부에 화학적으로 결합된 인테그린 길항 물질을 의미한다. 그러므로, 융합 단백질인, 재조합적으로 결합된 키메라 분자와는 반대로, 화학적으로 결합된 것의 하나의 예는 (1) 알파4 인테그린 서브유닛 표적부, 예를 들어 VLA-4 보유 세포의 표면상에 VLA-4와 결합할 수 있는 VCAM-1 부; 및 (2) 표적부의 용해성 또는 생체내 생존 시간을 증가시키는 제2 분자, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(PEG)와 같은 폴리알킬렌 글리콜 중합체를 포함한다. 알파4 표적부는 예를 들어, VCAM-1 펩티드 또는 유사하게 보존적으로 치환된 아미노산 서열과 같은, 임의의 자연 발생적 알파4 리간드 또는 이의 단편일 수 있다.

<40> 본원에 사용된 "이종 프로모터"는 유전자 또는 정제된 핵산과 자연적으로 결합되지 않은 프로모터이다.

<41> 본원에 사용된 "상동성"은 "동일성"과의 유의어로서 2개의 폴리펩티드, 분자, 또는 2개의 핵산 사이의 서열 유사성을 일컫는 용어이다. 비교되는 2개의 서열 둘다에서의 위치에 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛이 차지하고 있는 경우(예를 들어, 2개의 DNA 분자 각각에서의 위치에 아데닌이 차지하고 있거나, 또는 2개의 폴리펩티드 각각에서의 위치에 리신이 차지하고 있는 경우), 각각의 분자들은 그 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이의 상동성 %는 비교된 위치의 수 ×100의 값으로 2개의 서열에 의하여 공유되는 상동성 위치의 수 또는 매치된 수를 나눈 값의 함수이다. 예를 들어, 2개의 서열의 10개의 위치들중 6개가 매치되거나 또는 상동성이면, 상기 2개의 서열은 60% 상동성인 것이다. 예를 들어서, DNA 서열들 CTGACT 및 CAGGTT는 50% 의 상동성을 공유한다(전체 6개의 위치중 3개가 매치됨). 일반적으로, 상기 비교는 2개의 서열이 정렬되어 최대의 상동성을 제공하는 경우 수행된다. 이러한 정렬은, 예를 들어 이하에 더욱 상세히 기술된 Karlin 및 Altschul의 방법을 사용하여 제공될 수 있다.

<42> 유사한 잔기가 정렬된 참조 서열의 해당 아미노산 잔기와 보존적으로 치환되거나, 또는 이에 "허용되는 점 돌연변이"가 일어나는 경우, 상동성 서열들은 동일하거나 또는 유사한 아미노산 잔기를 공유한다. 이러한 관점에서, 참조 서열중 잔기의 "보존적 치환"은 크기, 모양, 전기 전하, 공유 결합 또는 수소 결합을 형성할 수 있는 능력을 포함하는 화학적 특성이 유사한, 해당 참조 잔기와 물리적 또는 기능적으로 유사한 치환을 의미한다. 보존적 치환은 Dayhoff 등의 문헌, 5:Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:Suppl.3, 제 22 장:354-352, Nat.Biomed.Res.Foundation, Washington, D.C.(1978)에서의 "허용된 점 돌연 변이"에 관하여 정하여진 기준을 만족시키는 치환인 것이 특히 바람직하다.

<43> "상동성" 및 "동일성"은 본원에서 호환 가능하게 사용되며 각각 2개의 폴리펩티드 서열 사이의 서열 유사성을 칭한다. 상동성 및 동일성은 비교의 목적으로 정렬될 수 있는 각각의 서열에서의 위치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 비교된 서열중의 위치를 동일한 아미노산 잔기가 점유하고 있는 경우, 폴리펩티드들은 그 위치에서 동일하다고 칭하여질 수 있으며; 균등한 위치를 같은(예를 들어 동일한) 아미노산 또는 (예를 들어 입체적 성질 및/또는 전기적 성질이) 유사한 아미노산이 차지하는 경우, 분자는 그 위치에서 상동성이라고 칭하여질 수 있다. 서열들 사이의 상동성 % 또는 동일성 %는 서열들에 의하여 공유되는 상동성 위치의 수 또는 매치되는 수의 함수이다. "관련성 없는" 또는 "비상동성인" 서열은 본 발명의 서열과 40% 미만, 바람직하게는 25% 미만의 동일성을 공유한다.

<44> 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 "상동성 %"는 Karlin 및 Altschul(Karlin 및 Altschul(Proc.Nat.Acad.Sci., USA 90:5873(1993))에 기술된 방법의 변법인 Karlin 및 Altschul(Proc.Nat.Acad.Sci., USA 87:2264(1990))의 정렬 알고리즘을 사용하여 측정된다. 이러한 알고리즘은 Altschul등의 J.Mol.Biol.215:403(1990)의 NBLAST 또는 XBLAST 프로그램에 도입된다. BLAST 검색은 NBLAST 프로그램(스코어 = 100, 단어길이 = 12)으로 수행되어 본 발명의 핵산과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻는다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램(스코어 = 50, 단어 길이 = 3)으로 수행되어 참조 폴리펩티드에 상동성인 아미노산 서열을 얻는다. 비교용의 갭 형성된 정렬을 얻기 위하여, Altschul 등의 문헌, Nucleic Acids Res., 25:3389(1997)에 기술된 바와 같이 갭 형성된 BLAST를 사용한다. BLAST 및 갭 형성된 BLAST를 사용하는 경우, 각 프로그램(XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 변수가 사용된다. *http://www/ncbi.nlm.nih.gov*를 참조하시오.

<45> 핵산, 즉 인테그린 길항 물질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 적용되는 경우 ("실질적으로 순수한"과 호환적으로 사용되는) "분리된"이란 용어는, (ⅰ) 자연 상태에서 관련된 모든 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 숙주 세포에 발현 벡터로서 존재하거나 또는 이의 일부로서 존재하는)와 관련되지 않거나; 또는 (ii) 핵산 또는 자연 상태에서 결합된 것 이외의 기타 화학부에 결합되거나; 또는 (iii) 자연상태에서 발생되지 않는, 이의 근원 또는 조작에 의한 RNA 또는 DNA 폴리뉴클레오타이드, 게놈성 폴리뉴클레오타이드의 일부, cDNA 또는 합성 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. "분리된"이란, 추가로 (ⅰ) 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의하여 시험관내에서 증폭되거나; (ii) 화학적으로 합성되거나; (iii) 클로닝에 의하여 재조합적으로 생성되거나; 또는 (iv) 절단 및 겔 분리에 의하여 정제된 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 그러므로, "실질적으로 순수한 핵산"이란, 보통 핵산이 유도되는 유기체의 자연 발생적 게놈에 인접한 암호화 서열중 하나 또는 둘 다와 바로 인접하지 않는 핵산을 의미한다. 실질적으로 순수한 DNA는 또한 부가적 인테그린 서열을 암호화하는 혼성 유전자의 일부인 재조합 DNA를 포함한다.

<46> "분리된"("실질적으로 순수한"과 호환 가능하도록 사용되는)이란 용어는 폴리펩티드에 적용되는 경우, 그의 기원 또는 조작에 의해 (ⅰ) 숙주 세포내에 발현 벡터의 일부의 발현 생성물로서 존재하거나; 또는 (ii) 단백질 또는 자연 상태에서 결합된것 이외의 기타 화학부에 결합되거나; 또는 (iii) 자연상태에서 발생되지 않는 형태의 단백질은, 예를 들어 1 이상의 소수성 부를 상기 단백질에 첨부하거나 또는 부가함으로써 화학적으로 조작된 자

연 상태에서 발생되지 않는 단백질인 폴리펩티드 또는 이의 일부를 의미한다. "분리된"이란, 추가로 (i) 화학적으로 합성되거나; 또는 (ii) 숙주 세포내에서 발현되어 결합 단백질 및 오염 단백질로부터 정제된 단백질을 의미한다. 상기 용어는 일반적으로 자연적으로 발생되는 단백질 및 핵산으로부터 분리된 폴리펩티드를 의미한다. 바람직하게, 상기 폴리펩티드는 또한 이를 분리하기 위하여 사용된 항체 또는 겔 매트릭스(폴리아크릴아미드)와 같은 물질로부터 분리된다.

<47> "다가 단백질 복합체"란, 복수개(즉, 1개 이상)의 인테그린 길항 물질을 일컫는다. 항인테그린 항체의 상동체 또는 단편은 다른 항체의 상동체 또는 단편과 가교 결합되거나 또는 결합될 수 있다. 각각의 단백질은 동일하거나 또는 상이할 수 있으며 각각의 항체의 상동체 또는 단편은 동일하거나 또는 상이할 수 있다.

<48> "돌연변이체"란, 유기체의 유전 물질에서의 임의의 변화, 특히 야생형 폴리뉴클레오타이드 서열에서의 임의의 변화(즉, 결실, 치환, 부가 또는 변경) 또는 야생형 단백질에서의 임의의 변화를 의미한다. "뮤테인"이란 용어는 "돌연변이체"와 호환 가능하게 사용된다.

<49> "작동적으로 결합된"이란, 발현 조절 서열이 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사 및 해독을 제어 및 조절하는 경우, 폴리뉴클레오타이드 서열(DNA, RNA)이 발현 조절 서열에 작동적으로 결합되었음을 의미한다. "작동적으로 결합된"이란 용어는 발현될 폴리뉴클레오타이드 서열의 앞부분에 존재하는 적합한 개시 시그널(예를 들어, ATG)을 보유하고, 발현 제어 서열의 제어하에서 올바른 해독틀이 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현시킬 수 있도록 유지되어, 폴리뉴클레오타이드 서열에 의하여 암호화된 목적 폴리펩티드를 생성하는 경우를 포함한다.

<50> "약리학적 제제"란 길항 물질의 작용에 영향을 주는, 개체에 투여되는 1 이상의 화합물 또는 분자 또는 기타 화학적 실체(본 발명의 길항 물질을 포함)로서 정의된다. 본원에서 사용된 "약리학적 제제"란 용어는 본 발명의 길항 물질이 1 이상의 약리학적 제제를 투여하기 이전, 이후 또는 이와 동시에 투여되는 경우 "병용 요법"시 투여되는 제제를 의미한다.

<51> "단백질"이란 필수적으로 20개의 아미노산중 임의의 것으로 이루어진 중합체를 의미한다. "폴리펩티드"는 종종 비교적 큰 폴리펩티드를 참고로하여 사용되며 , "펩티드"는 종종 작은 폴리펩티드를 참고로하여 사용되는데, 이들 용어는 당 업계에서 중복 사용되는 것으로서 다양하다. 본원에 사용된 "단백질"이란 용어는, 다른 언급이 없는한 펩티드, 단백질 및 폴리펩티드를 의미하는 것이다.

<52> "펩티드(들)", "단백질(들)" 및 폴리펩티드(들)"은 본원에서 호환 가능하도록 사용된다. "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 또한 본원에서 호환 가능하도록 사용된다.

<53> 본원에 사용된 "재조합체"란, 재조합체, 포유 동물 발현계로부터 유도된 단백질을 의미한다. 인테그린은 글리코실화되지 않고 또한 이황화 결합도 함유하지 않기 때문에, 이는 대부분의 원핵 및 진핵 발현계에서 발현될 수 있다.

<54> "소분자"란 A2 단락에 정의된 바와 같다.

<55> "표면 아미노산"이란 어구는 단백질이 이의 자연적인 형태로 접히는 경우 용매에 노출된 임의의 아미노산을 의미한다.

<56> "혼성화 조건"이란, 실질적으로 0.5 ×SSC 내지 약 5 ×SSC 및 65℃와 같은 혼성화 및 세정 모두를 위한 염 및 온도 조건을 의미한다. 따라서 본원에 사용된 "표준 혼성화 조건"은 작동적 정의이며 혼성화 조건의 범위를 포함한다. 그럼에도 불구하고, "높은 엄격성" 조건은 플라크 스크린 완충액(0.2 % 폴리비닐피롤리돈, 0.2 % Ficoll 400; 0.2 % 소 혈청 알부민, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5); 1 M NaCl; 0.1 % 피로인산나트륨; 1 % SDS); 10 % 황산덱스트란 및 65℃에서 12 ~ 20 시간 동안 변성되고 초음파 처리된 연어 정자 DNA 100 ㎍/㎖)과 혼성화되고, 65℃에서 75 mM NaCl/7.5 mM 시트르산나트륨(0.5 ×SSC)/1 % SDS로 세정되는 경우를 포함한다. "낮은 엄격성" 조건이란, 플라크 스크린 완충액, 10 % 황산덱스트란 및 55℃에서 12 ~ 20 시간 동안 변성, 초음파 처리된 연어 정자 DNA 110 ㎍/㎖와 혼성화되고, 55℃에서 300 mM NaCl/30 mM 시트르산나트륨(2.0 ×SSC)/1 % SDS로 세정되는 경우를 포함한다. [참조 문헌: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, Sections 6.3.1-6.3.6(1989)].

<57> 본원에서 사용된 "치료 조성물"은 본 발명의 길항 물질 및 기타 생물학적으로 융합 가능한 성분을 포함하는 경우로서 정의된다. 상기 치료용 조성물은 물과 같은 부형제, 광물질 및 단백질과 같은 담체를 함유할 수 있다.

<58> "섬유증을 보유하는 개체"(a subject with fibrotic condition)란, 내부 기관에 섬유증이 발생한 개체, 피부에 섬유증 질환이 발생한 개체 및 눈에 섬유증이 발생한 개체를 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 내부 기관

(예를 들어, 간, 폐, 신장, 심장 혈관, 위장)의 섬유증은 폐섬유증, 골수섬유증, 간 경변증, 사구체 간질 증식성 사구체신염, 겸상 사구체신염, 당뇨성 신장병증, 신장 간질성 섬유증, 싸이클로스포린 투여받은 환자에서의 신장 섬유증 및 HIV 관련 신장병증과 같은 질환에서 발생된다. 피부 섬유증 질환은 경피증, 반상경피증, 켈로이드, 비대성 흉터, 가족성 피부 콜라겐증 및 콜라겐형의 결합 조직 모반을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 눈의 섬유증은 당뇨성 망막병증, 수술후의 흉터(예를 들어, 녹내장 여과 수술 이후 및 사시 수술 이후), 및 증식성 유리체망막병증과 같은 상태를 포함한다. 본 발명의 방법에 의하여 치료 가능한 추가의 섬유증은 류마티스성 관절염, 연장성 관절통 및 관절의 악화와 관련된 질병; 진행성 전신 경화증, 다발성 근염, 피부근염, 호산성 근막염, 반상경피증, 레이노드증후군 및 비강 폴립증을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 방법에 의하여 치료될 수 있는 섬유증은 또한 켈로이드 또는 비대성 흉터를 형성하는 것으로 공지된 환자에서 흉터의 과형성 억제; 외과적 절개, 외과적 복부 상처 및 외상성 열상을 포함하는 다양한 유형의 상처 치료시 흉터 형성 또는 흉터의 과다 형성 억제 또는 예방; 관상 혈관성형술 이후 동맥의 흉터 형성 및 재허파쇄 현상의 예방 또는 억제; 경색증에서의 발생 이후의 심장 섬유증과 관련된 및 과민성 맥관병에서의 심각한 흉터 또는 섬유성 조직 형성의 예방 또는 억제를 포함한다.

<59> "유효량"이란 유리하거나 또는 목적으로하는 결과를 나타내는데에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 치료의 관점에서, 본 발명에 사용하기 위한 길항 물질의 "유효량"은 치료될 질환에 대하여 허용 가능한 표준에 의한 섬유증의 진행을 완화, 개선, 안정화, 역행, 서행화 또는 지연시키는데에 충분한 양이다. 효능의 지표의 검출 및 측정은, 예를 들어 혈액 검사, 폐기능 시험 및 흉부 X선 촬영을 포함하는 신체 검사; CT 스캔; 기관지경; 기관지폐포성 세척; 폐 생검 및 CT 스캔을 포함하는, 다수의 허용 가능한 진단 도구에 의하여 측정될 수 있다.

<60> 본 발명의 수행에는, 다른 언급이 없는한, 당 업계의 기술 범위내에 포함되는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 단백질 화학, 약리학 및 면역학의 종래의 기법을 사용할 것이다. 이러한 기법들은 문헌에 기술되어 있다. 별도의 규정이 없는한, 상세한 설명에 인용된 모든 참조 문헌들은 본원에 참조 문헌으로 인용된다.

<61> **Ⅱ. 바람직한 구체예의 설명**

<62> 본 발명은 알파1 및/또는 알파4 서브유닛 함유 인테그린 및 이의 단편에 대한 길항 물질이 폐 섬유증의 치료에 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다.

<63> **A. 인테그린 길항 물질**

<64> 본 발명의 목적에 있어서 인테그린 길항 물질은 인테그린 및 이의 동종 리간드 또는 수용체 사이의 임의의 상호작용의 길항 물질일 수 있어서 리간드-수용체 상호 작용에 의하여 유도되는 정상적인 기능이 변형된다(즉, 방지 또는 서행되거나 그렇지 않은 경우 변형됨). 인테그린 길항 물질의 바람직한 하나의 구체예는 알파4 인테그린과 이의 리간드의 상호 작용, 예를 들어 VCAM-1/VLA-4 상호 작용의 길항 물질이다. 이는 임의의 제제, 예를 들어 VCAM-1 및/또는 VLA-4 매개성 결합을 억제 또는 차단할 수 있거나 그렇지 않으면 예를 들어 VLA-4 리간드 매개성 VLA-4 신호 전달 또는 VCAM-1 리간드 매개성 VCAM-1 신호 전달을 억제 또는 차단함으로써 VCAM-1 및/또는 VLA-4 기능을 조절할 수 있으며, 바람직하게는 항VLA-4 항체의 경우와 동일한 방식으로 급성 뇌 손상의 치료에 효과적인 폴리펩티드 또는 기타 분자이다.

<65> VCAM-1/VLA-4 상호 작용의 길항 물질은 다음의 특성들을 1 이상 보유하는 제제이다. 즉, (1) VLA-4-리간드/VLA-4 상호 작용, 예를 들어 VCAM-1/VLA-4 상호 작용을 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-4 보유 세포(예를 들어, 내피 세포)의 표면상의 VLA-4를 피복하거나 이에 결합하는 특성; (2) VLA-4 매개성 신호 전달, 예를 들어 VLA-4/VCAM-1 매개성 신호 전달을 변형 및 바람직하게는 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-4 보유 세포(즉, 백혈구)의 표면상의 VLA-4를 피복하거나 이에 결합하는 특성; (3) VLA-4/VCAM-1 상호 작용을 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는 내피 세포상의 VLA-4 리간드(예를 들어, VCAM-1)를 피복하거나 이에 결합하는 특성; (4) VLA-4 리간드 매개성 VLA-4 신호 전달, 예를 들어 VCAM-1 매개성 VLA-4 신호 전달을 변형 및 바람직하게는 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-4-리간드(예를 들어, VCAM-1)를 피복하거나 또는 이에 결합하는 특성. 바람직한 구체예에서 길항 물질은 특성 1 및 2 중 하나를 보유하거나 또는 이들 둘 다를 보유한다. 다른 바람직한 구체예에서, 길항 물질은 특성 3 및 4 중 하나를 보유하거나 또는 이들 둘 다를 보유한다. 더욱이, 예를 들어 VCAM-1과 결합하는 제제와 결합될 수 있는 VLA-4에 결합하는 제제인 1 이상의 길항 물질이 사용될 수 있다.

<66> 인테그린 길항 물질의 다른 구체예는 예를 들어, 콜라겐/VLA-1 상호 작용과 같은 알파1 인테그린 및 이의 리간드와의 상호 작용의 길항 물질이다. 이는 예를 들어 VLA-1-리간드 매개성 VLA-1 신호 전달 또는 콜라겐 매개성 콜라겐 신호 전달을 억제 또는 차단함으로써, 콜라겐 및/또는 VLA-1 매개성 결합을 억제 또는 차단할 수 있거나, 그렇지 않은 경우 콜라겐 및/또는 VLA-1 기능을 조절할 수 있는, 예를 들어 폴리펩티드 또는 기타 분자와 같은 제제이다. 콜라겐/VLA-1 상호 작용의 길항 물질은 다음의 특성들을 보유하는 제제이다. 즉, (1) VLA-1-리간드/VLA-1 상호 작용, 예를 들어 콜라겐/VLA-1 상호 작용을 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-1 보유 세포(예를 들어, 콜라겐)의 표면상의 VLA-1을 피복하거나 이에 결합하는 특성; (2) VLA-1 매개성 신호 전달, 예를 들어 VLA-1/콜라겐 매개성 신호 전달을 변형 및 바람직하게는 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-1 보유 세포의 표면상의 VLA-1을 피복하거나 이에 결합하는 특성; (3) VLA-1/콜라겐 상호 작용을 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는 VLA-1 리간드(예를 들어, 콜라겐)를 피복하거나 이에 결합하는 특성; (4) VLA-1 리간드 매개성 VLA-1 신호 전달, 예를 들어 콜라겐 매개성 VLA-1 신호 전달을 변형 및 바람직하게는 억제하는데에 충분한 특이성을 보유하는, VLA-1-리간드를 피복하거나 또는 이에 결합하는 특성. 바람직한 구체예에서 알파1 길항 물질은 특성 1 및 2 중 하나를 보유하거나 또는 이들 둘 다를 보유한다. 다른 바람직한 구체예에서, 길항 물질은 특성 3 및 4 중 하나를 보유하거나 또는 이들 둘 다를 보유한다. 더욱이, 예를 들어 콜라겐에 결합하는 제제와 결합될 수 있는 VLA-1에 결합하는 제제와 같은 1 이상의 길항 물질이 환자에 투여될 수 있다.

<67> 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 방법에 사용된 길항 물질은 분자의 특정 유형 또는 구조에 제한되지 않으며, 본 발명의 목적에 있어서 및 예시에 의하여, 세포 표면상의 알파4 인테그린(예를 들어 VLA-4)에 결합할 수 있거나 또는 알파4(리간드 보유 세포)의 표면상의 VCAM-1과 같은 알파4 리간드에 결합할 수 있으며 알파4 인테그린(예를 들어, VLA-4) 또는, "알파4 인테그린 결합제" 및 "알파4 인테그린 리간드 결합제"라고도 불리워지는 알파4 리간드(예를 들어, VCAM-1)를 효율적으로 차단하거나 또는 피복시키는 임의의 제제는 본원의 실시예에 사용된 길항 물질의 균등물로서 간주된다.

<68> 예를 들어, VLA-4 및 VCAM-1에 대한 항체 또는 항체의 상동체(이하에 논의됨) 및 자연 상태의 결합 단백질의 가용성 형태가 유용하다. VLA-4에 대한 자연 상태의 결합 단백질의 가용성 형태는 가용성 VCAM-1 펩티드, VCAM-1 융합 단백질, 이기능성 VCAM-1/Ig 융합 단백질(예를 들어 "키메라" 분자, 전술함), 피브로넥틴, 택일적으로 스플라이싱된 비Ⅲ형 연결 분절을 보유하는 피브로넥틴, 및 아미노산 서열 EILDV 또는 유사하게 보존적으로 치환된 아미노산 서열을 함유하는 피브로넥틴 펩티드를 포함한다. VCAM-1에 대한 자연의 결합 단백질의 가용성 형태는 가용성 VLA-4 펩티드, VLA-4 융합 단백질, 이기능성 VLA-4/Ig 융합 단백질등을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, "가용성 VLA-4 펩티드" 또는 "가용성 VCAM-1 펩티드"는 그 자체로 막에 부착될 수 없는 VLA-4 또는 VCAM-1 폴리펩티드이다. 이러한 가용성 폴리펩티드는, 예를 들어 상기 폴리펩티드를 부착시키는데에 충분한 경막 도메인의 일부가 존재하지 않거나 또는 변형되어 경막 도메인이 비기능성으로 된 VLA-4 및 VCAM 폴리펩티드를 포함한다. 상기 결합제는 VLA-4에 대한 세포 표면 결합 단백질과 경쟁하거나 그렇지 않은 경우 VLA-4 기능을 변형시킴으로써 작용할 수 있다. 예를 들어, VCAM-1의 가용성 형태(Osborn 등의 문헌, 1989, Cell, 59:1203-1211) 또는 이의 단편은 VLA-4에 결합하도록, 바람직하게는 VCAM-1 보유 세포상의 VLA-4 결합 위치에서 경쟁함으로써 소분자 또는 항VLA-4 항체와 같은 길항 물질의 투여시와 유사한 효과를 나타낼 수 있도록 투여될 수 있다.

<69> **1. 항인테그린 항체의 상동체**

<70> 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용된 세포 표면 알파1 및/또는 알파4 인테그린(예를 들어, VLA-1, VLA-4 또는 알파4 베타7) 및/또는 알파1 및/또는 알파4 인테그린에 대한 세포 표면 리간드(예를 들어, 콜라겐 또는 VCAM-1)에 차단 또는 피복하는 것을 포함하여 결합하는 길항 물질은 전술한 바와 같이 항VLA-1 또는 항VLA-4 및/또는 항콜라겐 및/또는 항VCAM-1 모노클로날 항체 또는 항체의 상동체이다. 치료용, 특히 인간 치료용의 바람직한 항체 및 상동체는 인간 항체의 상동체, 인간화된 항체의 상동체, 키메라 항체의 상동체, Fab, Fab', F(ab')2 및 F(v) 항체 단편 및 항체의 중쇄 또는 경쇄의 단량체 또는 이량체 또는 이들의 혼합물을 포함한다. VLA-4에 대한 모노클로날 항체는 본 발명의 방법에서 바람직한 결합제이다.

<71> 2. 소분자 인테그린 길항 물질

<72> "소분자" 인테그린 길항 물질이란 용어는, 예를 들어 세포 표면상의 VLA-4 또는 VCAM-1에 결합함으로써 VLA-4/VCAM 상호 작용을 차단시켜 인테그린/인테그린 리간드 상호 작용을 파괴할 수 있는 화학 제제(즉, 유기 분자)를 말한다. 이러한 소분자들은 또한 VLA-4 및 VCAM-1 수용체에 각각 결합할 수 있다. VCAM-1/VLA-4 상호 작

용의 길항 물질인 소유기분자와 같은, VLA-4 및 VCAM-1 소분자 억제제는 그들 자체가 펩티드, 세미 펩티드성 화합물(semi-peptidic compound) 또는 비펩티드성 화합물일 수 있다. 본원에 정의된 "소분자"는 항체 또는 항체의 상동체를 포함하는 의미는 아니다. 대표적인 소분자의 분자량은 일반적으로 1000 미만이다.

<73> 예를 들어, VLA-4 리간드의 결합 도메인을 의태하고 VLA-4의 수용체 도메인에 부합하는 올리고당과 같은 소분자가 사용될 수 있다[참조 문헌: J.J Devlin 등의 문헌, 1990, Science 249:400-406(1990), J.K. Scott 및 G.P.Smith, 1990, Science 249:386-390 및 미국 특허 제 4,833,092 호(Geysen), 본원에 모두 참고 문헌으로 인용됨]. 이와 반대로, VCAM-1 리간드의 결합 도메인을 의태하고 VCAM-1 수용체 도메인에 부합하는 소분자가 사용될 수 있다.

<74> 본 발명에 유용한 기타 소분자의 예들은 Komoriya 등의 문헌("The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site(CS1) Within the Alternatively Spliced Type Ⅲ Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine", J.Biol.Chem., 266(23), pp.15075-79(1991))에서 찾아볼 수 있다. VLA-4에 결합하는데에 필요하며 피브로넥틴의 특정 종의 CS-1 영역(VLA-4 결합 도메인)의 아미노산 서열을 기초로하는 다양한 중첩성 펩티드를 합성하는 최소의 활성 아미노산 서열을 확인하였다. 피브로넥틴 의존성 세포 부착에 대한 프로세싱된 억제 활성을 보유하는, 8개의 아미노산 펩티드, Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr 및 2개의 보다 작은 중첩성 펜타펩티드들, Glu-Ile-Leu-Asp-Val 및 Leu-Asp-Val-Pro-Ser을 확인하였다. LDV 서열을 함유하는 임의의 보다 큰 펩티드는 차후 생체내에서 활성인 것으로 보인다[T.A.Ferguson 등의 문헌, "Two Integrin Binding Peptides Abrogate T-cell-Mediated Immune Responses In Vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp.8072-76(1991); 및 S. M. Wahl 등의 문헌, "Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment", J. Clin. Invest., 94, pp.655-62(1994)]. 피브로넥틴에의 VLA-4 및 VLA-5의 부착을 모두 억제할 수 있는 시클릭 펜타펩티드, Arg-Cys-Asp-TPro-Cys(이 중, TPro란 4-티오프롤린을 의미함)에 관하여도 또한 기술되어 있다. [참조 문헌: D.M.Nowlin 등의 문헌, "A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits Alpha4Beta1 Integrin-mediated Cell Adhesion", J.Biol.Chem., 268(27), pp.20352-59(1993); 및 PCT 공개 PCT/US91/04862] 상기 펜타펩티드는 피브로넥틴으로부터 얻은, 몇몇 세포외 기질 단백질에 대한 인지 위치중 일반적 모티프로서 공지된 트리펩티드 서열 Arg-Gly-Asp를 기준으로 한다. 기타 VLA-4 억제제의 예는, 예를 들어 세포 부착 억제 활성을 보유하는 베타-아미노산을 함유하는 선형 펩티딜 화합물에 관하여 기술하고 있는, Adams 등의 문헌, "Cell Adhesion Inhibitors", PCT/US97/13013에 기술되어 있다. 국제 특허 출원 WO 94/15958 및 WO 92/00995에는 세포 부착 억제 활성을 보유하는 시클릭 펩티드 및 펩티도 의태 화합물에 관하여 기술하고 있다. 국제 특허 출원 WO 93/08823 및 WO 92/08464에는 구아니딜-, 우레아- 및 티오우레아-함유 세포 부착 억제 화합물에 관하여 기술하고 있다. 미국 특허 제 5,260,277 호는 구아니딜 세포 부착 조절 화합물에 관하여 기술하고 있다. VLA-4의 다른 펩티딜 길항 물질은 D.Y.Jackson 등의 문헌, "Potent α4 β1 peptide antagonists as potential anti-inflammatory agents", J. Med. Chem., 40, 3359(1997); H. Shroff 등의 문헌, "Small peptide inhibitors of α4 β7 mediated MadCAM-1 adhesion to lymphocytes", Bio.Med.Chem.Lett., 1 2495(1996); 미국 특허 제 5,510,332 호, PCT 공개 WO 98/53814, WO 97/03094, WO 97/02289, WO 96/40781, WO 96/22966, WO 96/20216, WO 96/01644, WO 96/06108 및 WO 95/15973 등에 기술되어 있다.

<75> 이러한 소분자 제제는 복수개의 펩티드(예를 들어, 길이 5 ~20 아미노산), 세미 펩티드성 화합물 또는 비펩티드성 유기 화합물을 합성하고, 이들 화합물을 적합한 VLA-1/콜라겐 또는 VLA-4/VCAM-1 상호 작용을 억제하는 이들의 능력에 대하여 스크린함으로써 제조될 수 있다. [참조 문헌: 미국 특허 제 4,833,092 호, Scott 및 Smith, "Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library", Science, 249, pp.386-90(1990), 및 Devlin 등의 문헌, "Random Peptide Libraries:A Source of Specific Protein Binding Molecules", Science, 249, pp.40407(1990)].

<76> **B. 항인테그린 항체의 상동체를 제조하는 방법**

<77> 예를 들어 항인테그린 모노클로날 항체를 포함하는 모노클로날 항체의 제조 기법은 널리 공지되어 있다. [참조 문헌: Mendrick 등의 문헌, 1995, Lab. Invest. 72:367-375(mAbs to murine anti-α1 β1 and anti-α2 β1); Sonnenberg등의 문헌, 1987, J.Biol.Chem. 262:10376-10383(mAbs to murine anti-α6 β1); Yao 등의 문헌, 1996, J.Cell.Sci. 1996 109:3139-50(mAbs to murine anti-α7 β1); Hemler 등의 문헌, 1984, J.Immunol.132:3011-8(mAbs to human α1 β1); Pischel 등의 문헌, 1987, J.Immunol.138:226-33(mAbs to human α2 β1); Wayner 등의 문헌, 1988, J.Cell Biol. 107:1881-91(mAbs to human α3 β1); Hemler 등의 문헌, 1987, J.Biol.Chem. 262:11478-85(mAbs to human α4 β1); Wayner 등의 문헌, 1988, J.Cell Biol.

107:1881-91(mAbs to human α5 β1); Sonnenberg등의 문헌, 1987, J.Biol.Chem. 262:10376-10383(mAbs to human α6 β1); Wang 등의 문헌, 1996, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15:664-672(mAbs to human α9 β1); Davies 등의 문헌, 1989, J.Cell Biol. 109:1817-26(mAbs to human αV β1); Sanchez-Madrid 등의 문헌, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7489-93(mAbs to human αL β2); Diamond 등의 문헌, 1993, J.Cell Biol. 120: 1031-43(mAbs to human αM β2); Stacker 등의 문헌, 1991, J. Immunol. 146:648-55(mAbs to human αX β2); Van der Vieren 등의 문헌, 1995, Immunity 3:683-90(mAbs to human αD β2); Bennett 등의 문헌, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2417-21(mAbs to human αⅡbβ3); Hessle 등의 문헌, 1984, Differentiation 26:49-54(mAbs to human α6 β4); Weinacker 등의 문헌, 1994, J.Biol.Chem. 269:6940-8(mAbs to human αV β5); Weinacker 등의 문헌, 1994, J.Biol.Chem. 269:6940-8(mAbs to human αV β6); Cerf-Bensussan 등의 문헌, 1992, Eur. J. Immunol. 22:273-7(mAbs to human αE β7); Nishimura 등의 문헌, 1994, J.Biol.Chem. 269:28708-15(mAbs to human αV β8); Bossy 등의 문헌, 1991, EMBO J.10:2375-85(polyclonal antisera to human α8 β1); Camper 등의 문헌, 1998, J.Biol.Chem. 273:20383-20389(polyclonal antisera to human α10 β1)].

<78> 본원에서 고려되는 바람직한 인테그린 길항 물질은 원형 또는 트렁케이션된 게놈성 DNA 또는 cDNA로부터 발현될 수 있거나 또는 원핵 숙주 세포 또는 진핵 숙주 세포중의 합성 DNA로부터 발현될 수 있다. 이량체성 단백질은 배양 배지로부터 분리되고/분리되거나 다시 접혀서 시험관내에서 이량체화되어 생물학적으로 활성인 조성물을 형성할 수 있다. 헤테로이량체는 별개의, 구별되는 폴리펩티드 사슬들을 조합함으로써 시험관내에서 형성될 수 있다. 또는 헤테로이량체는 별개의 분리된 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 공동 발현 핵산에 의하여 단일 세포에서 형성될 수 있다. 몇몇 대표적인 재조합 헤테로이량체 단백질 생성 방법에 관하여 예를 들어, WO 93/09229 또는 미국 특허 제 5,411,941 호를 참조하시오. 현재 바람직한 숙주 세포로서는 이.콜라이(*E.Coli*)를 포함하는 원핵 세포, 또는 효모, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 곤충 세포 또는, CHO, COS 또는 BSC 세포와 같은 포유동물 세포를 포함하는 진핵 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당 업계의 숙련자는 다른 숙주 세포들이 유리하게 사용될 수 있다는 사실을 이해할 것이다.

<79> 예를 들어, 항VLA-4 항체는 VLA-4 발현 세포로부터 얻은 I^{125} 표지된 세포 용균물의 면역 침전법에 의하여 확인될 수 있다. [참조 문헌: Sanchez-Madrid 등의 문헌, 1986, Eur. J. Immunol., 16:1343-1349 및 Hemler 등의 문헌, 1987, J. Biol. Chem., 262, 11478-11485]. 항VLA-4 항체는 또한, 예를 들어 VLA-4를 인지하는 것으로 생각되는 항체와 함께 항온 처리된 라모스 세포의 형광 염색 결과를 측정함으로써 유동 혈구계측법에 의하여 확인될 수 있다[Elices 등의 문헌, 1990, Cell, 60:577-584]. 하이브리도마 세포의 생성에 사용된 림프구는 통상적으로 이러한 스크린 검정법을 사용하여, 혈청이 이미 항VLA-4 항체의 존재에 관하여 양성으로 시험된 면역화된 포유 동물로부터 분리된다.

<80> 통상적으로, 무한 증식성 세포주(예를 들어, 골수종 세포주)는 림프구와 동일한 포유 동물 종으로부터 유도된다. 바람직한 무한 증식성 세포주는 하이포크산틴, 아르니노프테린 및 티미딘을 함유하는 배양 배지("HAT 배지")에 감수성인 마우스 골수종 세포주이다. 통상적으로 HAT-감수성 마우스 골수종 세포는 분자량이 1500인 폴리에틸렌 글리콜("PEG 1500")을 사용하여 마우스 비장 세포에 융합된다. 이후, 이와 같이 융합에 의하여 생성된 하이브리도마 세포는 HAT 배지를 사용하여 선택되는데, 이때 융합되지 않은 골수종 세포와 증식되지 않은 융합 골수종 세포를 사멸시킨다(융합되지 않은 비장 세포는 형질 전환되지 않았기 때문에 수 일 경과후 사멸됨). 목적 항체를 생성하는 하이브리도마는 하이브리도마 배양 상청액을 스크린하여 검출된다. 예를 들어, 항VLA-4 항체를 생성하도록 제조된 하이브리도마는 상기 하이브리도마 배양 상청액을 재조합 알파4-서브유닛 발현 세포주에 결합하는 능력을 보유하는 분비된 항체에 대하여 시험함으로써 스크린될 수 있다(Elices 등의 문헌, 상동).

<81> 원형의 면역글로불린인 항VLA-4 항체의 상동체를 제조하기 위하여, 상기 검정법에서 양성인 것으로 판명된 하이브리도마 세포는 하이브리도마 세포가 모노클로날 항체를 배양 배지에 분비시키는데에 충분한 조건 및 시간 동안 영양 배지중에서 배양된다. 하이브리도마 세포에 적합한 조직 배양 기법 및 배양 배지는 널리 공지되어 있다. 컨디셔닝된 하이브리도마 배양 상청액은 수집되고 항VLA-4 항체들은 필요에 따라서 널리 공지된 방법으로 추가로 정제될 수 있다.

<82> 또한, 목적 항체는 하이브리도마 세포를 비면역화된 마우스의 복강에 주입시킴으로써 제조될 수 있다. 하이브리도마 세포는 복수로서 축적되는 항체를 분비하는, 상기 복강내에서 증식된다. 상기 항체는 상기 복강으로부터 복수를 시린지로 꺼내어 수집될 수 있다.

<83> 몇몇 마우스 항VLA-4 모노클로날 항체들은 이미 기술된 바 있다. [참조 문헌: 예를 들어, Sanchez-Madrid 등의 문헌, 1986, 상동; Hemler 등의 문헌, 1987, 상동; Pulido 등의 문헌, 1991, J. Biol. Chem., 266(16), 10241-10245); Issekutz 및 Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147:109(TA-2 mab)]. VLA-4의 알파 및/또는 베타 사슬을 인지할 수 있는 이들 항VLA-4 모노클로날 항체들 및 다른 항VLA-4 항체(예를 들어, 미국 특허 제 5,888,507-Biogen, Inc., 본원에 참조 문헌으로서 인용함)는 본 발명에 의한 치료 방법에 유용할 것이다. VCAM-1 및 피브로넥틴 리간드와 결합하는데에 관련된 VLA-4 알파4 사슬 에피토프를 인지할 항VLA-4 항체(즉, 리간드 인지와 관련되며 및 VCAM-1 및 피브로넥틴 결합을 억제하는 위치에서 VLA-4와 결합할 수 있는 항체)가 바람직하다. 이러한 항체들은 본 발명에 따라서 B 에피토프 특이적 항체(B1 또는 B2)(Pulido 등의 문헌, 1991, 상동)로서 정의되고 또한 항VLA-4 항체이기도 하다.

<84> VLA-4에 대한 완전 인간 모노클로날 항체의 상동체는 본 발명의 방법에서 VLA-4 리간드를 차단하거나 또는 피복할 수 있는 다른 바람직한 결합제이다. 이들의 원형 형태에서 이들은 Boerner 등의 문헌, 1991, J. Immunol., 147, 86-95에 기술된 바와 같은, 시험관내 프라이밍된 인간 비장 세포를 사용하여 제조될 수 있다. 또는, 이들은 인간 B 세포로부터 얻은 인간 모노클로날 항체의 제조 방법에 관하여 기술하고 있는, Persson 등의 문헌, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:2432-2436 또는 Huang 및 Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236, 미국 특허 제 5,798,230 호(1998년 8월 25일, "Process for the preparation of human monoclonal antibodies and their use")에 기술된 바와 같은 레퍼토리 클로닝에 의하여 제조될 수 있다. 상기 방법에 의하면, 인간 항체 생성 B 세포는 엡스타인-바 바이러스 핵 항체 2(EBNA2)를 발현하는 엡스타인-바 바이러스, 또는 이의 유도체에 의하여 감염되어 무한 증식된다. 무한 증식에 필요한 EBNA2의 기능은 실질적으로 차단되어, 항체 생성이 증가되는 결과를 초래한다.

<85> 완전한 인간 항체를 생성하는 또 다른 방법에서, 미국 특허 제 5,789,650 호(1998년 8월 4일, "Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies")는 이종 항체를 생성할 수 있는 인간을 제외한 트랜스제닉 동물 및 비활성인 내인성 면역글로불린 유전자를 보유하는 인간을 제외한 트랜스제닉 동물에 관하여 기술하고 있다. 내인성 면역글로불린 유전자는 안티센스 폴리뉴클레오타이드 및/또는 내인성 면역글로불린에 대하여 생성된 항혈청에 의하여 억제된다. 이종 항체는 인간을 제외한 동물의 종의 게놈에서는 보통 발견되지 않는 면역글로불린 유전자에 의하여 암호화된다. 재정렬되지 않은 이종의 인간 면역글로불린 중쇄의 서열을 함유하는 1 이상의 트랜스유전자는 인간을 제외한 동물에 도입되어 트랜스제닉 면역글로불린 서열을 기능적으로 재정렬할 수 있으며 인간 면역글로불린 유전자에 의하여 암호화된 다양한 이소타입의 항체 레파토리를 생성할 수 있다. 이러한 이종의 인간 항체는, 예를 들어 골수종과 같은 무한 증식 세포주와 융합시키거나, 또는 이러한 B 세포를 모노클로날의 이종성인 완전한 인간 항체의 상동체를 생성할 수 있는 세포주를 영속시키는 기타 기법에 의하여 조작함으로써 이후 무한 증식되는 B 세포에서 생성된다.

<86> 또한, 커다란 면역화되지 않은 인간 파아지도 디스플레이 라이브러리 표준적인 파아지 기법을 사용하는 인간 치료제로서 개발될 수 있는 고친화성 항체를 분리하는데에 사용될 수 있다(Vaughan 등의 문헌, 1996).

<87> 본 발명의 방법에서 인테그린 리간드를 차단하거나 또는 피복할 수 있는 또 다른 바람직한 결합제는 항인테그린 특이성을 보유하는 인간화된 재조합 항체의 상동체이다. 진정(true) "키메라 항체"(전체 불변 영역 및 가변 영역이 상이한 공급원으로부터 유도됨)의 제조를 위한 초기의 방법 이후에 신규한 연구 방법이 EP 0239400(Winter 등의 문헌)에 기술되어 있으며, 이를 통하여 항체들은 하나의 종에 대한 이들의 상보성 결정 영역(CDR)을 다른 항체로부터 얻은 영역과 치환(주어진 가변 영역내)함으로써 변형된다. 상기 방법은 예를 들어, 인간의 중쇄 및 경쇄 Ig 가변 영역 도메인으로부터 얻은 CDR과 쥐과 동물 가변 영역 도메인으로부터 얻은 택일적 CDR을 치환시키는데에 사용될 수 있다. 결과적으로 이러한 변형된 Ig 가변 영역은 치환된 쥐과 동물 CDR을 제외하고 조성물내에 전체적으로 인간형으로 제조된 항체에 대한 인간 Ig 불변 영역과 조합될 수 있다. CDR 치환된 항체들은 상당히 적은양의 인간성이 아닌 성분을 함유하기 때문에, 이러한 CDR 치환된 항체들은 진정한 키메라 항체에 비하여 인간에서 면역 반응을 나타낼 것 같지 않는것으로 예상된다. CDR "그라프팅"에 의하여 모노클로날 항체를 인간화하는 방법을 "재성형 (reshaping)"이라고 부른다[Riechmann 등의 문헌, 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeyen 등의 문헌, 1988, Science 239, 1534-1536].

<88> 통상적으로, 쥐과 동물 항체의 상보성 결정 영역(CDR)은 특이적 항원에 결합하는 마우스 항체의 영역인 CDR(항원 중쇄중 3개, 경쇄중 3개)이므로, 이는 인간 항체내 해당 영역상에 이식된다. CDR의 이식은 유전 공학에 의하여 수행되며, 이로써 CDR DNA 서열은 쥐과 동물의 중쇄 및 경쇄 가변 영역(V) 유전자 분절을 클로닝함으로써 결정되며, 이후 위치 지정 돌연 변이 유발법에 의하여 해당 인간 V 영역에 운반된다. 상기 방법의 최종 단계에서, 목적 이소타입의 인간 불변 영역 유전자 분절(일반적으로 CH에 대하여는 감마 I 이고 CL에 대하여는 카파임)은

부가되며 인간화된 중쇄 및 경쇄 유전자는 포유 동물 세포내에서 공동 발현되어 가용성 인간화 항체를 생성한다.

<89> 인간 항체에 대한 이들 CDR의 전달은 상기 항체에 원래의 쥐과 동물 항체의 항원 결합 특성을 부여한다. 쥐과 동물 항체중의 6개의 CDR은 V 영역 "구조틀" 영역상에 구조적으로 축적된다. CDR-그라프팅이 성공적인 이유는 마우스 및 인간 항체 사이의 구조틀 영역이 CDR에 대한 유사한 부착점과 매우 유사한 3차원 구조를 보유할 수 있어서, CDR이 상호 교환될 수 있기 때문이다. 이러한 인간화된 항체의 상동체는, Jones 등의 문헌, 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann, 1988, Nature 332, 323-327; Queen 등의 문헌, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86, 10029; 및 Orlandi 등의 문헌, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86, 3833에 예시된 바와 같이 제조될 수 있다.

<90> 그럼에도 불구하고, 구조틀 영역내의 임의의 아미노산은 CDR과 상호 작용하여 전체적인 항원 결합 친화도에 영향을 주는 것으로 생각된다. 인간의 V 영역 구조틀을 어떻게든지 변형시키지 않고 재조합 인간화 항체를 생성하는 쥐과 동물 항체로부터 얻은 CDR의 직접적인 운반은 결합 친화도의 부분적인 또는 완전한 상실을 초래한다. 다수의 경우에서, 결합 활성을 얻기 위한 수용체 항체의 구조틀 영역의 잔기들을 변형시키는 것이 중요한 것으로 보인다.

<91> Queen 등의 문헌, 1989(상동) 및 WO 90/07861(Protein Design Labs)에는 쥐과 동물 MAb(항 Tac)의 CDR과 인간 면역글로불린 구조틀 및 불변 영역을 조합함으로써 수용체 항체의 구조틀 영역내 변형된 잔기를 함유하는 인간화된 항체의 제조에 관하여 기술되어 있다. 상기 문헌에는 인간 V 영역 구조틀 잔기에 아무런 변형을 가하지 않고 직접 CDR을 운반함으로써 자주 발생하는 결합 친화도 상실의 문제점에 대한 하나의 해결책을 제시하고 있는데; 상기 해결책에는 2가지의 중요한 단계들이 관련되어 있다. 첫번째 단계에서, 인간 V 구조틀 영역은 원래의 쥐과 동물 항체의 V 영역 구조틀에 대한 최적 단백질 서열 상동성에 대한 컴퓨터 분석물(이 경우에는 항Tac MAb임)에 의하여 선택된다. 두번째 단계에서, 쥐과 동물의 CDR과 상호 작용을 하는 것 같은 구조틀 아미노산 잔기를 시각화하기 위하여 쥐과 동물 V 영역의 3차 구조는 컴퓨터에 의하여 모델링되며 이들 쥐과 동물 아미노산 잔기는 이후 상동성 인간 구조틀상에 첨가된다. [참조 문헌: 미국 특허 제 5,693,762 호; 동 제 5,693,761 호; 동 제 5,585,089 호 및 동 제 5,530,101 호(Protein Design Labs)]

<92> 상이한 연구 방법(Tempest 등의 문헌, 1991, Biotechnology 9, 266-271)을 사용할 수 있으며, 마우스 잔기를 급히 도입시키지 않는 CDR-그라프팅을 위한 표준물로서 각각 NEWM 및 REI 중쇄 및 경쇄로부터 유도된 V 영역 구조틀을 이용한다. Tempest 등의 방법을 사용하는 경우의 이점은, 인간화된 항체를 기초로 하는 NEWM 및 REI를 구성하는 연구 방법이 NEWM 및 REI 가변 영역의 3차원 구조가 X-선 결정학으로부터 공지되어 CDR 및 V 영역 구조틀 잔기 사이의 특정 상호 작용이 모델링될 수 있다는 것이다.

<93> 수행된 연구 방법에 상관 없이, 지급까지 제조된 초기 인간화 항체의 상동체의 예를 통해 확인할 수 있듯이, 이러한 방법이 수월한 방법은 아니다. 그러나, 이러한 구조틀의 변화가 필요할 수 있다는 사실을 인정하면, 이용할 수 있는 선행 기술을 기초로 하여, 구조틀 잔기가 목적으로 하는 특이성을 보유하는 기능적 인간화 재조합 항체를 얻도록 변형될 필요가 있을 것이라는 것을 예상할 수는 없다. 이렇게 얻어진 결과는 특이성 및/또는 친화성을 보존하는데에 필요한 변화가 대부분 주어진 항체에 특이적이며 상이한 항체의 인간화를 기초로하여 예상할 수 없다는 사실을 나타낸다.

<94> 본 발명에 유용한 임의의 알파4 서브유닛 함유 인테그린 길항 물질은 제조되었으며 또한 미국 특허 제 5,932,214 호(mab HP1/2)에 기술된 B 에피토프 특이성을 보유하는 키메라 및 인간화 재조합 항체의 상동체(즉, 원형의 면역글로불린 및 이의 일부)를 포함한다. 키메라(마우스 가변부 - 인간 불변부) 및 인간화된 항인테그린 항체의 상동체의 제조용인 출발 물질은 전술한 바와 같이, 시판되는 쥐과 동물의 모노클로날 항인테그린 항체(예를 들어, HP2/1, Amae International, Inc., Westbrook, Maine) 또는 본원의 교시에 따라서 제조된 모노클로날 항인테그린 항체일 수 있다. 다른 바람직한 인간화된 항VLA-4 항체의 상동체는 Athena Neurosciences, Inc.의 PCT/US95/01219 (1995년 7월 27일) 및 미국 특허 제 5,840,299 호(본원에 참고 문헌으로 인용함)에 기술되어 있다.

<95> 이러한 인간화된 항VLA-4 항체들은 인간화된 경쇄 및 인간화된 중쇄를 포함한다. 상기 인간화된 경쇄는 마우스의 21-6 면역글로불린 경쇄의 해당 상보성 결정 영역으로부터 얻은 아미노산 서열을 보유하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함하며, 최소한의 아미노산 위치를 제외한 인간의 카파 경쇄 가변부 영역 구조틀 서열로부터 얻어진 가변부 영역 구조틀에는 마우스 21.6 면역글로불린 경쇄 가변부 영역 구조틀의 균등한 위치에 존재하는 동일한 아미노산이 차지한다. 인간화된 중쇄는 마우스 21-6 면역글로불린 중쇄의 해당 상보성

결정 영역으로부터 얻어진 아미노산 서열을 보유하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함하며, 1 이상의 아미노산 위치를 제외한 인간의 카파 중쇄 가변부 영역 구조틀 서열로부터 얻어진 가변부 영역 구조틀에는 마우스 21-6 면역글로불린 중쇄 가변부 영역 구조틀의 균등한 위치에 존재하는 동일한 아미노산이 차지한다.

<96> 본 발명의 방법은 엄격한 조건하에서 알파4 서브유닛 함유 인테그린에 대하여 유도된 항체를 암호화하는 핵산 서열에 혼성화되는 핵산 서열에 의하여 암호화되는 길항 물질을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 길항 물질은 그 핵산이 높은 엄격성 조건하에서 미국 특허 제 5,840,299 호의 표 6에서 확인된 1 이상의 핵산 서열 또는 이러한 1 이상의 서열들에 상보적인 서열에 혼성화되는 단백질일 수 있다. 길항 물질은 또한 그 핵산이 높은 엄격성 조건하에서 미국 특허 제 5,932,214 호에서 확인된 서열 번호 2 또는 서열 번호 4를 암호화하는 핵산에 혼성화되는 단백질일 수도 있다. 추가로, 길항 물질은 또한 그 핵산이 높은 엄격성 조건하에서 세포주 ATCC CRL 11175에 의하여 생성된 항체의 가변 영역을 암호화하는 핵산에 혼성화되는 단백질일 수도 있다.

<97> 또는, 본 발명의 길항 물질은 그 핵산이 낮은 엄격성 조건하에서 미국 특허 제 5,840,299 호의 표 6에서 확인된 1 이상의 핵산 서열 또는 이러한 1 이상의 서열의 상보성 서열에 혼성화되는 단백질일 수 있다. 길항 물질은 또한 그 핵산이 낮은 엄격성 조건하에서 미국 특허 제 5,932,214 호에서 확인된 서열 번호 2 또는 서열 번호 4를 암호화하는 핵산에 혼성화되는 단백질일 수도 있다. 추가로, 길항 물질은 또한 그 핵산이 낮은 엄격성 조건하에서 세포주 ATCC CRL 11175에 의하여 생성된 항체의 가변 영역을 암호화하는 핵산에 혼성화되는 단백질일 수도 있다.

<98> ***C. 단편 및 유사체의 제조**

<99> 분리된 알파4 인테그린 길항 물질의 단편(예를 들어, 본원에 기술된 항체의 단편)은 또한 당 업계의 숙련자들에게 공지된 방법을 사용하는 재조합 방법, 단백질 분해성 분해법, 또는 화학 합성법에 의하여 효과적으로 제조될 수도 있다. 재조합 방법에서, 폴리펩티드의 내부 또는 말단 단편은 분리된 호저(hedgehog) 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열의 한쪽 말단(말단 단편) 또는 양쪽 말단(내부 단편)으로부터 1 이상의 뉴클레오타이드를 분리하여 생성될 수 있다. 돌연변이된 DNA의 발현은 폴리펩티드 단편들을 생성한다. "말단 첨단화(end nibbling)" 엔도뉴클레아제를 사용하는 분해는 또한 단편의 정렬을 암호화하는 DNA를 생성시킬 수 있다. 단백질 단편을 암호화하는 DNA는 또한 무작위 공유법(random shearing), 제한 분해법(restriction digestion) 또는 이들을 병용하거나 둘 다를 사용하여 생성될 수도 있다. 단백질 단편은 원형의 단백질로부터 직접적으로 생성될 수 있다. 펩티드는 플라스민, 트롬빈, 트립신, 키모트립신 또는 펩신을 포함하는(이에 한정되는 것은 아님) 단백질 분해성 효소에 의하여 특이적으로 절단될 수 있다. 이들 각각의 효소는 이들이 공격하는 펩티드 결합의 유형에 특이적이다. 트립신은 카르보닐기가 염기성 아미노산, 일반적으로는 아르기닌 또는 리신으로부터 얻어지는 펩티드 결합의 가수 분해를 촉매화한다. 펩신 및 키모트립신은 트립토판, 티로신 및 페닐알라닌과 같은 방향성 아미노산이 형성하는 펩티드 결합의 가수 분해를 촉매화한다. 절단된 단백질 단편의 택일적 세트는 단백질 분해성 효소에 감수성인 위치에서의 절단을 방지함으로써 생성된다. 예를 들어, 약염기성 용액에서의 리신의 ε-아미노산기 및 에틸트리플루오로티오아세테이트와의 반응 결과, 인접 펩티드 결합이 더 이상 트립신에 의한 가수 분해에 감수성이 아닌 차단된 아미노산 잔기를 생성한다. 단백질은 단백질 분해성 효소에 감수성인 펩티드 결합을 만들도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기의 β-할로에틸아민에 의한 알킬화의 결과, 트립신에 의하여 가수 분해되는 펩티드 결합을 생성한다(Lindley, (1956) Nature 178, 647). 더욱이, 특정 잔기에서 펩티드 사슬을 절단하는 화학 시약을 사용할 수 있다. 예를 들어, 브롬화시아노겐은 메티오닌 잔기에서의 펩티드를 절단한다(Gross 및 Witkip(1961), J. Am. Chem. Soc. 83, 1510). 그러므로, 단백질을 다양한 개질제, 단백질 분해성 효소 및/또는 화학 시약으로 병용 처리함으로써, 단백질은 중첩되지 않는 목적 길이의 단편으로 분해될 수 있거나, 또는 목적 길이의 중첩 단편으로 분해될 수 있다.

<100> 단편은 또한 메리필드 고체상 F moc 또는 t-Boc 화학적 방법과 같은 당 업계에 공지된 기법을 사용하여 화학적으로 합성될 수도 있다[Merrifield, Recent Progress in Hormone Research 23:451(1967).

<101> 단편 및 유사체를 제조 및 시험할 수 있는 선행 기술 방법의 예들은 이하에 기술되어 있다. 생물학적 활성을 보유하는 것으로 파악될 수 있는 분리된 알파4 인테그린 길항 물질의 단편 및 유사체를 제조 및 스크린하기 위하여 이러한 유사 방법들이 사용될 수 있다. 알파4 서브유닛 함유 인테그린 길항 물질의 단편 및 유사체가 생물학적 활성을 보유하는지의 여부를 시험하는 대표적인 방법은 제IV단락 및 실시예에서 살펴볼 수 있다.

<102> **D. 변형된 DNA 및 펩티드 서열의 제조: 무작위 방법**

<103> 단백질의 아미노산 서열 변이체는 단백질 또는 이의 특정 부분을 암호화하는 DNA의 무작위 돌연변이 유발법에 의하여 제조될 수 있다. 유용한 방법으로는 PCR 돌연변이유발법 및 포화 돌연변이유발법을 포함한다. 무작위 아미노산 서열 변이체의 라이브러리는 또한 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 서열의 세트를 합성함으로써 생성될 수 있다. 변형된 DNA 및 펩티드를 사용하는 주어진 단백질의 아미노산 서열 변이체를 제조하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 이러한 방법들의 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 단지 각각의 기법들을 예시하는데에 불과하다. 이러한 관점에서 당 업계에 통상의 기술을 습득한 사람들은 다른 방법들도 또한 유용하다는 사실을 인식할 것이다.

<104> PCR 돌연변이유발법: 예를 들어, Leung 등의 문헌(1989) Technique1, 11-15를 참조하시오.

<105> 포화 돌연변이유발법: 하나의 방법이 Mayers 등의 문헌(1989) Science 229, 242에 일반적으로 기술되어 있다.

<106> 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 돌연변이유발법: 예를 들어, Harang, S. A., (1983) Tetrahedron 39,3; Itakura 등의 문헌(1984) Ann. Rev. Biochem. 53, 323 및 Itakura 등의 문헌, Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules, pp.273-289(A.G.Walton, ed.), Elsevier, Amsterdam, 1981을 참조하시오.

<107> **E. 변형된 DNA 및 펩티드 서열의 제조: 지정 방법**

<108> 무작위적이지 않은, 또는 지정된 돌연변이유발법은, 분리된 폴리펩티드의 공지된 아미노산 서열의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는 변이체를 제공하기 위하여, 분리된 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 특정 부분에 특정 서열 또는 돌연 변이를 제공한다. 돌연변이 위치는, 예를 들어 (1) 첫번째 아미노산과 보존된 아미노산을 치환한 후 얻어진 결과들에 따라서 더욱 철저히 선택하고; (2) 표적 잔기를 결실시키거나; 또는 (3) 배치된 위치에 인접한 동일하거나 또는 상이한 잔기들을 삽입하거나, 또는 상기 (1) 내지 (3)을 병행하여, 독립적으로 또는 연속적으로 변형될 수 있다.

<109> 분명하게, 이러한 위치 지정법은 N-말단 시스테인(또는 기능적 균등물)을 주어진 폴리펩티드 서열에 도입시켜 소수성 부에 대한 부착 위치를 제공할 수 있는 하나의 방법이다.

<110> 알라닌 스캔 돌연변이유발법: 예를 들어 Cunningham 및 Wells(1989) Science 244, 1081-1085를 참조하시오.

<111> 올리고뉴클레오타이드 매개성 돌연변이유발법: 예를 들어 Adelman 등의 문헌(1983), DNA 2, 183을 참조하시오.

<112> 카세트 돌연변이유발법: Wells 등의 문헌(1985) Gene 34, 315를 참조하시오.

<113> 병용 돌연변이유발법: 예를 들어, Ladner등의 문헌, WO 88/06630을 참조하시오.

<114> 파아지 디스플레이 기술: 예를 들어, Marks 등의 문헌, J. Biol. Chemistry: 267 16007-16010(1992)를 참조하시오.

<115> **F. 인테그린 길항 물질의 기타 변이체**

<116> 변이체는 본원에 기술된 다른 인테그린 길항 물질과는 아미노산 서열 또는 서열과 관련 없는 방식들과, 또는 상기 둘 다의 관점에서 상이할 수 있다. 본 발명의 가장 바람직한 폴리펩티드는 (예를 들어, 이들의 N-말단부의) 생체내 또는 시험관내 화학적 유도법 및 아세틸화, 메틸화, 인산화, 아민화, 카르복실화 또는 글리코실화에서의 가능한 변법을 포함하는 바람직한 비서열성 변형을 보유한다.

<117> 다른 유사체는 1 이상의 보존적 아미노산 치환 또는 1 이상의 비보존적 아미노산 치환, 또는 분리된 단백질의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 결실 또는 삽입에 의하여 그 서열이 미국 특허 제 5,840,299 호 또는 미국 특허 제 5,888,507 호; 미국 특허 제 5,932,214 호(모두 본원에 참고 문헌으로 인용함) 또는 PCT US/94/00266에서 확인된 서열과 상이한 단백질 또는 이의 생물학적 활성 단편을 포함한다. 통상적으로 보존적 치환은 하나의 아미노산을 예를 들어 다음의 군내에서의 치환과 같이, 이와 유사한 특성을 보유하는 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다: 발린, 알라닌 및 글리신; 류신 및 이소류신; 아스파르트산 및 글루탐산; 아스파라긴 및 글루타민; 세린 및 트레오닌; 리신 및 아르기닌; 및 페닐알라닌 및 티로신. 비극성의 소수성 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함한다. 극성의 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된(염기성의) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된(산성의) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 다른 보존적 치환도 통상의 숙련자에 의하여 용이하게 공지될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 알라닌에 있어서는, D-알라닌, 글리신, 베타-알라닌, L-시스테인 및 D-시스테인 중의 임의의 것으로부터 보존적 치환이 수행될 수 있다. 리신에 있어서는, D-리신, 아르기닌, D-아르기닌, 호모-아르기닌, 메티오닌, D-메티오

닌, 오르니틴 또는 D-오르니틴 중의 임의의 것으로부터 치환이 수행될 수 있다.

<118> 본 발명의 범위내에서 사용되는 다른 유사체는 펩티드 안정성을 증가시키는 변형을 보유하는 것 일수 있다. 이러한 유사체들은, 예를 들어 펩티드 서열중 1 이상의 비펩티드 결합(펩티드 결합을 치환하는)을 함유할 수 있다. 또한 D-아미노산과 같은 자연 발생적 L-아미노산 이외의 잔기, 또는 베타 또는 감마 아미노산과 같은 비자연발생적 아미노산 또는 합성 아미노산 및 시클릭 유사체 이외의 잔기를 포함하는 유사체도 포함된다. L-아미노산 대신에 D-아미노산을 분리된 호저 폴리펩티드에 혼입시키면 이의 프로테아제에 대한 내성을 증가시킬 수 있다. [참조 문헌: 예를 들어, 미국 특허 제 5,219,990 호 (상동)].

<119> 바람직한 항체의 상동체는 PS/2 항체의 아미노산 서열에 대하여 60%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하거나(실시예 참조) 또는 미국 특허 제 5,840,299 호(서열 번호 15 - 경쇄 가변부 영역 또는 서열 번호 17 - 중쇄 가변부 영역) 또는 미국 특허 제 5,932,214 호(서열 번호 2 또는 4); 및 공개된 특허 출원 WO 94/16094(기탁된 세포주 ATCC CRL 11175의 항VLA-4 항체에서 발견되는 서열)에 기술된 아미노산 서열에 대하여 60%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.

<120> **G. 중합체 접합 형태**

<121> 광범위한 본 발명의 범위내에서, 단일 중합체 분자가 또한 1 이상의 중합체 분자가 부착될 수 있는 것으로 간주됨에도 불구하고, 단일 중합체 분자는 알파1 또는 알파4 인테그린 길항 물질과 접합시키는데에 사용될 수 있다. 본 발명의 접합된 알파4 인테그린 길항 물질 조성물은 생체내 및 비생체내 사용시 유용성을 파악할 수 있다. 더욱이, 중합체의 접합은 최종의 적합한 용도로서 사용되는 임의의 다른 기, 부 또는 다른 접합종을 이용할 수 있다는 사실을 인지할 것이다. 예를 들어, 몇몇 용도에서 상기 중합체에 UV 분해 저항성 또는 산화 방지 특성, 또는 기타 특성 또는 특징들을 부여하는 중합체 기능성 부에의 공유 결합이 유용할 수 있다. 추가의 실시예로서, 몇몇 용도에서 전체 접합된 물질의 다양한 특성 또는 특징을 강화시키기 위하여, 상기 중합체가 반응성이 되도록 만들고 약물 분자와 가교 결합을 형성할 수 있도록 기능화시키는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 상기 중합체는 의도로 하는 목적을 위하여 접합된 알파4 인테그린 길항 물질 조성물의 효능을 억제하지 않는 임의의 기능성, 반복기, 결합 또는 기타 구성체 구조를 함유할 수 있다. 본 발명의 다른 목적 및 이점은 다음의 개시된 사항 및 부속 청구항으로부터 더욱 완전히 명백해질 것이다.

<122> 이러한 바람직한 특성을 이룰수 있도록 유용하게 사용될 수 있는 예시적인 중합체는 이하 본원의 대표적인 반응 계획에 기술되어 있다. 공유적으로 결합된 길항 물질/중합체 접합체에서, 중합체는 기능화되어 길항 물질의 유리 아미노산과 커플링되어 약한 결합을 형성할 수 있다.

<123> 접합체가 또한 비말단 반응기로부터 분지될 수 있음에도 불구하고, 알파4 또는 알파1 서브유닛 함유 인테그린에 대한 길항 물질은 중합체상의 말단 반응기를 통하여 접합되는 것이 가장 바람직하다. 반응기(들)를 보유하는 중합체는 본원에서 "활성화된 중합체"라 칭하여진다. 상기 반응기는 길항 물질 분자상의 유리 아미노기 또는 다른 반응기와 선택적으로 반응한다. 활성화된 중합체(들)는 반응하여 리신의 알파 아미노기 또는 엡실론-아미노기와 같은 임의의 이용할 수 있는 알파4 인테그린 길항 물질 아미노산에 부착될 수 있다. 유리 카르복실기, 적합하게 활성화된 카르보닐기, 히드록실부, 구아니딜부, 산화된 탄수화물부 및 (허용 가능하다면) 알파4 인테그린 길항 물질의 머캅토기도 또한 부착 위치로서 사용될 수 있다.

<124> 중합체가 인테그린 길항 물질 분자상의 임의의 위치에 부착될 수 있음에도 불구하고, 인테그린 길항 물질(특히 단백질인 길항 물질)에 커플링되는 중합체를 위하여 제조된 위치는 인테그린 길항 물질의 N-말단인 것이 바람직하다. 두번째 위치(들)는 C-말단에 또는 그 근처에 (존재한다면) 당부를 통하여 존재한다. 그러므로, 본 발명은 (ⅰ) 알파1 및 알파4 인테그린 길항 물질의 N-말단에 커플링된 중합체 접합체; (ⅱ) 알파1 및 알파4 인테그린 길항 물질의 C-말단에 커플링된 중합체 접합체; (ⅲ) 당과 커플링된 접합체; 및 (ⅳ) 알파1 및 알파4 인테그린 길항 물질의 N-, C- 및 당-커플링된 중합체 접합체에 관한 것이다.

<125> 일반적으로 활성화된 중합체는, 길항 물질의 농도에 따라서 길항 물질의 1몰당 약 1.0 ~ 약 10 몰 정도가 사용된다. 최종량은 생성물의 반응 정도를 최대화시면서 이를 비특이적으로 변형시키는 양과, 동시에 최적 활성을 유지시킬 화학 물질을 제한하면서 가능한 경우 상기 길항 물질의 반감기를 최적화시키는 양 사이의 균형을 맞춘 양이다. 바람직하게, 상기 길항 물질의 생물학적 활성의 약 50% 이상이 유지되며, 가장 바람직하게는 100%가 유지된다.

<126> 상기 반응은 생물학적으로 활성인 물질과 비활성 중합체를 반응시키는데에 사용되는 당 업계에 인지된 임의의 적합한 방법에 의하여 수행될 수 있다. 일반적으로 상기 방법은 (1 이상의 말단 히드록실기를 보유할 수 있는)

활성화된 중합체를 제조한후 상기 길항 물질을 상기 활성화된 중합체와 반응시켜 제형에 적합한 가용성 단백질을 생성하는 단계를 포함한다. 상기 변형된 반응은 1 이상의 단계들을 포함할 수 있는 몇몇 방법에 의하여 수행될 수 있다.

<127> 전술한 바와 같이, 본 발명의 임의의 구체예는 상기 중합체에 대한 결합으로서 인테그린 길항 물질의 N-말단을 이용한다. 적합한 통상의 방법들은 N-말단이 변형된 알파1 또는 알파4 인테그린 길항 물질을 선택적으로 얻는데에 사용된다. 적합한 인테그린 길항 물질상에서의 유도화에 이용할 수 있는 상이한 유형의 1차 아미노기(리신상의 엡실론 아미노기 대 N-말단 메티오닌상의 아미노기)의 순차적 반응성을 이용하는 환원적 알킬화 방법에 의하여 하나의 방법이 예시된다. 적합한 선택 조건하에서, N-말단에서의 카르보닐기 함유 중합체로써 적합한 인테그린 길항 물질의 실질적으로 선택적인 유도화가 N-말단에서 수행될 수 있다. 상기 반응은 인테그린 길항 물질의 리신 잔기의 엡실론-아미노기 사이의 pKa 차이 및 N-말단 잔기의 알파-아미노기 사이의 pKa 차이를 이용할 수 있는 pH에서 수행된다. 이러한 유형의 화학적 방법은 당 업계의 통상의 숙련자들에게 널리 공지되어 있다.

<128> PEG와 같은 폴리알킬렌 글리콜 중합체를 알파1 또는 알파4 인테그린 길항 물질(예를 들어, 단백질)의 C-말단에 대하여 표적화시키는 기술은 중합체 부를 표적화하는데에 사용될 수 있는 위치를 화학적으로 부착시키거나 또는 유전적으로 조작하는 것이다. 예를 들어, Cys를 단백질의 C-말단에 또는 그 근처의 위치에 혼입시키면 업계에서 인지된 폴리알킬렌 글리콜(예를 들어, PEG)의 말레이미드, 비닐설폰 또는 할로아세테이트 활성화된 유도체를 사용하는 특이적 변형이 가능하다. 이러한 유도체는 Cys에 대한 시약의 고도의 선택성으로 인하여 조작된 시스테인의 변형에 특이적으로 사용될 수 있다. 단백질상의 표적화될 수 있는 히스티딘 태그(Fancy 등의 문헌(1996), Chem. & Biol. 3:551) 또는 부가적 글리코실화 위치의 혼입은, 본 발명의 인테그린 길항 물질의 C-말단을 변형하기 위한 기타의 택일적 방법을 나타낸다.

<129> 화학적 변형을 위한 위치로서 당을 표적화시키는 방법은 또한 널리 공지되어 있으므로 폴리알킬렌 글리콜 중합체는 산화를 통하여 활성화된 인테그린 길항 물질상의 당(존재한다면)에 직접적이고 특이적으로 부가될 수 있을 것이다. 예를 들어, 상대적으로 안정한 히드라존 결합을 형성하는 폴리에틸렌글리콜-히드라지드는 알데히드 및 케톤으로 축합함으로써 생성될 수 있다. 이러한 특성은 산화된 올리고당 결합을 통한 단백질의 변형에 사용된다. Andresz, H. 등의 문헌, (1978), Makromol. Chem. 179:301. 특히, PEG-카르복시메틸 히드라지드를 니트리트로 처리하면 아미노기에 대하여 반응성인 친전자적으로 활성인 기인 PEG-카르복시메틸 히드라지드가 생성된다. 상기 반응은 또한 폴리알킬렌 변형 단백질을 제조하는데에 사용될 수 있다[참조 문헌: 미국 특허 제 4,101,380 호 및 동 제 4,179,337 호].

<130> 다가 알파1 또는 알파4 인테그린 길항 물질 조성물을 형성하기 위하여 단백질의 가교 결합을 추가로 촉진시키는데에 당 업계에 인지된 티올 링커 매개성 화학 물질을 사용할 수 있다. 특히, 반응성 알데히드를 통하여 시스타민 접합체를 형성하고 상기 시스타민상의 티올기에 의하여 가교 결합을 유도하는, 과요오드산나트륨으로 탄수화물 부의 반응성 알데히드를 생성시킬 수 있다. [참조 문헌: Pepinsky, B. 등의 문헌, 1991, J. Biol. Chem., 266: 18244-18249 및 Chen, L.L. 등의 문헌(1991) J. Biol. Chem., 266:18237-18243]. 따라서, 이러한 유형의 화학 물질은 또한 링커가 당에 혼입되고 폴리알킬렌 글리콜 중합체가 상기 링커에 부착되는 경우 폴리알킬렌 글리콜 중합체로 변형시키는데에 적합하다. 아미노티올 또는 히드라진 함유 링커는 단일 중합체기를 부가시킬 것인 반면에, 상기 링커의 구조는 다양하여 다중성 중합체가 첨가되고/첨가되거나 인테그린 길항 물질에 관한 상기 중합체의 공간적 배향이 변화될 수 있다.

<131> 본 발명의 수행에서, $C_{1\sim4}$ 알킬 폴리알킬렌 글리콜의 폴리알킬렌 글리콜 잔기, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 이러한 글리콜의 폴리(옥시)알킬렌 글리콜 잔기가 목적 중합체 시스템에 유리하게 혼입된다. 따라서, 중합체가 실온에서 물에 가용성인 모든 경우에서, 단백질이 부착되는 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 상동성 중합체일 수 있거나 또는 폴리옥시에틸렌 폴리올이다. 블록 공중합체의 수용해성이 유지되는 경우, 이러한 중합체의 비제한적 예로서는 PEG 또는 폴리프로필렌 글리콜과 같은 산화 폴리알킬렌의 단독 중합체, 폴리옥시에틸렌화된 글리콜, 이들의 공중합체 및 이들의 블록 공중합체를 포함한다. 폴리에틸화된 폴리올의 예로서는, 예를 들어 폴리옥시에틸화된 글리콜, 폴리옥시에틸화된 소르비톨, 폴리옥시에틸화된 글루코즈등을 포함한다. 폴리옥시에틸화된 글리세롤의 글리세롤 골격은 예를 들어, 동물 및 인간에서 모노-, 디- 및 트리글리세리드로 자연적으로 발생되는 것과 동일한 골격이다. 따라서, 이러한 분지화는 체내에서의 외래성 제제로서 간주될 필요는 없다.

<132> 산화폴리알킬렌에 대한 대안으로서, 덱스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐 알코올, 탄수화물계 중합체등이 사용될 수 있다. 당 업계의 통상의 숙련자들은 전술한 목록들은 단지 예시적인 것이며 본원에

기술된 특성을 보유하는 모든 중합체 물질이 고려된다는 사실을 인식하게 될 것이다.

<133> 상기 중합체는 임의의 특정 분자량을 보유할 필요는 없으나, 상기 분자량은 약 300 ~ 100,000 사이인 것이 바람직하며, 10,000 ~ 40,000 사이인 것이 더욱 바람직하다. 특히, 신장에서의 여과로 인하여 생성물이 손실되는 것을 방지하는데에는 20,000 이상의 크기인 것이 가장 좋다.

<134> 폴리알킬렌 글리콜 유도화는 폴리알킬렌 글리콜 유도체의 이하의 특성들과 관련된 본 발명의 실시에 있어서, 중합체 인테그린 길항 물질의 접합체의 제형화에 다수의 유리한 특성을 보유한다: 항원 반응 또는 면역원 반응을 나타내지 않음과 동시에 수용해성의 개선; 고도의 생체적합성; 폴리알킬렌 글리콜 유도체의 생체내 생분해의 부재; 및 생존 유기체에 의한 분비의 용이성.

<135> 더욱이, 본 발명의 다른 측면에서, 접합의 특성으로서 절단 가능한 공유 화학 결합을 포함하는 중합체 성분에 공유적으로 결합하는 알파1 또는 알파4 인테그린 길항 물질을 이용할 수 있다. 이는 중합체가 인테그린 길항 물질로부터 절단될 수 있는 시간 경과의 관점에서 조절할 수 있다. 상기 인테그린 길항 물질 및 중합체 사이의 공유 결합은 화학적 반응 또는 효소적 반응에 의하여 절단될 수 있다. 중합체-인테그린 길항 물질 생성물은 허용 가능한 양의 활성을 보유한다. 뿐만 아니라, 폴리에틸렌 글리콜의 일부는 접합 중합체에 존재하여 상기 중합체-인테그린 길항 물질 접합체에 고도의 수용해성 및 연장된 혈액 순환 능력을 부여한다. 개선된 특성들의 결과로서, 본 발명은 활성 중합체-알파4 인테그린 길항 물질 종 둘다의 비경구적, 비강 및 구강 운반 방법, 및 다음과 같은 생체내 적용에서의 인테그린 길항 물질 자체의 가수 분해성 절단, 생체 적합성에 관한 것이다.

<136> 본원에 기술된, 예를 들어 비경구 투여 및 구강 투여를 위한 용해성, 안정성 및 세포막 친화도를 얻기위한 알파 1 또는 알파4 인테그린 길항 물질의 변형에 이용될 수 있는 반응 및 구조에 있어서 반응 계획은 단지 예시용으로 제공된 것으로서 본 발명을 제한하는 것은 아니라는 것을 이해하여야 한다. 상기 인테그린 길항 물질 접합체의 활성 및 안정성은, 분자 크기가 상이한 중합체를 사용함으로써, 몇가지 면에서 다양할 수 있다. 상기 접합체의 용해성은 중합체 조성물에 혼입된 폴리에틸렌 글리콜 단편의 비율 및 크기를 변화시킴으로써 변화할 수 있다.

<137> **Ⅲ. 유용성**

<138> 단일 투여 형태를 제조하기 위하여 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료 받는 개체, 특히 투여 방식에 따라서 다양할 것이다. 그러나, 임의의 특정 개체에 대한 특이적인 투여 방식 및 치료 방법은, 사용된 특정 화합물, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별, 식이 요법, 투여 시간, 방출 속도, 약물의 조합물 및 치료 의사의 판단 및 치료받는 특정 질병의 심각성을 포함하는 다양한 요인들에 의존성일 것이라는 사실을 이해하여야 한다. 활성 성분의 양은 또한 성분이 동시 투여되는, 치료제 또는 예방제에 의존성이다.

<139> 본 발명에 의한 치료 방법은 개체에 본 발명의 길항 물질을 유효량 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법에서의 투여량은 유효하며 비독성인 양이다. 통상적인 임상 시험 방법을 사용하는 당 업계의 숙련자들은 치료받는 특정 질병에 대한 최적의 투여량을 결정할 수 있다.

<140> 약학 제제

<141> 본 발명의 방법에서, 본 발명의 길항 물질은 비경구적으로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 "비경구적"이란 용어는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 초내, 간내, 병소내 및 두부내 주사 또는 주입 기법을 포함한다. 투여는 개체에, 매일 1회 이상, 정맥내, 구강내, 항문, 비경구적, 비강내, 국소적 또는 흡입에 의하여 투여되는 것이 바람직하다. 투여는 또한 연속적 정맥내 주입법에 의하여도 수행될 수 있다.

<142> 항체의 상동체는, 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 멸균성의 약리학적 조성물로서 투여되는 것이 바람직한데, 상기 담체는, 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충된 염수, 덱스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등, 또는 이들의 조합물과 같은 다수의 널리 공지된 담체중 임의의 것일 수 있다. 본 발명의 화합물들은 무기 또는 유기 산 및 염기로부터 유도된 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 산의 염으로는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파레이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 비설페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캠포레이트, 캠포설포네이트, 시클로펜타프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 2-히드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐-프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르타레이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 운데카노에이트를 포함한다. 염기의 염으로는 암모늄염, 예를 들어 나트륨염 및 칼륨염과 같은 알칼리 금속염,

예를 들어 칼슘염 및 마그네슘염과 같은 알칼리토금속염, 예를 들어 디시클로헥실아민염과 같은 유기 염기를 보유하는 염, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸)메틸아민 및 예를 들어 아르기닌, 리신 등과 같은 아미노산을 보유하는 염을 포함한다. 또한, 상기 염기성 질소 함유기는, 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸의 염화물, 브롬화물 및 요오드화물과 같은 저급 할로겐화 알킬; 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 설페이트와 같은 디알킬 설페이트, 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴의 염화물, 브롬화물 및 요오드화물과 같은 장쇄 할로겐화물, 벤질 및 페네틸 브롬화물 등과 같은 아랄킬 할로겐화물과 같은 제제로 4차화될 수 있다. 물 또는 오일 가용성 또는 가분산성 생성물이 얻어진다.

<143> 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 임의의 화합물을 포함하거나, 이들의 약학적으로 허용 가능한 유도체를 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함한다. 본원에 사용된 "담체"란 용어는 허용 가능한 보조제 및 비히클을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체들로서는, 이온 교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 예를 들어 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질, 포스페이트, 글리신, 소르빈산, 소르빈산칼륨과 같은 완충 물질, 포화 식물성 지방산과 같은 부분 글리세르화 혼합물, 물, 염 또는 예를 들어 프로타민 설페이트, 인산수소2나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드성 실리카, 삼규산화마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈계 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복실메틸셀룰로즈, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 라놀린과 같은 전해질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<144> 본 발명에 의하면, 약학 조성물은, 예를 들어 멸균의 주사 가능한 수성 또는 유성 현탁액과 같은 멸균의 주사 가능한 제제의 형태일 수 있다. 상기 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당 업계에 공지된 기법에 따라서 제형화될 수 있다. 상기 멸균의 주사 가능한 제제는 또한, 예를 들어 1,3-부탄디올중 용액과 같이, 비독성의 비경구적으로 허용 가능한 희석제 또는 용매중의 멸균의 주사 가능한 용액 또는 현탁액일 수도 있다. 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매들로서는, 물, 링거 용액 및 염화나트륨 등장액이 있다. 더욱이, 멸균의, 비휘발성 오일은 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 이러한 목적에 있어서, 합성 모노- 또는 디-글리세라드를 포함하는 임의의 순한 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 올리브 오일 또는 피마자유와 같은 자연 상태의 약학적으로 허용 가능한 오일이 유용한 것과 같이, 올레산과 같은 지방산 및 이의 글리세리드 유도체가 주사 가능한 제제에, 특히 이의 폴리옥시에틸화된 형태로 유용하다.

<145> 본 발명의 약학 조성물은 구강 투여될 수 있다. 구강 투여되는 경우, 이들은 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 수용액을 포함하는(이에 한정되는 것은 아님) 임의의 구강에 허용 가능한 투여 형태로 투여될 수 있다. 구강용 정제의 경우, 통상적으로 사용되는 담체들은 락토즈 및 옥수수 녹말을 포함한다. 예를 들어 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제도 또한 통상적으로 첨가된다. 캡슐 형태의 구강 투여에 있어서, 유용한 희석제로서는 락토즈 및 건조된 옥수수 녹말을 포함한다. 수성 현탁액이 구강용으로 필요한 경우, 활성 성분은 유화제 및 현탁제와 조합된다. 원하는 경우, 임의의 감미제, 풍미제 또는 발색제도 첨가될 수 있다.

<146> *본 발명의 방법에 사용하기 위한 특정 조성물은 길항 물질이 리포좀 함유 조성물과 같은 소포내에서 제형화되는 조성물이다. 리포좀은, 예를 들어 포스파티딜 콜메즈, 에탄올아민 및 세린, 스핑고미엘린, 카르디오리피드, 플라스마로겐, 포스파티딘산 및 세레비오사이드와 같은 극성 지질과 같은 양극성 분자에 의하여 형성된 소포이다. 리포좀은 적합한 양극성 분자가 물 또는 수용액에서 팽창하여 각각 수성 물질로 분리되는 다수의 이중층으로 이루어진 다중층 구조의 액체 결정을 형성하는 경우 형성된다(이를 성긴 리포좀(coarse liposome)이라고도 칭함). 수성 물질을 감싸는 단일 이중층으로 이루어진 것으로 공지된 다른 유형의 리포좀을 단일 라멜라 소포(unilamella vesicle)라고도 부른다. 수용성 물질이 상기 지질이 팽창하는 중에 수성상에 포함되는 경우, 이들은 지질 이중층 사이의 수성층내에 트래핑된다.

<147> 본 발명의 길항 물질의 리포좀의 제형화된 형태를 제조하는 특히 편리한 방법은 본원에 참조 문헌으로 인용되어 있는 EP-A-253,619 에 기술되어 있다. 이러한 방법에서, 단일의 이중층 리포좀을 함유하는 캡슐화된 활성 성분은 수성 성분을 고속 균질화기 또는 혼합 수단으로 혼합시키면서, 지질 성분을 유기 매질에 용해시키고, 가압하에서 지질 성분의 유기 용액을 수성 성분에 주입함으로써, 리포좀이 형성됨과 동시에 제조된다. 상기 단일의 이중층 리포좀을 함유하는 캡슐화된 활성 성분은 직접적으로 사용될 수 있거나 또는 국소 투여용의 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체에 사용될 수 있다. 상기 리포좀의 점성은, 예를 들어 잔탄 검, 히드록시프로필 셀룰로즈, 히드록시프로필 메틸셀룰로즈 및 이들의 혼합물과 같은 1 이상의 적합한 농후제를 첨가함으로써 증가될 수 있다. 수성 성분은 물 만으로 구성될 수 있거나 또는 전해질, 완충계 및 예를 들어, 보존제와 같은 기타 성분들을 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 전해질들은 알칼리 금속염 및 알칼리 토금속염과 같은 금속염을 포함한다. 상기 금속염들로서는 염화칼슘, 염화나트륨 및 염화칼륨이 바람직하다. 상기 전해질의 농도는 0

~ 260 mM, 바람직하게는 5 ~ 160 mM로 다양할 수 있다. 수성 성분은 유기 성분을 주사하는 경우 격렬하게 요동시켜 균질화되도록 적용될 수 있는 적합한 용기내에 담아질 수 있다. 2가지 성분들의 균질화는 용기내에서 수행될 수 있거나, 또는 수성 성분 및 유기 성분은 각각 상기 용기의 외부에 위치하는 혼합 수단에 주입될 수 있다. 후자의 경우, 리포좀은 수집하기 위하여 혼합 수단내에서 형성되어 이후 다른 용기로 옮겨진다.

<148> 유기 성분은 적합한 비독성의, 약학적으로 허용 가능한 용매, 예를 들어 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜, 및 상기 용매에 용해되는 적합한 인지질로 구성되어 있다. 사용될 수 있는 적합한 인지질로서는, 예를 들어 레시틴, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올-아민, 포스파티딜이노시톨, 리소포스파티딜콜린 및 포스파티딜 글리세롤을 포함한다. 선택적으로 상기 리포좀의 특성을 변형시키기 위하여 기타 친지질성 첨가물이 사용될 수 있다. 이러한 기타 첨가물의 예들로서는 스테아릴아민, 포스파티딘산, 토코페롤, 콜레스테롤 및 라놀린 추출물을 포함한다.

<149> 더욱이, 인지질의 산화를 방지할 수 있는 기타 성분들이 상기 유기 성분에 첨가될 수 있다. 이러한 기타 성분들의 예로서는 토코페롤, 부틸화된 히드록시아니졸, 부틸화된 히드록시톨루엔, 아스코르빌 팔미트산염 및 아스코르빌 올레산염을 포함한다. 벤조산, 메틸 파라벤 및 프로필 파라벤과 같은 보존제들도 첨가될 수 있다.

<150> 전술한 조성물은 별도로 하고, 예를 들어, 깁스, 붕대, 드레싱, 거즈 패드 등과 같은, 적합한 양의 항VLA 항체 치료제를 함유하는 커버를 사용할 수 있다. 몇몇 경우에 상기 치료 제형을 함유하는 국소 제형이 함침된 깁스, 붕대, 드레싱, 거즈 패드 등을 사용할 수 있다.

<151> 본 발명의 약학 조성물은 또한 분무기, 건조 분말 흡입기 또는 계량 투여 흡입기를 사용함으로써 비강 에어로졸 또는 흡입에 의하여 투여될 수 있다. 약학 제형 업계에 널리 공지된 기법에 의하여 이러한 조성물들이 제조될 수 있으며, 생체 적합성을 강화시키기 위하여 벤질 알코올 또는 기타 적합한 보존제, 흡수 촉진제를 사용하고 플루오르화탄소 및/또는 기타 통상의 용해제 또는 분산제를 사용하여, 염수중 용액으로서 제조될 수 있다.

<152> 다른 구체예에 의하여 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물은 또한 코르티코스테로이드, 항염증제, 면역억제제, 대사길항물질 및 면역조절제로 이루어진 군으로부터 선택된 부가제를 포함할 수도 있다. 상기 군의 각각에 존재하는 특정 화합물들은, "Comprehensive Medicinal Chemistry", Pergamon Press, Oxford, England, pp. 970-986(1990)(본원에 참고 문헌으로서 인용함)의 표제하에, 적합한 군으로 나열된 것들로부터 선택될 수 있다. 또한 상기 군에는 테오필린, 설파살라진 및 아미노살리실산염(항염증제); 싸이클로스포린, FK-506 및 라파마이신(면역 억제제); 싸이클로포스파미드 및 메토트렉세이트(대사길항물질); 스테로이드(흡입, 구강 또는 국소 투여용) 및 인터페론(면역조절제)와 같은 화합물을 포함한다.

<153> 목적 효과를 나타내는 본 발명의 화합물의 투여량 및 투여 속도는, 예를 들어 길항 물질의 특성, 개체의 크기, 치료 목적, 치료받는 병상의 특성, 사용된 특정 약학 조성물 및 치료 의사의 판단과 같은 다양한 요인에 의존성일 것이다.

<154> 활성 성분 화합물의 투여량 수준은 1일에 약 0.001 ~ 약 100 ㎎/체중 1㎏, 바람직하게는 약 0.1 ~ 약 50 ㎎/체중 1㎏인 것이 유용하다. 가장 바람직하게, 항체 또는 항체의 유도체의 경우, 상기 VLA-4 결합제는 약 0.1 ~ 약 20 ㎎/체중 1㎏/1일, 바람직하게는 약 0.1 ~ 약 10 ㎎/체중 1㎏/1일로 투여될 것이며 1 ~ 14일 간격으로 투여될 것이다. 비항체 또는 소분자 결합제의 경우, 투여량의 범위는 바람직하게는 상기 양의 항체에 해당하는 몰당량 사이인 것이 바람직하다. 바람직하게, 항체 조성물은 항체의 혈장 수준을 제공하는데에 유용한 양인 1 ㎎/㎖ 이상의 양으로 투여된다. 투여의 최적화는 결합제의 투여 이후, 생체내 주어진 투여량으로 투여된 이후 시간이 경과함에 따라서 상기 제제에 의한 인테그린 양성 세포의 피복 여부를 측정함으로써 결정될 수 있다.

<155> 투여된 제제의 존재는 각각의 세포가 표지화된(예를 들어 형광색소에 의하여) 동일 제제에 결합할 수 없는지 여부 또는 결합 능력의 감소에 의하여 시험관내(또는 생체외)에서 검출될 수 있다. 바람직한 투여량은 인테그린 양성 세포의 대다수를 검출 가능하도록 피복시켜야 하는 양이다. 바람직하게, 피복은 항체의 상동체의 경우 1 ~14일 동안 지속되어야 한다.

<156> 당 업계의 통상의 숙련자는 본 발명의 길항 물질이 의도로 하는 효과를 보유하는지 여부에 관하여 용이하게 시험할 수 있다. 임상학적 회수에 관한 표준적 시험(예를 들어, 항체 결합에 관한 세척액 및 FACS 스캔 결과; 강화 활력성 폐활량의 개선)이 효능을 측정하는데에 숙련자에 의하여 사용될 것이다. 예를 들어, 개체의 폐 조직의 시료중에 함유된 세포들은 투여된 제제를 검출하는 제2 시약을 사용하여 시험관내(또는 생체외) 제제의 존재에 대하여 프로빙된다. 예를 들어, 이는 표준적인 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter; 형광 활성화 세포 추출기) 분석에 의하여 측정되는 투여된 제제에 특이적인 형광 색소 표지된 항체일 수 있다. 또는, 개체의

세포가 표지된(예를 들어, 형광색소에 의하여) 동일한 제제에 결합할 수 없는것 또는 이의 감소된 능력에 의하여 투여된 제제의 존재가 시험관내(또는 생체외)에서 검출된다. 바람직한 투여량은 인테그린 양성 세포의 대다수를 검출 가능하도록 피복시켜야 하는 양이다. 바람직하게, 피복은 항체의 상동체의 경우 1 ~14일 동안 지속되어야 한다.

<157> 이하 실시예들은 본 발명을 예시하기 위하여 제공된 것으로서, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

<158> **실시예 1: 폐 섬유증 동물 모델**

<159> 널리 사용되는 블레오마이신(BL)-설치류 모델의 폐 섬유증에 염증 세포 및 매개제가 관련되어 있다는 많은 증거들이 기록되어 있다. 이러한 모델은 인간 질병의 다수의 성분들을 보유하는 섬유증의 특징적인 형상을 나타내고 있고, BL 유도성 폐 섬유증이 인간의 화학 요법에서의 역효과로서 널리 인식되어 있기 때문에, 설득력이 있다. 설치류에서 BL의 기관내(IT) 흡입은 섬유 성장의 기작을 연구하고 잠재적으로 바람직한 항섬유증 화합물을 스크린하는데에 널리 사용된다. 일단 BL이 철 및 DNA에 결합하면 BL-유도성 폐 독성의 초기 유발이 활성 산소종(ROS)을 생성시킴에도 불구하고, 폐 섬유증을 최종적으로 규명하는 방법은 다양한 염증 매개제의 방출과 관련되어 있다[Giri 및 Wang., Comments Toxicol., 3:145-176(1989)]. BL-유도성 폐 상해의 병인론은 최초로 수종, 출혈 및 호중구와 대식세포에 의하여 좌우되는 세포 침투에 의하여 밝혀졌다. 폐의 맥관, 간극 및 폐포 공간내 염증성 백혈구의 과도한 축적은 ROS 및 단백질 분해성 효소의 생성에 의한 맥관 상해 및 선세포 조직 상해를 유발시킬 수 있었다. 호중구는 H_2O_2를 사용하는 반응에서 Cl^- 를 하이포아염소산(HOCl)으로 산화시킬 수 있는, 상당량의 미엘로퍼옥시다제(MPO)를 함유하며, 호중구 유도성 HOCl는 세포 독성을 일으키는 것으로 공지되어 있다. 대식 세포 및 호중구 유도성 ROS는 강화 섬유증식성 반응을 매개하는 염증 이후의 섬유증 시토킨의 생성을 자극시킬 수 있다[Phan 및 Kunkel, Exp. Lung Res., 18:29-43(1992)]. 큰 염증 세포 침투 이외에, 섬유증 과정은 활성화된 섬유아세포의 과다 증식성 반응을 추가의 특징으로 한다. 섬유아세포 유사성 세포는 주로 허파 콜라겐 함량을 상당히 증가시키고, 초구조성 모양의 이상 및 콜라겐 형태의 공간적 분포에 영향을 미친다.

<160> **실시예 2: 알파4 서브유닛 함유 인테그린에 대한 길항 물질을 사용하는 섬유증의 억제**

<161> **재료 및 방법**

<162> 알파4 서브유닛 함유 인테그린에 대한 항체(PS2) 및 비특이적 대조군 항체(1E6)를 사용하였다. 1E6은 마우스 항 인간 LFA3(도메인 1) IgG1 모노클로날 항체이다. [참조 문헌: Miller, Hochman, Meier, Tizard, Bixler, Rosa 및 Wallner(1992), J. Exp. Med. 178:211-222]. PS/2는 Miyake 등의 문헌, J. Exp. Med., 173:599-607(1991)에 기술된 방법에 의하여 제조된다.

<163> 25 ~ 30 g의 만성 호흡기 질병을 앓고있지 않는 수컷 C57BL/6 마우스를 Charles River Laboratory로부터 구입하였다. 황산블레오마이신(상표명: Blenoxane)은 Bristol Laboratories(미국, 뉴욕, 시라큐즈)로부터 증여받았다. 프롤릴 하이드롤라제의 프로콜라겐 기질을 표지화시키기 위한 L-[3,4-^{3}H] 프롤린은 NEN Life Science Products(미국, 메사츄세츠, 보스톤)로부터 얻었다. Z 고정, 수성 완충 아연 포르말린은 Anatech, LTD(미국, 미시건, 배틀 크릭)으로부터 구입하였다. 다른 모든 시약들은 시약 등급이거나 또는 더욱 높은 순도의 것이었으며 이들은 표준적인 상업적 공급원으로부터 얻었다.

<164> **동물 처리**

<165> 우리당 4 마리의 마우스를 사육하고 동물보호에 관한 국립 조건원 지침에 따라서 보호하였다. 마우스를 모든 처리 과정을 수행하기 이전에 1 주일 동안 사육 시설에 순응시켰다. 12 시간/12 시간의 명/암 주기를 유지시키고 물 및 설치류 실험실 사료는 자유로이 공급하였다. 동물들을 4개의 실험군으로 무작위로 나누었다. 즉, 1) SA + SA; 2) BL + IE6; 3) BL + SA; 및 4) BL + PS2. 자이라진 및 케타민으로 마취시킨 마우스에 염수 또는 0.08 유니트/100 ㎕/마우스의 BL을 1회 투여하여 기관내(IT) 주사하였다. IT 흡입 이후, 1 주일에 3 회씩 IE6, SA 또는 PS2(0.2 ㎖/마우스 중 100 ㎍)를 마우스에 IP 주사하였다. BL 흡입 이후 21일 경과시, 마우스를 펜토바르비탈 마취제로 마취시켜 죽이고 기관지 폐포 세척액 (Bronchoalveolar Lavage Fluid; BALF) 채집, 생화학적 및 해부병인학적 분석을 수행하였다.

<166> **BALF 및 폐 조직의 제조**

<167> 마취시킨 이후에, 복강을 개방하여 하향 복대 동맥으로부터 채혈하였다. 기관을 시린지에 부착된 무딘 바늘로

삽관하여 폐 세척을 준비하였다. 1 ㎖들이 분액에 보관된 냉각 등장 염수 3 ㎖로 폐 세척을 수행하였다. 총 세포수를 측정하기 위하여 BALF 분액을 수집하였다. 남아있는 BALF를 4℃, 20분 동안 1500 g로 원심분리한후, 생성된 상청액을 분액시킨후 이를 -70℃에 보관하였다. BALF 이후, 폐엽을 비선세포 조직이 존재하지 않도록 신속하게 절개한후, 바로 액체 질소에서 동결시키고 이를 -70℃에 보관하였다.

<168> 이후, 동결된 폐를 해동시키고 폴리트론 균질화기(Brinkmann Instrument Inc., Westbury, NY)를 사용하여 0.1 M KCl, 0.02 M Tris(pH 7.6)에서 균질화시켰다. 균질화물을 반복적으로 뒤집어주어 철저히 혼합하고 균질화물의 최종 부피(4 ~5 ㎖)를 기록하였다. 균질화물을 몇개의 분액으로 나누고 이를 생화학적 측정을 위하여 -70℃에 보관하였다.

<169> **폐 말론디알데히드 당량 및 히드록시프롤린 함량의 측정**

<170> Ohkawa 등의 문헌, Anal. Biochem., 95:351(1979)의 방법에 의하여 미분류된 균질화물중 티오바르비튜린산-반응 생성물의 총량으로부터 폐 말론디알데히드 당량을 측정하였다. 폐 히드록시프롤린 검정법에서, 균질화물 1㎖를 얼음 냉각된 50%(w/v)의 트리클로로아세트산 0.25 ㎖로 침전시키고, 이를 원심분리하여 침전물을 110℃ 및 18시간 동안 6N HCl 2 ㎖에서 가수 분해하였다. Woessner, J. F., Arch. Biochem. Biophys., 93:440(1961)에 기술된 기법을 사용하여 상기 히드록시프로릴 함량을 측정하였다.

<171> **프로릴 히드록실라제(EC.1.14.11.2) 활성의 측정**

<172> 프롤릴 히드록실라제 기질(프로콜라겐)의 제조 방법 및 프롤릴 히드록실라제 검정 방법은 Giri, S.N. 등의 문헌, Exp. Mol. Pathol. 39:317(1983)에 기술되어 있다. 요약하면, 10 일령 닭의 배로부터 막 분리해낸 경골을 37℃에서 6 시간 동안 무프롤린 배양 배지중에서 [^{3}H]-프롤린으로 표지하였다. 혼입되지 않은 표지를 세척하여 제거한후, 상기 조직을 균질화시켜 4℃에서 20 분 동안 3000g로 원심 분리하였다. 생성된 상청액을 과도하게 투석시켜 혼입되지 않은 표지를 제거하였다. 표지된 프로콜라겐 기질을 분취하여 -70℃에 보관하였다. 총 부피 2 ㎖의 효소 검정법용의 항온 처리 혼합물은 황산철암모늄(0.1 mmol/ℓ), 알파케토글루타르산(0.1 mmol/ℓ), [^{3}H]-프롤린 프로콜라겐(200,000 dpm), 허파 균질화물(0.2 ㎖), 아스코르브산(0.5 mmol/ℓ) 및 TRIS-염산 완충액(0.1 mmol/ℓ, pH 7.8)로 구성되었다. 37℃의 Dubnoff 변형 교반기에서 30 분 동안 교반한 후, 상기 반응물에 50%의 트리클로로아세트산 0.2 ㎖를 첨가하였다. 상기 반응 동안, 삼중수소화된 물을 화학양론적 비율로 프롤린 히드록실화에 방출시키고 이를 효소 활성 측정에 사용하였다. 전체 반응 혼합물을 진공 증류하여 본 반응계중의 삼중수소화된 물을 분리하고 방사능을 측정하였다. 효소 활성을 30분 마다 총 허파당 방출된 삼중수소화 물의 dpm으로 표시하였다.

<173> **BALF에서의 세포수 측정**

<174> Wang Q. 등의 문헌, Lab. Invest., 67:234-242(1992)에 기술된 바와 같이, 총 세포수를 측정하였다. BALF 중 백혈구 수는 사용자 지침에 따라서, 쿨터 카운터(Model F, Coulter Electronics, Inc., Hialeath, FL)로 측정하였다.

<175> **BALF 단백질 검정법**

<176> BALF 상청액중 단백질 함량을 Bio-Rad 단백질 검정법(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 소 혈청 알부민을 표준물로 사용하였다.

<177> **조직병리학적 및 면역조직화학적 분석법**

<178> 조직병리학적 및 면역조직화학적 평가를 위하여 실험의 마지막 단계에서 각각의 처리군으로부터 3 ~ 4 마리의 동물들을 무작위로 선택하였다. 상기 동물의 복강을 개방한후 하향 복대 동맥으로부터 채혈하였다. 그 직후, 폐조직을 상기 Wang 등의 문헌에 기술된 바와 같은 조직학적 분석법을 위하여 제조하였다. 기관을 무딘 바늘로 삽관하고, 흉강을 개방한후, 심장 및 폐를 모두 한꺼번에 제거하였다. 30 ㎝의 수압으로 기관을 통하여 폐를 Z-고정액으로 고정시켰다. 이후에 우측 두부엽 및 하방엽과 좌측엽을 차단시키고, 파라핀에 함침시켜, 7 μ의 검편으로 절단하고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 알파 SMA를 면역조직화학적으로 염색하기 위하여, 허파 조직 검편을 파라핀으로부터 분리해내고 내인성 퍼옥시다제로 차단하였다. 이후 염색될 검편들을 차단성 염소 혈청으로 30분 동안 처리하고, 이를 16 시간 동안 1차 모노클로날 항 알파SMA 항체와 함께 항온 처리하였다(Sigma Chemical Co., St.Louis, MO).

<179> **데이터의 통계학적 분석**

<180> 총 폐당 측정값을 기준으로 하여 동물 데이터를 구하여 이를 평균 ±표준 오차(SE)로 나타내었다. 상기 데이터를 변수의 2 방향 분석법(two-way analysis; SIGMASTAT)과 스튜던트-뉴먼-큘스법(Student-Newman-Keuls method)을 사용하여 4개의 군 내에서 비교하였다. ≤0.05인 P값을 검정율로 간주하였다.

<181> **결과**

<182> **마우스 폐에서의 지질 과산화**

<183> 지질 과산화 지수로 폐 말론디알데히드의 당량을 다양한 마우스군으로 평가하였다. BL 주입은 SA + SA 군 및 BL + PS2 군에 비하여 BL + IE6 군 및 BL + SA 군 둘다에서 마우스 폐의 말론알데히드 당량을 상당히 증가시켰다(데이터는 나타내지 않음). BL + PS2 군에서의 허파 말론알데히드 등가 수준은 SA + SA 군에서의 수준과 차이가 없기 때문에, PS2 처리는 BL 유도성 허파 지질 과산화를 효과적으로 억제하였다.

<184> **마우스 폐에서의 폐 히드록시프롤린 함량**

<185> 폐 히드록시프롤린, 허파 콜라겐 수준의 주요 지수를 4개의 마우스 군에 대하여 측정하였다. BL + IE6 군 및 BL + SA 군에서 BL의 IT 주입은 허파 히드록시프롤린 수준을 각각 SA + SA 대조군의 185 % 및 205 %로 매우 상승시켰다. BL + PS2 군에서의 폐 히드록시프롤린 수준의 BL 유도성 증가는 PS2 처리로써 BL + SA 군에 비하여 35 % 까지 감소하였다. BL + TR 군에서의 폐 히드록시프롤린 수준은 IT SA 대조군(SA + SA)의 수준보다 그리 높지는 않았다.

<186> **마우스 폐에서 프롤릴 히드록실라제의 활성**

<187> 다양한 군의 허파에서의 프롤릴 히드록실라제 활성을 통하여 BL만이 BL + SA 군에서의 허파 프롤릴 히드록실라제 활성을 SA + SA 대조군의 207 % 까지 상당히 증가시켰다는 사실을 알 수 있었다. PS2는 BL + SA 군에서 BL 처리에 의하여 증가한 프롤릴 히드록실라제 활성을 상당히 감소시켰다.

<188> **마우스 폐에서의 총 BALF 세포수**

<189> BL + IE6 군만이 SA + SA 군보다 더욱 높은 수준임에도 불구하고, 염수 또는 BL의 IT 주입 이후 21일 경과시의 다양한 군의 BALF중 총 세포수를 통하여 BL 처리가 염수 대조군(SA + SA)과 비교하여 BL + IE6 군 및 BL + SA 군으로부터 얻은 BALF중의 총 세포수를 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다. BL + PS2 군에서의 BALF 세포수는 SA + SA 군에서의 수와는 상이하였다.

<190> **BALF 중의 단백질 함량**

<191> 4개의 실험군에 대한 BALF 상청액의 단백질 함량을 통하여 BL의 IT 주입은 SA + SA 군에 비하여 BL 처리된 모든 군의 BALF 단백질을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다. 그러나, 그 차이는 통계학적으로 중요하지는 않았지만, BL + PS2 군에서의 PS2 처리는 BALF 상청액 단백질의 BL 유도성 증가를 감소시켰다.

<192> **마우스 폐의 조직병리학**

<193> 마우스 폐의 조직학적 관찰 결과 SA + SA 군에서의 폐 선세포조직은 정상적이었음을 알 수 있었다. 그러나, BL + IE6 군 및 BL + SA 군으로부터 얻은 폐는 세포외 섬유가 축적된 너덜너덜한 폐포와 산포성 간질 섬유증을 나타내었다. 상기 군의 마우스의 허파는 폐포간 각막이 비후되었으며 인접한 공기층에는 염증 세포가 존재하였다. 몇몇 엽부가 간질성 섬유증의 정도가 여전히 가벼웠음에도 불구하고 BL + IE6 군 및 BL + SA 군과 비교하여, BL + PS2 군으로부터 얻은 허파는 섬유증 병변이 훨씬 적었다.

<194> **마우스 폐에서의 알파 SMA 에 대한 면역 조직 화학적 염색**

<195> BL 처리후 마우스에서의 섬유아세포 및 섬유아세포 유사 세포의 축적 여부를 측정하기 위하여, XSMA에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 폐 조직에서 XSMA의 발현 여부를 평가하였다. 대조군 폐에서, 맥관 및 기관지 평활근층에서는 면역 양성 반응이 일어났다. BL 및 대조군 항체 또는 염수 처리된 폐에서, 간질 세포 및 흉막 모두에서의 섬유증 영역은 광범위하고 진하게 면역 염색되었다. 그러나, BL 및 PS2 처리된 허파는 BL + IE6 군 및 BL + SA 군에 비하여, 알파 SMA의 면역 염색 정도가 매우 감소되었음을 알 수 있었다.

<196> **고찰**

<197> IPF는 큰 타격을 주는 질병으로서 현재 치료법에 대하여는 미약한 반응을 보인다. 본 연구에서, 본 발명자들은 알파4 서브유닛 함유 인테그린이 IPF를 맵핑하는데에 다른 가능한 표적이 된다는 사실을 증명하였다. 일반적으

로 폐의 백혈구는 ROS, 섬유 성장 시토킨 및 생장 인자의 분비에 의한 폐 섬유증의 진화와 관련되어 있다고 추측된다. 백혈구의 소통 및 활성화 상태는 인테그린과 같은 다양한 표면 단백질에 의하여 조절된다. 세포-세포 상호 작용 및 세포-ECM 상호 작용은 폐 섬유증의 발병에 중요하다는 사실이 명백해졌다. 활성 폐 섬유증 환자 및 섬유증성 폐 질병의 동물 모델에서의 일치된 발견은 섬유증이 진행되고 있는 영역에 면역 세포 및 염증 세포의 수가 증가하여 축적된다는 사실이다.

<198> VLA-4는 모든 순환성 백혈구상에 발현되는 것으로서, 맥관 세포 부착 분자(VCAM-1), 시토킨 활성화 내피 세포상에 발현되는 Ig 유전자 슈퍼패밀리의 일원에 결합하고, 매트릭스 단백질인 피브로넥틴에 결합한다. 알파4베타7은 T 세포 및 B 세포, 자연 킬러 세포 및 호산구의 하위 세트상에서 발현된다. 이는 점막성 맥관 아드레신(MAdCAM-1), Ig 및 부착 분자의 뮤신 유사 패밀리의 일원, 및 VCAM-1 및 피브로넥틴에 결합한다. 시험관내 연구 결과 VLA-4 및 VCAM-1의 상호 작용은 내피성 및 경내피성 이동을 따르는 단핵 백혈구 및 호산구와 관련되어 있으며 알파4 베타7은 주로 림프양 조직과 연결된 장으로의 백혈구 재순환과 관련되어 있는 것으로 생각된다.

<199> 본 연구법에서, PS2를 이용한 치료는 BALF중 총 백혈구의 BL 유도성 증가를 감소시킨다. BL + PS2 마우스의 폐에서의 감소된 백혈구는 BL 처리된 동물의 폐에서의 염증성 상해 및 섬유증을 감소시키는데에 기여할 수 있다. BL 유도성 폐 손상은, 폐 지질 과산화를 측정함으로써 나타내어지는 바와 같이 PS2 처리에 의하여 상당히 감소한다. 폐에서의 콜라겐의 증가는 간질 및 폐포 공간에서의 섬유아세포 수의 증가와 관련되어 있다. 다수의 이들 섬유아세포 유사 세포는 평활근 세포에서 보통 발견되는 알파 SMA, 수축성 단백질의 발현을 포함하며 섬유증 및 상처의 치료에 있어서 중요한 것으로 생각되는 분명한 표현형을 보유하는 근섬유아세포이다. 본 연구의 중요한 발견은 PS2 처리가 BL 유도성 근섬유아세포 증식을 약화시킨다는 것이다. 어떠한 이론에 한정됨이 없이, 알파 인테그린에 대한 항체의 투여는 침투성 백혈구에 의하여 감소되는 허파에서의 생장 인자의 수준을 감소시키거나 또는 근섬유아세포의 거동에 직접적인 영향을 줄 수 있다. 임의의 경우에 있어서, 감소된 증식성 근섬유아세포는 BL + PS2 군중의 BL 처리된 동물에서 허파 콜라겐 축적을 감소시킬 수 있었다.

<200> **실시예 3: 알파1 서브유닛 함유 인테그린에 대한 길항 물질을 사용한 섬유증 억제**

<201> **동물 처리**

<202> 28 ~ 30 g의 수컷 C57/BL6 마우스를 4개의 군의, 실험실 동물 보호 승인을 위한 미국 위원회(American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care)에 의하여 승인받은 플라스틱 우리에서 사육하였다. 상기 동물들을 1 주일 동안 실험 조건에 적응시킨후 실험을 개시하였다. 이들에게 설치류 실험실 사료 5001(Purina Mills, Inc., St. Louis, MO)를 공급하고 물은 자유로이 공급하면서 공기를 여과하여 소통시키고 12시간 / 12시간의 명/암 주기를 적용시킨 방에서 사육하였다. 마우스를 다음의 군으로 나누었다.

표 1

<203>

군	처리
A	염수 + 인산염 완충 염수
B	염수 + 대조군 항체 IgG
C	블레오마이신 + 대조군 항체 IgG
D	블레오마이신 + 항α1 β1 인테그린 항체

<204> 황산블레오마이신을 무발열원성 멸균 등장 염수에 용해시킨후 기관내(IT) 주입하였다. 적합한 군의 메톡시플루란 마취된 마우스에 멸균 등장액 100 ㎕ 또는 0.08 유니트의 블레오마이신 용액 100 ㎕를 기관내 주입하였다. 설치후 21 일동안 1 주일에 3 회 항체(4 ㎎/㎏)를 적합한 군의 마우스에 복막내 주사에 의하여 투여하였다. 이후, 각 군의 동물들에 과량의 나트륨 펜토바르비탈(100 ~ 125 ㎎/㎏ 복강내 주사)을 주사하여 동물들을 죽이고 이들의 폐를 기관지 폐포 세척용, 생화학적 및 조직병리학적 연구용으로 처리하였다.

<205> **기관지 폐포 세척액중 총 세포수 및 단백질 수준의 측정**

<206> 기관에 삽관한후 1㎖씩 5개의 분액으로, 등장성 염수 총 5 ㎖로 폐를 세척하였다. 염수를 상기 삽관을 통하여 시린지로 투여하고, 흉벽을 가만히 마사지하면서, 액체를 뽑아내었다. 상기 액체를 4℃, 1500 g 에서 21분 동안 원심 분리하고, 이를 등장성 염수 용액에 재현탁하였다. 기관지내 폐포 세척 표본으로부터 얻은 상청액에서의 단백질 함량을, 소 혈청 알부민을 표준물로 하여, Lowry 등의 문헌, J.Biol.Chem. 1193:265-275(1951)에 기술된 방법으로 측정하였다. Coulter Counter(Coulter Electronics, Hialeah, FL)에서 현탁액중 총 백혈구 세포수

를 측정하였다.

<207> **히드록시프롤린의 측정**

<208> 생화학적 연구용으로 사용되는 폐들을 동일계내에서, 좌측 외이의 개방부를 통하여 허파 맥관으로부터 혈액을 씻어내기 위하여 얼음 냉각된 등장성 염수를 사용하여 우측 소화 기관으로 관류시켰다. 폐의 엽부를 즉시 절개하여 비선세포조직을 제거하고, 이를 급속 냉동을 위하여 액체 질소에 넣은후 -80℃에 보관하였다. 이후 냉동 폐를 해동시키고 이를 폴리트론 균질기로 0.1 M KCl, 0.02 M Tris 완충액(pH 7.6)중에서 균질화시켰다. 콜라겐 함량 측정과 같이 허파 균질물중의 히드록시프롤린의 함량을 Woessner, Arch. Biochem. Biophys. 93:440-447(1961)의 기법에 의하여 정량하였다.

<209> **조직병리학적 연구**

<210> 허파 세척후, 흉강을 개방하고 심장과 허파를 한꺼번에 제거하였다. 30 ㎝ 수압에서 400 Osm의 0.12 M 카코딜화 완충액내 1% 글루타르알데히드-파라포름알데히드 고정화제를 허파에 흡입시켰다. 상기 압력에서 약 2 시간 동안 상기 허파를 고정화시키고 이를 허파색된 기관과 함께 고정화제에 저장하였다. 함침 이전에, 상기 허파를 심장으로부터 분리하고 모든 비허파성 조직을 블런트하게 절개하여 제거하였다. 조직의 블록을 각각의 허파의 우측 두엽, 우측 하향 엽부 및 좌측 허파엽으로부터 2 이상의 시상 봉합 슬랩(2 ~ 3 ㎜ 두께)으로부터 잘라내었다. 각각의 블록의 면적은 약 1 ㎠이었다. 상기 블록들을 일련의 등급화된 에탄올에서 탈수시킨후 파라핀에 함침시켰다. 검편(5㎛ 두께)을 상기 파라핀 블록으로부터 절개한후 조직학적 평가를 위하여 이를 해마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

<211> **데이터 분석 및 해석**

<212> 평균값의 관점에서, 평균의 표준 편차 및 표준 오차에 의하여 데이터를 분석하였다. 스튜던트 t-시험, 카이^2 분포율, 상관 계수, 변수의 분석(ANOVA) 및 복수회 비교 시험법을 적용하여 컴퓨터를 기초로 하는 통계학적 패키지를 사용하여 대조군 및 처리군간 차이의 검정률을 판단하였다[SAS/STAT Guide, 제6판, Cary, N.C. pp.183-260(1985)].

<213> **결과**

<214> 본 연구에서, 발명자들은 인테그린 α1 β1에 대한 중화 항체(항 α1 β1)는 생체내 블레오마이신(BL)-유도성 폐 섬유증을 감소시킨다는 가설을 시험하였다. 수컷 C57/BL6 마우스를 염수(SA) 또는 0.08 U의 BL 0.1 ㎖로 기관내(IT) 주사한후 1주일에 3회씩 상기 항체(0.2 ㎖중 100 ㎍)를 복강내(IP) 주사하였다. IT 흡입후 21일 경과시, 기관지폐포 세척(BAL), 생화학적 및 조직병리학적 분석을 위하여 마우스를 죽였다.

<215> **폐의 조직병리학적 검사**

<216> 본 발명자들은 염수 및 대조군 IgG로 처리된 마우스는 어떠한 시각적인 병변을 나타내지 않았으며 정상적으로 얇은 모양의 폐포간 격벽을 가질것으로 예상하였다. 이와는 대조적으로, 블레오마이신 및 대조군 IgG 처리된 마우스는 기부의 포도상선에 종종 흉막과 관련하여 분산하는 산포성 위치로부터 얻은 병변들을 다수 보유할 것이다. 본 발명자들은 블레오마이신 및 항알파1 인테그린 항체 처리된 마우스의 폐는 B군(상기)의 폐와 더욱 유사할 것으로 예상하였다. 본 발명자들은 약간 산포된 격막 비후화 단핵 세포 및 단핵 세포의 작은 응집물을 보유하는 D군 동물들은 오로지 제한된 수의 섬유증 병변을 나타낼 것으로 예상하였다.

<217> 보다 명확한 이해를 위하여 예시 및 실시예를 통하여 전술한 발명을 보다 상세히 설명하였음에도 불구하고, 임의의 변경 및 변형이 가하여질 것이라는 사실은 당 업계의 숙련자들에게 자명할 것이다. 따라서, 상기 상세한 설명 및 실시예들은 첨부된 청구항들에 의하여 추론되는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

발명의 효과

<218> 본 발명의 알파1 또는 알파4 서브유닛 함유 인테그린의 길항 물질은 총 콜라겐 축적량 및 폐의 섬유증 병변의 정도 둘다에 유리한 효과를 나타내어 섬유증 치료에 유용하다.

서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부