



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0026048
(43) 공개일자 2019년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7006092(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년11월04일
 심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2017-7037729
 원출원일자(국제) 2006년11월04일
 심사청구일자 2018년01월26일

(85) 번역문제출일자 2019년02월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/043103

(87) 국제공개번호 WO 2007/056227
 국제공개일자 2007년05월18일

(30) 우선권주장
 60/733,763 2005년11월04일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 쓰센프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자
평, 석, 청
 미국 75025 텍사스주 휴스턴 딜 3511
야오, 쟁빈
 미국 77479 텍사스주 슈가랜드 웨더스톤 서클
 5230

(74) 대리인
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **안질환 치료를 위한 보체 경로 억제제의 용도**

(57) 요약

본 발명은 보체 경로 억제제, 특히 대체 경로 억제제를 투여함으로써 안질환 및 병태의 치료에 관한 것이다. 안질환은 노인성 황반 변성, 당뇨 망막병증, 및 눈 혈관신생을 포함한다. 한 실시태양은 전체 항체, Fab 단편 또는 단일 도메인 항체의 형태로 항-인자 D 항체의 투여를 포함한다. 본 발명의 방법에 유용할 수 있는 다른 보체 성분 억제제는 인자 H 또는 프로페르딘의 작용을 차단하는 억제제, 인자 B, 인자 Ba, 인자 Bb, C2, C2a, C3a, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, 또는 C5b-9를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

Y10S 514/912 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간에게 보체 성분 C5a에 결합하는 모노클로날 항체를 투여하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보체 활성화와 연관된 눈 관련 병태 및 질병, 예를 들어 노인성 황반 변성, 당뇨 망막병증으로 고통 받는 환자에서 보체 경로, 특히 인자 D의 억제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황반 변성은 브루크 (Bruch) 막, 맥락막, 신경 망막 및/또는 망막 색소 상피의 이상과 연관된 중앙 시력의 진행성 상실을 특징으로 하는 질병군을 설명하기 위해 사용되는 임상 용어이다. 망막의 중심에 직경이 약 1/3 내지 1/2 cm인 황반이 존재한다. 원뿔세포가 보다 더 고밀도이므로, 황반은 특히 중앙 (오목)에서 상세한 시력을 제공한다. 혈관, 신경절 세포, 내부 핵층 및 세포, 및 얼기층은 모두 한쪽 측면에 배치되어 (원뿔세포 위에 놓이기 보다는), 광의 원뿔세포에 대한 보다 직접적인 경로를 허용한다. 망막 아래에, 섬유 조직 내에 묻힌 혈관의 집합체인 맥락막, 및 맥락막층 위에 놓이는 색소 상피 (PE)가 존재한다. 맥락막 혈관은 망막 (특히 그의 시각 세포)에 영양을 제공한다. 맥락막 및 PE는 눈의 전방에서 발견된다.

[0003] PE를 구성하는 망막 색소 상피 (RPE) 세포는 광수용체의 정상 기능 및 생존을 담당하는 다양한 인자를 생산하고 저장하고 수송한다. 상기 다기능 세포는 대사체를 그들의 혈액 공급원인 눈의 맥락막 모세혈관으로부터 광수용체로 수송한다. RPE 세포는 또한 세포 생리학의 정상 과정에서 생산되는 막대세포 및 원뿔세포의 외부 절편의 끝을 포식하는 대식세포로서 기능한다. 다양한 이온, 단백질 및 물이 RPE 세포와 광수용체간 공간 사이에 이동하고, 이들 분자는 궁극적으로 광수용체의 대사 및 생활력에 영향을 미친다.

[0004] 가장 우세한 황반 변성인 노인성 황반 변성 (AMD)은 시야의 중앙부에서 시각의 진행성 상실, 색 식별력의 변화, 및 비정상적인 암 순응 및 민감도와 연관된다. AMD의 2가지 주요 임상 소견은 건조형 또는 위축형, 및 습윤형 또는 삼출형으로서 설명되었다. 건조형은 읽기, 운전 또는 안면 인식과 같은 활동에 사용되는 미세 시력을 위해 요구되는 중앙 망막 또는 황반의 위축성 세포 사멸과 연관된다. 상기 건조 AMD 환자의 약 10-20%는 습윤 AMD로서 알려진 AMD의 제2형으로 진행한다.

[0005] 습윤 (신생혈관/삼출) AMD는 망막의 전위, 출혈 및 반흔 형성을 일으키는, 황반 아래에서 망막 뒤의 혈관의 비정상적인 성장 및 혈관 누출에 의해 유발된다. 이는 수개월 내지 수년에 걸쳐 시력을 악화시킨다. 그러나, 환자는 급속한 시력 상실을 경험할 수 있다. 모든 습윤 AMD 환자는 진행된 건조 AMD로부터 기원한다. 습윤형은 AMD로 인한 실명의 85%를 차지한다. 습윤 AMD에서, 혈관은 유체와 혈액을 누출하므로, 중앙 망막을 파괴하는 반흔 조직이 형성된다.

[0006] 두 형태의 발병에서 가장 유의한 위험 인자는 연령 및 망막 색소 상피 뒤에서 비정상적인 세포의 침착물인 결정체 (drusen)의 침착이다. 결정체는 RPE 단층의 측면 스트레칭 및 그의 직접적 혈관 공급원인 맥락막 모세혈관으로부터 RPE의 물리적인 전위를 일으킨다. 상기 전위는 맥락막 모세혈관과 망막 사이에서 정상적인 대사체 및 폐기물 확산을 방해할 수 있는 물리적인 장벽을 형성한다. 결정체는 AMD와 연관된 특징적인 침착물이다. 결정체의 생체발생은 RPE 기능이상, 광수용체 외부 절편의 손상된 소화, 및 후속적인 잔해 축적을 포함한다. 결정체는 보체 활성화제, 억제제, 활성화-특이적 보체 단편, 및 말단 경로 성분, 예를 들어 세포막 공격 복합체 (MAC 또는 C5b-9)를 함유하고, 이는 상기 물질의 국소 농도가 보체 캐스케이드를 통해 작용하는 백혈구에 대한 강력한 화학주성 자극을 생산할 수 있음을 제안한다 (Killingsworth, et al., (2001) Exp Eye Res 73, 887-96). 최근의 연구는 국소 염증 및 보체 캐스케이드의 활성화를 상기 물질의 형성에 연관시켰다 (Bok D. Proc Natl Acad Sci (USA). 2005; 102: 7053-4; Hageman GS, et al. Prog Retin Eye Res. 2001; 20: 705-32; Anderson DH, et al. Am J Ophthalmol. 2002; 134: 411-31. Johnson LV, et al. Exp Eye Res. 2001; 73: 887-96).

- [0007] 습윤 AMD는 맥락막 혈관신생 (CNV)과 연관되고, 복합적인 생물학적 과정이다. 새로운 맥락막 혈관 형성의 발병 기전은 거의 알려지지 않았지만, 염증, 허혈, 및 혈관신생 인자의 국소 생산과 같은 인자가 중요한 것으로 생각된다. 염증이 특정 역할을 하는 것으로 제안되었지만, 보체의 역할은 연구되지 않았다. CNV의 예비 연구는 마우스 모델에서 보체 활성화에 의해 유발된 것으로 나타났다 (Bora PS, J Immunol. 2005; 174: 491-497).
- [0008] 보체계는 미생물 감염에 대한 선천 면역의 중대한 성분이고, 정상적으로 혈청 내에 비활성 상태로 존재하는 단백질의 집단을 포함한다. 상기 단백질은 3개의 활성화 경로: 즉, 전통적인 경로, 렉틴 경로 및 대체 경로로 구성된다 (V.M. Holers, In Clinical Immunology: Principles and Practice, ed. R.R. Rich, Mosby Press: 1996, 363-391). 미생물 표면의 분자는 상기 경로를 활성화시켜 C3-전환효소로 알려진 프로테아제 복합체의 형성을 일으킬 수 있다. 전통적인 경로는 칼슘/마그네슘-의존 케스케이이드이고, 이는 정상적으로 항원-항체 복합체의 형성에 의해 활성화된다. 이는 또한 리간드와 복합된 C-반응성 단백질의 결합에 의해 및 그람-음성 세균을 포함한 많은 병원체에 의해 항체-비의존 방식으로 활성화될 수 있다. 대체 경로는 특정 감수성 표면 (예를 들어, 효모 및 세균의 세포벽 다당체, 및 특정 생체중합체 물질) 상에 C3의 침착 및 활성화에 의해 활성화되는 마그네슘-의존 케스케이이드이다.
- [0009] 대체 경로는 전통적인 경로 및 렉틴 경로의 활성화의 증폭에 참여한다 (Suankratay, C, ibid; Farries, T.C. et al., Mol. Immunol. 27: 1155-1161(1990)). 보체 경로의 활성화는 백혈구 화학주성, 대식세포, 호중구, 혈소판, 비만세포 및 내피세포의 활성화, 증가된 혈관 투과성, 세포 용해, 및 조직 손상의 관여를 통해 염증 반응을 매개하는 보체 단백질의 생물학적 활성 단편, 예를 들어 C3a, C4a 및 C5a 과민독소 (anaphylatoxin) 및 C5b-9 세포막 공격 복합체 (MAC)를 생성한다.
- [0010] 인자 D는 인간에서 그의 혈장 농도가 매우 낮고 (1.8 $\mu\text{g/ml}$), 보체 대체 경로의 활성화를 위한 제한 효소인 것으로 나타났으므로 보체 경로의 상기 증폭의 억제를 위한 적합한 표적일 수 있다 (P.H. Lesavre and H.J. Mueller-Eberhard. J. Exp. Med., 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis et al., New Eng. J. Med., 1985; 312: 395-401). 보체 활성화의 억제는 동물 모델을 사용하는 몇몇 질병 증상의 치료 및 생체의 연구, 예를 들어 전신 홍반성 루푸스 및 사구체신염에서 효과적인 것으로 증명되었다 (Y. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci.; 1996, 93: 8563-8568).
- [0011] AMD 환자의 단일-뉴클레오티드 다형성 (SNP) 분석을 이용하여, 인자 H 유전적 변이체 (Y402H)는 AMD 발생 증가와 연관성이 큰 것으로 밝혀졌다 (Zarepari S, Branham KEH, Li M, et al. Am J Hum Genet. 2005; 77: 149-53; Haines JL, et al. Sci 2005; 208: 419-21). 인자 H 유전자의 상기 포인트 돌연변이에 대해 동종접합 또는 이종접합인 사람은 AMD 환자의 50%를 차지할 수 있다. 인자 H는 보체 대체 경로의 핵심적인 가용성 억제제이다 (Rodriguez de Cordoba S, et al. Mol Immunol 2004; 41: 355-67). 이는 C3b에 결합하여, 대체 경로 C3-전환효소 (C3bBb)의 붕괴를 가속화시키고 C3b의 인자 I 매개 단백질 분해 불활성화에 대한 보조인자로서 작용한다. 조직화학 염색 연구는 RPE-맥락막 계면에서 인자 H 및 MAC가 유사하게 분포함을 보여준다. AMD 환자에서 발견된 상기 계면에서 유의한 양의 침착된 MAC는 인자 H 반수체형 (Y402H)이 보체 억제 기능을 약화시킬 수 있음을 나타낸다. 인자 H (Y402H)는 C3b에 대한 결합 친화도가 더 낮을 수 있을 것으로 추측된다. 따라서, 이는 보체 대체 경로의 활성화를 억제하는데 있어서 야생형 인자 H만큼 효과적이지 않다. 이는 RPE 및 맥락막 세포를 대체 경로 매개된 보체 공격에 대한 지속적인 위협에 놓는다.
- [0012] 혈장 내의 인자 H의 결핍은 C3 및 종종 다른 말단 보체 성분, 예를 들어 C5의 소비와 함께 대체 경로의 비제어된 활성화를 유발하는 것으로 나타났다. 상기 발견과 일치하여, 인자 H의 혈장 수준은 AMD에 대한 공지된 위험 인자인 흡연과 함께 감소하는 것으로 알려져 있다 (Esparza-Gordillo J, et al. Immunogenetics. 2004; 56: 77-82).
- [0013] 현재, 건조 AMD에 대한 입증된 의료 요법이 존재하지 않고, 진행된 건조 AMD에 대해 이용가능한 치료법이 없다. 습윤 AMD의 선택된 환자에서, 누출 또는 출혈 혈관을 밀봉하기 위해서 레이저 광응고로 공지된 기술이 효과적일 수 있다. 불행히도, 레이저 광응고는 보통 손실된 시력을 회복시키지 않고, 단지 추가의 손실을 늦추거나 일부 경우에는 방지한다. 최근에, 광역학 요법은 초기에 치료될 때 습윤 AMD 환자의 약 1/3에서 비정상적인 혈관 성장을 중단시키는데 효과적인 것으로 나타났다. 비스다인 (Visudyne) 광역학 요법 (PDT)에서, 염료를 환자의 눈에 주입하고, 이는 망막에서 혈관 누출 영역에서 축적되고, 저출력 레이저에 노출될 때 누출 혈관을 밀봉하는 작용을 한다. 상기 2가지 레이저 기술 이외에, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 표적으로 하는 몇몇 항-혈관신생 요법이 습윤 AMD의 치료를 위해 개발되고 있다. 그러나, 치료된 환자 중 10%만이 시력 개선을 보인다.
- [0014] 습윤 AMD가 상기와 같이 부적절하게 치료되고 진행된 건조 AMD에 대한 이용가능한 치료법이 전무한 상황에서,

상기 심각한 질병에 대한 새로운 치료법을 개발할 필요가 있다. 본 발명은 상기 심각한 질병을 치료하는 신규한 방법을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] <발명의 개요>

[0016] 본 발명은 눈 관련 병태 또는 질병, 예를 들어 노인성 황반 변성 (AMD), 당뇨 망막병증, 눈 혈관신생 (예를 들어 맥락막, 각막, 또는 망막 조직에 해를 끼치는 눈 혈관신생), 및 보체 활성화를 수반하는 다른 눈 병태의 치료를 위한 보체 억제제에 관한 것이다. AMD의 치료는 AMD의 건조형 및 습윤형을 모두 포함한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 보체 억제제는 보체 대체 경로, 예를 들어 인자 D, 프로페르딘, 인자 B, 인자 Ba, 및 인자 Bb, 및 전통적인 보체 경로, 예를 들어 C3a, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 및 C5b-9를 억제하는 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명은 또한 다른 약제, 예를 들어 항혈관신생제 및 소염제, 예를 들어 스테로이드와 조합으로 보체 억제제의 사용을 포함한다.

[0018] 본 발명의 또다른 실시태양은 C5aR 및 C3aR 억제제, 예를 들어 항체 및 유도된 단편 및 단일 도메인 구성체, 및 소분자 화합물의 사용에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 또다른 실시태양은 재조합 가용성 CR1 (TP10) 및 그의 유도 단백질의 사용; C3 억제 분자 (예를 들어, C3에 결합하여 활성화를 억제하는 펩티드 모방체 (peptidomimetic)인 콤포스타틴)의 사용; C3, C5, FD, 인자 P, 인자 B의 합성을 차단하는 siRNA의 사용에 관한 것이다.

[0020] 이들 억제제는 소분자 화학적 화합물, 뉴클레오티드, 펩티드, 단백질, 펩티드 모방체 및 항체일 수 있지만 이로 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 또다른 실시태양은 환자에게 안내로 또는 임의의 다른 임상학상 효과적인 경로로 투여되는, 인간 혈액으로부터 정제된 인간 인자 H, 또는 재조합 인간 인자 H의 사용을 포함한다.

[0022] 본 발명의 항체는 전체 면역글로불린, scFv, Fab, Fab', Fv, F(ab')₂, 또는 dAb를 포함한다. 도메인 항체는 VH 도메인 또는 VL 도메인을 포함한다.

[0023] 본 발명의 한 실시태양은 인자 D에 결합하여 보체 대체 경로를 활성화시키는 그의 능력을 차단하는 모노클로날 항체의 용도에 관한 것이다. 상기 항체, 예를 들어 ATCC에 기탁되고 HB 12476으로 명명된 하이브리도마로부터 생산된 모노클로날 항체 166-32는 본원에 참고로 포함된 WO 01/70818 및 US 20020081293에 기재되어 있다. 본 발명은 또한 모노클로날 항체 166-32와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명의 모노클로날 항체는 또한 그 전부가 본원에 참고로 포함된 동시계류중인 출원_____의 인간화 항체를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 한 실시태양은 보체 성분 C5a에 결합하는 모노클로날 항체의 사용에 관한 것이다. 상기 항체는 ATCC에 기탁되고 PTA-3650으로 명명된 하이브리도마로부터 생산된 항체 137-26, 및 137-26과 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 임의의 항체를 포함한다.

[0025] 본 발명에 따라, 보체 경로 억제제는 (a) 비경구 투여; (b) 생체적합성 또는 생체분해성 지속 방출 임플란트 (implant); (c) 주입 펌프의 삽입; 또는 (d) 국소 투여, 예를 들어 결막하 투여 또는 유리체내 투여에 의해 투여될 수 있다. 보체 억제제는 또한 경구 투여, 장내 투여 및 외용 투여로부터 선택되는 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 외용 투여는 눈 세척액, 안 연고, 아이실드 (eye shield) 또는 점안액을 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 보체 억제제는 면역조절 또는 면역억제 화합물과 조합하여 투여할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또다른 실시태양은 유전자 요법을 위해 보체 경로 억제제를 발현할 수 있는 핵산 구성체의 투여에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 또다른 실시태양은 노화 Ccl-2 또는 Ccr-2-결여 마우스에서 AMD 모델의 사용을 포함하는, AMD의 치료에 유용한 보체 억제제를 스크리닝하는 방법을 포함한다. 이들 마우스는 인간 건조 및 습윤 AMD에서 발견된 것과 유사한 조직병리학적 변화를 나타낸다. 이들 마우스는 보체 억제제 또는 인자 H로 유리체 내로 치료할 수

있다. 시험할 약제로 치료된 마우스에서 AMD 발병으로부터의 보호를 결정하기 위해 조직 검사를 수행할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본원에 기재된 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 벡터 또는 시약은 변경될 수 있기 때문에, 본 발명은 상기 특정 방법 등으로 한정되지 않는다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시태양을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 본원 명세서 및 첨부된 청구항에서, 단수형인 "하나" 및 "그"는 문맥상 다른 의미를 명백하게 나타내지 않는 한, 복수의 것을 포함하며, 예를 들어 "하나의 숙주 세포"라는 언급은 이러한 숙주 세포 복수개를 포함한다.
- [0030] 달리 규정되지 않는 한, 모든 기술적 및 과학적 용어 및 모든 두문자어 (acronym)는 본 발명의 기술분야의 당업자에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에 기재된 바와 동일하거나 동등한 모든 방법 및 물질을 본 발명의 실행시에 사용할 수 있지만, 예시적인 방법, 기기 및 물질이 본 발명에 기재되어 있다.
- [0031] 본 발명에 기재된 모든 특허 및 간행물은 본 발명에 사용될 수 있는 상기 문헌들에 기재된 단백질, 효소, 벡터, 숙주 세포 및 방법을 기재 및 개시할 목적으로, 법으로 허용되는 정도로 본 발명에 참고로 포함된다. 그러나, 본원에서 그 어느 것도, 본 발명이 종래 발명에 의한 개시물에 대해 선행하지 않음을 용인한 것으로서 해석하지 않아야 한다.
- [0032] <정의>
- [0033] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 천연 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%의 상동성을 가질 것이다. 아미노산 서열 변이체는 천연 아미노산 서열의 아미노산 서열 내의 특정 위치에서 치환, 결손, 및/또는 삽입을 갖는다.
- [0034] 용어 "동일성" 또는 "상동성"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap) 을 도입시킨 후 비교되는 대응하는 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. N- 또는 C-말단 연장 또는 삽입은 동일성 또는 상동성을 저하시키는 것으로 해석되지 않을 것이다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 공지되어 있다. 서열 동일성은 다음 문헌을 포함하고 이로 제한되지 않는 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 및 Carillo, 30 H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). 동일성을 결정하는 방법은 시험되는 서열 사이에 가장 큰 일치율을 제시하도록 설계된다. 두 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 컴퓨터 프로그램은 GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA (Atschul, S. F. et al., J Molec. Biol. 215: 403-410 (1990))를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. BLAST X 프로그램은 NCBI 및 다른 공급처로부터 입수할 수 있다 (BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). 공지된 스미스 워터만 (Smith Waterman) 알고리즘도 동일성 결정에 사용될 수 있다.
- [0035] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 무손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중 특이적 (bispecific) 항체), 및 항체 단편을, 이들이 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한, 포함한다.
- [0036] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 즉 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 변이체를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 특이성이 높고, 단일 항원 부위에 대해 작용한다. 또한, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 변경 표현 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체 제조를 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 처음

기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 4,816,567 참조)에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0037] 본원에서 모노클로날 항체는 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 이 서열에 상동성이고, 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 이 서열에 상동성인 "키메라 (chimeric)" 항체, 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0038] "항체 단편"은 그의 항원-결합 또는 가변 구역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 항체(들)을 포함한다.

[0039] "무손상" 항체는 항원 결합 가변 구역 및 경쇄 불변 도메인 (C_L) 및 중쇄 불변 도메인, C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가질 수 있다.

[0040] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 구역 (천연 서열 Fc 구역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 구역)에 의한 생물학적 활성을 의미한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다.

[0041] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 무손상 항체는 상이한 "클래스"로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA-2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ, 및 μ로 불린다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 입체 형태는 공지되어 있다.

[0042] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" (ADCC)은 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적인 세포독성 세포 (예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합 항체를 인식한 후, 표적 세포의 용해를 야기하는 세포 매개 반응을 의미한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 동물 모델에서 평가할 수 있다. 복수의 상기 모델이 이용가능하다.

[0043] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 내의 서열에서 크게 상이하고 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 이것은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에 초가변 구역으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 상기 초가변 구역은 상보성 결정 구역 또는 CDR로도 불린다. 가변 도메인의 보다 보존도가 큰 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 언급된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 β-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 초가변 구역에 의해 연결되는, 주로 β-시트 입체 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각 사슬 내의 초가변 구역은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 초가변 구역과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 [Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) 참조].

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "초가변 구역"은 항원 결합에 필요한 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 구역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 및(또는) "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-

101 (H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 바와 같은 초가변 구역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

- [0045] 항체를 과파인으로 소화하면 단일 항원 결합 부위를 각각 갖는, "Fab 단편"으로 불리는 두개의 동일한 항원 결합 단편, 및 잔여 "Fc" 단편 (그 명칭은 쉽게 결정화되는 그의 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다.
- [0046] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 적어도 하나의 유리 티올기를 포함하는 Fab'의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그들 사이의 힌지 시스테인을 갖는 한쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 당업계에 공지되어 있다.
- [0047] 항체의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2개의 분명하게 상이한 종류의 하나로 분류될 수 있다.
- [0048] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 긴밀하게 비공유 회합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 상기 입체 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 초가변 구역은 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 초가변 구역은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 초가변 구역만을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합할 능력을 갖는다.
- [0049] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성하게 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 대해서는, 문헌 [Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. 항-ErbB2 항체 scFv 단편은 W093/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458에 기재되어 있다.
- [0050] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하고, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H-V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 페어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성시키게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 상세하게 기재되어 있다.
- [0051] "단일 도메인 항체"는 "dAb"와 동의어이고, 항원 결합이 단일 가변 구역 도메인에 의해 수행되는 면역글로불린 가변 구역 폴리펩티드를 의미한다. 본원에서 사용되는 "단일 도메인 항체"는 i) 임의의 다른 가변 도메인과 무관하게 항원 결합 부위를 형성하는 중쇄 가변 도메인 (V_H), 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체, ii) 임의의 다른 가변 도메인과 무관하게 항원 결합 부위를 형성하는 경쇄 가변 도메인 (V_L), 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체, iii) 각각의 V 도메인이 임의의 다른 가변 도메인과 무관하게 항원 결합 부위를 형성하는, 또다른 V_H 또는 V_L 도메인 폴리펩티드에 연결된 V_H 도메인 폴리펩티드 (예를 들어, V_H-V_H 또는 V_Hx-V_L)를 포함하는 항체, 및 iv) 각각의 V 도메인이 임의의 다른 가변 도메인과 무관하게 항원 결합 부위를 형성하는, 또다른 V_L 도메인 폴리펩티드에 연결된 V_L 도메인 폴리펩티드 (V_L-V_L)를 포함하는 항체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, V_L 도메인은 경쇄의 카파 및 람다 형태 모두를 의미한다.
- [0052] 비인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메릭 항체이다. 인간화 항체는 초가변 구역이 요구되는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간종, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 구역의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 구역 (FR) 잔기는 대응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 인간 항체 또는 비인간 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변경은 항체 성능을 보다 개선하기 위한 것이다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 면역글로불린의 초가변 루프에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR에 대응한다. 인간화 항체는 또한 임의로 적

어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 일부의 인간 면역글로불린을 포함할 것이다. 인간화 기술의 예는 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 퀸 (Queen) 등의 미국 특허 5,585,089, 5,693,761; 5,693,762; 및 6,180,370에서 볼 수 있다.

[0053] 항체 생성

[0054] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다. 폴리클로날 항체의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (그 전부가 본원에 참고로 포함된 Harlow, et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

[0055] 예를 들어, 항체는 항원에 특이적인 폴리클로날 항체를 포함하는 혈청의 생성을 유도하기 위해 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 상이한 숙주 동물에 목적하는 항원을 포함하는 면역원을 투여함으로써 생성시킬 수 있다. 면역원의 투여는 면역화제 및 필요한 경우 어쥘번트 (adjuvant)의 1회 이상의 주사를 수반할 수 있다. 숙주 종에 따라 면역 반응을 증가시키기 위해 상이한 어쥘번트를 사용할 수 있고, 프로인트 (Freund) (완전 및 불완전) 어쥘번트, 미네랄 겔, 예를 들어 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예를 들어 리소레시틴, 플루로닉 (pluronic) 폴리올, 다중음이온, 펩티드, 오일 에멀전, 키흐 림팻 헤모시아닌, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 인간 어쥘번트, 예를 들어 BCG (bacille Calmette-Guerin) 및 코리네박테리움 파르븀 (*Corynebacterium parvum*)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 어쥘번트의 추가의 예는 MPL-TDM 어쥘번트 (모노포스포릴 리피드 A, 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 당업계에 공지되어 있고, 선택된 동물 숙주에서 면역 반응을 유도하는 임의의 방법에 의해 수행할 수 있다. 어쥘번트도 당업계에 공지되어 있다.

[0056] 일반적으로, 면역원 (어쥘번트 첨가 또는 무첨가)은 다중 피하 또는 복강내 주사, 또는 근육 내로 또는 IV를 통해 포유동물에게 주사된다. 면역원은 항원성 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 폴리펩티드의 특성 (즉, 소수성%, 친수성%, 안정성, 총 전하, 등전위점)에 따라, 면역화되는 포유동물에서 면역원성인 것으로 공지된 단백질에 면역원을 컨주게이션하는 것이 유용할 수 있다. 이러한 컨주게이션 방법은 공유 결합이 형성되도록 컨주게이션되는 면역원성 단백질과 면역원 모두에 활성의 화학적 관능기를 유도체화함으로써 수행되는 화학적 컨주게이션, 또는 융합 단백질 기반 방법 또는 다른 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 이러한 면역원성 단백질의 예로는 키흐 림팻 헤모시아닌, 오발부민, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 대두 트립신 억제제 및 다양한 T 헬퍼 펩티드를 포함하고, 이로 제한되지 아니다. 다양한 어쥘번트를 사용하여 전술한 바와 같이 면역학적 반응을 증가시킬 수 있다.

[0057] 본 발명에 유용한 항체는 모노클로날 항체를 포함한다. 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler 및 Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) 및 할로우 (Harlow) 등의 미국 특허 4,376,110, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), Hammerling, et al., *Monoclonal antibodies and T-세포 Hybridomas* (Elsevier, N. Y., (1981))]에 기재된 것과 같은 하이브리도마 기술 또는 다른 당업자들에게 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 모노클로날 항체 생산에 사용할 수 있는 다른 방법의 예로는, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), 및 EBV-하이브리도마 기술 (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96)가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 이러한 항체들은 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 및 이들의 임의의 서브클래스를 포함하는 임의의 면역글로불린 클래스일 수 있다. 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마는 시험관 내에서 및 생체 내에서 배양할 수 있다.

[0058] 전형적인 하이브리도마 기술을 이용하여, 마우스, 인간화 마우스, 인간 면역계를 갖는 마우스, 햄스터, 토끼, 낙타 또는 다른 모든 적합한 숙주 동물과 같은 숙주를 면역원으로 면역화시켜 목적하는 항원에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 또한, 림프구는 시험관 내에서 항원으로 면역화될 수 있다.

[0059] 일반적으로 항체를 생산하는 하이브리도마 제조에서, 인간 기원의 세포가 바람직한 경우에 말초혈 림프구 ("PBL")를, 또는 인간을 제외한 포유동물 기원이 바람직한 경우에는 비장세포 또는 림프절 세포를 사용한다. 이후 림프구는 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 불멸화된 세포주와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 제조한다 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp. 59-103). 불멸화된 세포주는 일반적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 또는 인간 기원의 골수종 세포이다. 전형적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 채택된다. 하이브리도마 세포는 비융합성 불

멸화 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 바람직하게 포함하는 적합한 배양 배지 내에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 모세포에 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마 배양 배지는 일반적으로 히포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 ("HAT 배지"), HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 물질을 포함할 것이다.

[0060] 바람직한 불멸화 세포주는, 효율적으로 융합되고 선별된 항체 생산 세포에 의한 안정적으로 높은 수준의 항체 발현을 지속시키며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 세포이다. 보다 바람직한 불멸화 세포주는 무린 골수종 세포주로서, 이는 예를 들어 미국 캘리포니아주 샌디에고의 살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center)와 미국 버지니아주 마나사스의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 공급받을 수 있다. 인간 골수 및 마우스-인간 이중골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생산에 사용할 수 있다 (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

[0061] 이어서, 하이브리도마 세포를 배양시킨 배양 배지를 면역원에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 하이브리도마 세포에서 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은, 예를 들어 면역침강 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역 분석 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡수 분석 (ELISA)으로 결정할 수 있다. 이러한 기술들은 당업계에 알려져 있으며, 당업자의 능력 내에 속한다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 스카차드 (Scatchard) 분석으로 결정할 수 있다 (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)).

[0062] 적합한 하이브리도마 세포를 동정한 후, 제한 희석 과정으로 클론들을 서브클론하여 표준 방법 (Goding, 상기 문헌)에 따라 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지로는, 예를 들어 돌베코의 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640이 있다. 상기 서브클론에서 분비된 모노클로날 항체를 단백질 A-세파로스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 배제 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 기존의 면역글로불린 정제 방법으로 배양 배지로부터 분리 및 정제할 수 있다.

[0063] 모노클로날 항체 생산 분야에는 다양한 방법들이 있으므로, 본 발명은 하나의 하이브리도마 생산 방법으로 한정되지 않는다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 미국 특허 4,816,567에 개시된 바와 같이 재조합 DNA 방법으로 제조할 수도 있다. 상기 문맥에서, 용어 "모노클로날 항체"는 하나의 진핵, 과지 또는 원핵세포 클론으로부터 유래된 항체를 의미한다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 기존 방법으로 (예, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄, 또는 인간, 인간화 또는 다른 기원의 상기 쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써) 용이하게 단리하여 서열을 분석할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 단리한 후, DNA를 발현 벡터에 위치시킨 다음, NS0 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주에 이를 형질전환시켜, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성한다. 또한, DNA는 예를 들어 상동성 무린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 4,816,567; Morrison et al., 상기 문헌) 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합으로 연결시킴으로써 변형시킬 수 있다. 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드를 본 발명의 항체의 불변 도메인 대신에 사용할 수 있거나, 또는 키메릭 2가 (bivalent) 항체를 제조하기 위하여 본 발명의 항체의 하나의 항원-조합 부위의 가변 도메인 대신 사용할 수 있다.

[0064] 항체는 1가 (monovalent) 항체일 수 있다. 1가 항체의 제조 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 면역글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현이다. 중쇄는 중쇄의 가교결합을 방지하기 위하여 일반적으로 Fc 부위 내의 임의의 지점에서 말단 절단된다. 별법으로, 관련 시스테인 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환하거나 또는 가교결합을 방지하기 위해 제거한다.

[0065] 특이적인 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지의 기술로 제조할 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인 (Fab 단편을 제조하기 위해) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편을 제조하기 위해)과 같은 효소를 이용하여 면역글로불린 분자의 단백질 절단에 의해 제조할 수 있다. F(ab')₂ 단편은 가변 구역, 경쇄 불변 구역 및 중쇄의 CH1 도메인을 포함한다.

[0066] 인간에서 항체의 생체내 이용 및 시험관내 검출 분석에서의 이용을 포함한 몇몇 용도에 있어서, 키메릭, 인간화 또는 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 키메릭 항체는 항체의 다른 부분은 상이한 동물종으로부터

유래되는 분자, 예를 들어 뮤린 모노클로날 항체에서 유래된 가변 구역 및 인간 면역글로불린 불변 구역을 갖는 항체이다. 키메릭 항체의 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202]; 미국 특허 5,807,715; 4,816,567 및 4,816,397을 참조하며, 이들은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

[0067] 인간화 항체는, 인간을 제외한 종들로부터 유래된 하나 이상의 상보성 결정 구역 (CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터 유래된 프레임워크 (FR) 구역을 갖는, 목적하는 항원과 결합하는, 인간을 제외한 종에서 생성된 항체 분자이다. 종종, 인간 프레임워크 부위 내의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는 향상시키기 위해 CDR 공여 항체로부터 유래한 대응하는 잔기로 치환될 수 있을 것이다. 이러한 프레임워크 치환은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기들을 동정하기 위한, CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 특이한 프레임워크 잔기를 동정하기 위한 서열 비교에 의해 확인할 수 있다 (예, 킨 등의 미국 특허 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), 이들은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다). 항체는 예를 들어 CDR-이식 (grafting) (EP 239,400; PCT 공개 WO 91/09967; 미국 특허 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링 (veneering) 또는 재표면화 (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska, et al., PNAS 91:969-973(1994)) 및 쇠 셔플링 (chain shuffling) (미국 특허 5,565,332)를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 기술로 인간화할 수 있다.

[0068] 일반적으로, 인간화 항체는 인간을 제외한 기원으로 부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 "유입 (import)" 잔기라고 하며, 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 유도된다. 인간화는 본질적으로 윈터 및 공동 연구자들이 사용한 방법 (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))에 따라, 인간 항체의 대응하는 서열 대신에 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 사용함으로써 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 대응하는 서열로 대체된 키메릭 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0069] 완전한 인간 항체는 특히 인간 환자의 치료학적 처리에 바람직하다. 인간 항체는 상기한 파지 디스플레이 방법을 포함한 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해, 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 미국 특허 4,444,887 및 4,716,111, PCT 공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741를 참조하며, 이들은 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된다. 또한, 콜 (Cole) 등 및 보더 (Boerder) 등의 기술을 인간 모노클로날 항체 제조에 이용할 수 있다 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95, 1991).

[0070] 또한, 인간 항체는 임의의 다른 가변 도메인과 독립적으로 기능하는 VH 또는 VL 도메인을 갖는 단일 도메인 항체일 수 있다. 상기 항체는 일반적으로 파지에서 발현되는 항체 라이브러리로부터 선택된다. 상기 항체 및 상기 항체의 단리 방법은 미국 특허 6,595,142; 6,248,516; 및 미국 특허 출원 공개 US20040110941 및 US20030130496에 기재되어 있고, 이들은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

[0071] 또한, 인간 항체는 내인성 기능적 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 형질전환 (transgenic) 마우스를 이용하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체를 무작위로 또는 상동 재조합으로 마우스 배아 줄기 세포에 도입할 수 있다. 별법으로는, 인간 가변 구역, 불변 구역 및 다양성 구역 (diversity region)을 인간 중쇄 및 경쇄 유전자와 더불어 마우스 배아 줄기세포에 도입할 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동 재조합에 의한 인간 면역글로불린 로커스의 도입과 별개로 또는 이와 동시에 비기능성화될 수도 있다. 특히, JH 구역의 동종접합 결손 (homozygous deletion)은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배아 줄기 세포가 확장되며, 배반포에 미세주입되어 키메릭 마우스로 성장한다. 키메릭 마우스는 이후 교배하여 인간 항체를 발현하는 동종접합 자손 (homozygous offspring)을 생산한다. 형질전환 마우스는 선별 항원, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 전체 또는 일부를 이용하여 정상적인 방식으로 면역화시킨다. 항원에 대해 작용하는 모노클로날 항체는 기존의 하이브리도마 기술을 이용하여 면역화된 형질전환 마우스로부터 수득할 수 있다. 형질전환 마우스에 존재하는 인간 면역글로불린 도입유전자는 B 세포 분화 과정 중에 재배열되며, 이후 클래스 스위칭 (class switching) 및 체세포 변이를 겪는다. 따라서, 이러한 기술을 이용하여, 치료학적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생산

할 수 있다. 인간 항체 생산 기술의 개요는 문헌 [Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)]를 참조한다. 상기 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체의 생산 기술 및 상기 항체 생산을 위한 프로토콜에 대한 구체적인 내용은, 예를 들어, PCT 공개 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 유럽 특허 0 598 877; 미국 특허 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; 및 5,939,598를 참조하며, 이들은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다. 또한, 상기한 바와 비슷한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 작용하는 인간 항체를 제공하기 위해, 아브게닉스, 인크. (Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아주 프리몬트), 젠팜 (Genpharm, 미국 캘리포니아주 산 호세) 및 메다렉스, 인크. (Medarex, Inc., 미국 뉴저지주 프린스턴)와 같은 회사를 이용할 수 있다.

[0072] 또한, 형질이식된 마우스를 인간 말초혈 백혈구, 비장세포 또는 골수 (예, XTL의 Trioma 기술)로 면역화함으로써, 인간 MAb를 제조할 수 있다. 선택한 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체는 "유도 선별 (guided selection)"로 언급되는 기술로 제조할 수 있다. 이러한 방식에서, 선택한 비-인간 모노클로날 항체, 예를 들어 마우스 항체를 사용하여, 동일한 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체를 선별하도록 유도한다 (Jespersen et al., *Bio/technology* 12:899-903 (1988)).

[0073] 또한, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체는, 당업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 본 발명의 폴리펩티드를 "모방하는 (mimic)" 항-개별특이형 항체 (항-idiotypic antibody) 제조에 이용할 수 있다 (예, Greenspan & Bone, *FASEB J.* 7(5):437-444 (1989); 및 Nissinoff, J. *Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하여 본 발명의 폴리펩티드의 다량체화 (multimerization) 및/또는 본 발명의 폴리펩티드의 리간드에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하는 항체를 이용하여, 폴리펩티드 다량체화 및/또는 결합 도메인을 "모방하고", 그 결과 폴리펩티드 및/또는 그의 리간드에 결합하여 중화시키는, 항-개별특이형 항체를 제조할 수 있다. 이러한 중화성 항-개별특이형 항체 또는 상기 항-개별특이형 항체의 Fab 단편은 치료 요법에 사용하여 폴리펩티드 리간드를 중화시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 항-개별특이형 항체를 이용하여 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 그의 리간드/수용체에 결합시킬 수 있으며, 따라서 그의 생물학적 활성이 차단된다.

[0074] 본 발명의 항체는 이중 특이적 항체이다. 이중 특이적 항체는 적어도 2 이상의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다. 본 발명에서, 한가지 결합 특이성은 인자 D에 대한 것이며, 나머지는 다른 임의의 항원, 바람직하게는 세포 표면 단백질, 수용체, 수용체 서브유닛, 조직-특이적 항원, 바이러스 유래 단백질, 바이러스 코딩 막 단백질, 세균 유래 단백질 또는 세균 표면 단백질 등일 수 있다. 이중 특이적 항체는 또한 2 이상의 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다.

[0075] 이중 특이적 항체의 제조 방법은 널리 공지되어 있다. 전통적으로, 이중 특이적 항체의 재조합 생산은 두개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는, 두개의 면역글로블린 중쇄/경쇄 쌍의 동시 발현을 기초로 한다 (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 무작위 조합으로 인해, 하이브리도마 (쿼드로마 (quadroma))는 가능성 있는 상이한 항체 분자 혼합물을 생산하고, 그 중 하나만이 올바른 이중 특이적인 구조를 갖는다. 올바른 분자는 일반적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 정제한다. 유사한 방법들이 1993년 5월 13일에 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0076] 원하는 결합 특이성을 갖는 항체의 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)을 면역글로블린의 불변 도메인 서열에 융합시킬 수 있다. 융합은 바람직하게는 적어도 힌지 (hinge)의 일부, CH2 및 CH3 구역을 포함하는 면역글로블린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 경쇄 결합에 필수적인 부위를 포함하고 있는 제1 중쇄 불변 구역 (CH1)이 융합체 중 적어도 하나에 존재할 수 있다. 면역글로블린 중쇄 융합체 및 필요한 경우 면역글로블린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터에 삽입하여, 적합한 숙주 세포에 동시 형질전환된다. 이중 특이적 항체 제조의 구체적인 사항은 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Meth. In Enzym.*, 121:210(1986)]을 참조한다.

[0077] 이중결합항체 (heteroconjugate antibody) 역시 본 발명에 포함된다. 이중결합항체는 공유결합으로 연결된 2개의 항체로 구성되어 있다. 이러한 항체는 예를 들어, 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 대해 표적화시키기 위해 제안되었다 (미국 특허 4,676,980). 상기 항체는 가교결합체를 수반하는 것을 포함하여 단백질 합성 화학에서 공지된 방법으로 시험관 내에서 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 디술파이드 교환 반응 또는 티오에스테르 결합 형성에 의해 면역독소를 제조할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약으로는 이미노티올레이트, 메틸-4-머캅토부티리미데이트 및 예를 들어 미국 특허 4,676,980에 개시된 것들이 있다. 또한, IL13에 대한 단일 도메인 항체를 제조할 수 있다. 이 기술의 예는 낙타과의 중쇄 Ig 유래 항체를 설명하는 WO9425591 및 파지 라이브러리로부터의 단일 도메인의 완전한 인간 항체의 단리를 언급하고 있는

US20030130496에 개시되어 있다.

[0078] 모노클로날 항체 (MAB)의 생성

[0079] 본 발명의 한 실시태양에서, 모노클로날 항체, 예를 들어 항-인자 D는 설치류 (예를 들어 마우스, 래트, 햄스터 및 기니아 피그)를 인간 혈장 또는 소변으로부터 정제한 천연 인자 D, 또는 진핵세포 또는 원핵세포계에서 발현된 재조합 인자 D 또는 그의 단편으로 면역화시켜 생성시킬 수 있다. 다른 동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 인간 면역글로불린을 발현하는 형질전환 마우스 및 인간 B 림프구가 이식된 중증 복합 면역결핍 (SCID) 마우스를 면역화를 위해 사용할 수 있다. 하이브리도마는 문헌 [G. Kohler and C. Milstein (Nature, 1975: 256:495-497)]에 기재된 바와 같이 면역화된 동물로부터 유래한 B 림프구를 골수종 세포 (예를 들어 Sp2/0 및 NS0)와 융합시켜 통상적인 과정으로 생성시킬 수 있다.

[0080] 또한, 모노클로날 항체는 파지 디스플레이 시스템에서 인간 B 림프구로부터 재조합 단일쇄 Fv 또는 Fab 라이브러리의 스크리닝에 의해 생성시킬 수 있다. 제시된 항원에 대한 MAB의 특이성은 효소 결합 면역흡수 분석 (ELISA), 웨스턴 면역블로팅, 또는 다른 면역화학적 기술에 의해 시험할 수 있다. 보체 활성화에 대한 항체의 억제 활성은 대체 경로에 대해서는 비민감화 (unsensitized) 토끼 또는 기니아 피그 적혈구 (RBC)를 사용하는, 전통적인 경로에 대해서는 민감화 (sensitized) 닭 또는 양 RBC를 사용하는 용혈 분석에 의해 평가할 수 있다. 양성 웰 내의 하이브리도마는 제한 희석에 의해 클로닝한다. 항체는 당업계에 잘 공지된 분석에 의해 항원, 예를 들어 인자 D에 대한 특이성에 대해 특성화하기 위해 정제된다.

[0081] 또한, 중쇄 및 경쇄 Fv 구역이 연결된 단일 펩티드 사슬 결합 분자를 생성시킬 수 있다. 단일쇄 항체 ("ScFv") 및 그의 제조 방법은 미국 특허 4,946,778에 기재되어 있다. 별법으로, Fab는 유사한 수단으로 제조되어 발현될 수 있다 (M.J. Evans et al., J. Immunol. Meth., 1995; 184: 123-138). 완전한 및 부분적인 인간 항체는 모두 완전한 뮤린 MAb보다 면역원성이 더 작고, 단편 및 단일쇄 항체도 면역원성이 더 작다. 따라서, 상기 종류의 모든 항체는 면역 또는 알레르기 반응을 유발할 가능성이 더 작다. 그 결과, 이들 항체는 특히 반복 또는 장기간의 투여가 필요할 경우에 완전한 동물 항체보다 인간에서 생체내 투여에 보다 적합하다. 또한, 보다 작은 항체 단편의 크기는 조직 생체이용성의 개선을 도울 수 있고, 이것은 급성 질병 증상에서 보다 우수한 투여량 축적에 중요할 수 있다.

[0082] 본 발명의 한 바람직한 실시태양에서, 동물 (마우스) 가변 구역 및 인간 불변 구역을 갖는 키메릭 Fab가 치료 목적으로 사용된다. Fab는 전체 면역글로불린보다 작고 보다 우수한 조직 투과성을 제공할 수 있기 때문에 바람직하고, 1가 분자로서, 면역복합체 및 응집체가 형성될 가능성이 보다 작고, 미생물 시스템에서 생산될 수 있으며, 포유동물 시스템보다 더 용이하게 규모를 확대할 수 있다.

[0083] 보체 경로 억제제의 용도

[0084] 항체 및 그의 결합 단편과 같은 보체 억제제는 정맥내 주입, 정맥내 볼러스 주사, 및 복강내, 피내, 근육내, 피하, 비내, 기관내, 척수내, 두개내, 및 경구 경로를 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 적절한 제약 제제로 대상에게 투여될 수 있다. 이러한 투여를 통해 보체 억제제는 내인성 항원, 예를 들어 인자 D에 결합하여, C3b, C3a 및 C5a 과민독소, 및 C5b-9의 생성을 억제할 수 있다.

[0085] 상기 항체 및 분자의 추정된 바람직한 투여량은 10 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 혈청이다. 실제 투여량은 최적 투여량을 결정하기 위한 통상적인 방법에 따라, 즉, 상이한 투여량을 투여하고 어느 투여량이 가장 효과적인지를 결정하는 임상 시험으로 결정할 수 있다.

[0086] 보체 경로 억제제는 생체 내 보체 활성화 및/또는 보체 대체 경로 및 이에 수반되는 염증 소견, 예를 들어 대식세포, 호중구, 혈소판, 및 비만세포의 동원 및 활성화, 보종 및 조직 손상을 억제하는 기능을 수행할 수 있다. 상기 억제제는 보체 시스템의 과도한 또는 비제어된 활성화에 의해 매개되는 질병 또는 병태의 치료에 사용될 수 있다.

[0087] 본 발명의 항체는 단일 특이적, 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 그보다 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 선택된 항원의 상이한 에피토프에 특이적일 수 있거나, 항원 및 이중 에피토프, 예를 들어 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질에 특이적일 수 있다 (예를 들어, PCT 공개 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); 미국 특허 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547- 1553 (1992) 참조).

[0088] 본 발명에 유용한 항체는 그 항체가 인식하거나 또는 특이적으로 결합하는 보체 경로 성분, 예를 들어 인자 D의

에피토프(들) 또는 부분(들)의 측면에서 설명되거나 특정될 수 있다. 에피토프(들) 또는 폴리펩티드 부분(들)은 본원에서 설명되는 바와 같이, 예를 들어 N-말단 및 C-말단 위치, 인접 아미노산 잔기의 크기에 의해 특정될 수 있다.

[0089] 또한, 본 발명에 유용한 항체는 그의 교차 반응성의 측면에서 설명되거나 특정될 수 있다. IL-13에 대해 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 65%, 적어도 60%, 적어도 55%, 및 적어도 50% 동일성 (당업계에서 공지되고 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 계산됨)을 갖는 보체 경로 성분 폴리펩티드에 결합하는 항체도 본 발명에 포함된다. 또한, 항-인자 D 항체는 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-6} M 미만, 또는 약 10^{-5} M 미만의 KD로 다른 단백질, 예를 들어 항-인자 D 항체가 작용하는 것과 다른 종에서 유도된 인자 D 항체에 결합할 수도 있다.

[0090] **백터 및 숙주 세포**

[0091] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백터 구성체 및 상기 백터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 클로닝 및 형질전환을 위한 표준 기술을 본 발명의 항체를 발현하는 세포주 제조에 사용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현 백터는 널리 공지된 기법으로 제조할 수 있다. 발현 백터는 포유동물, 미생물, 바이러스, 또는 곤충 유전자로부터 유래된 것과 같은, 적합한 전사 또는 번역 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 조절 서열의 예로는 전사 프로모터, 오퍼레이터, 인핸서 (enhancer), mRNA 리보솜 결합부 및/또는 전사 및 번역 개시 및 종결을 조절하는 다른 적절한 서열이 있다. 뉴클레오티드 서열은 조절 서열이 적절한 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열과 기능적으로 관련이 있는 경우에 "작동가능하게 연결된다". 따라서, 프로모터 뉴클레오티드 서열이 적절한 뉴클레오티드 서열의 전사를 조절한다면, 프로모터 뉴클레오티드 서열은 항체 중쇄 서열에 작동가능하게 연결된 것이다.

[0093] 또한, 항체 중쇄 및/또는 경쇄 서열과 천연적으로 연관되지 않는 적절한 시그널 펩티드를 코딩하는 서열을 발현 백터로 삽입할 수 있다. 예를 들어, 항체가 주변세포질 공간 (periplasmic space)으로 또는 배지 내로 분비되도록, 시그널 펩티드 (분비 리더)의 뉴클레오티드 서열을 폴리펩티드 서열에 인-프레임 (in-frame)으로 융합시킬 수 있다. 계획된 숙주 세포에서 기능하는 시그널 펩티드는 적절한 항체의 세포외 분비를 향상시킨다. 시그널 펩티드는 세포에서 항체가 분비될 때 폴리펩티드로부터 절단될 수 있다. 이러한 분비 시그널의 예는 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, US5698435, US5698417, 및 US6204023에 개시된 것을 포함한다.

[0094] 본 발명에 이용가능한 숙주 세포는 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 백터로 형질전환된 세균 (예, 이. 콜라이 (*E. coli*), 비. 썩틸리스 (*B. subtilis*)), 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 백터로 형질전환된 효모 (예, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 피키아 (*Pichia*))와 같은 미생물; 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 백터 (예, 바큘로바이러스 (*Baculovirus*))로 감염된 곤충 세포 시스템, 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 백터 (예, 콜리 플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염된 또는 재조합 플라스미드 발현 백터 (예, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템, 또는 포유동물 세포의 게놈 유래의 프로모터 (예, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스 유래의 프로모터 (아데노바이러스 후기 프로모터, 박시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하고 있는 재조합 발현 구성체를 보유하는 포유동물 세포 시스템 (예, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0095] 백터는 플라스미드 백터, 단일 또는 이중 가닥의 파지 백터 또는 단일 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA 바이러스 백터일 수 있다. 세포 내로 DNA 및 RNA를 도입하기 위한 공지된 기법에 의해, 상기 백터를 폴리뉴클레오티드로서 세포에 도입할 수 있다. 파지 및 바이러스 백터의 경우에, 백터는 공지의 감염 및 형질도입 기술에 의해 패키징된 (packaged) 바이러스나 캡슐화된 (encapsulated) 바이러스로서 세포에 도입시킬 수 있다. 바이러스 백터는 복제가능하거나 또는 복제가 결여된 것일 수 있다. 후자의 경우에, 바이러스 증식은 일반적으로 보완적인 숙주 세포에서만 이루어질 수 있다. 또한, 무세포성 번역 시스템을 사용하여, DNA 구성체로부터 유래된 RNA를 이용하여 단백질을 생산할 수 있다. 이러한 백터는 항체 분자의 불변 구역 (예, PCT 공개 WO 86/05807, PCT 공개 WO 89/01036 및 미국 특허 5,122,464)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으며, 항체의 가변 도메인을 전체 중쇄 또는 경쇄 발현용 백터에 클로닝할 수 있다.

[0096] 본 발명에서 숙주 세포로서 유용한 원핵세포로는 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 이. 콜라이 및

비. 셉틸리스를 포함한다. 원핵 숙주 세포에 사용하기 위한 발현 벡터는 일반적으로 하나 이상의 표현형 선별 마커 유전자를 포함한다. 표현형 선별 마커 유전자의 예로는, 항생제 내성을 부여하거나 또는 독립영양 요구성을 충족시키는 단백질을 코딩하는 유전자이다. 원핵 숙주 세포에 이용가능한 발현 벡터의 예로는, pKK223-3 (파마시아 파인 케미칼스 (Pharmacia Fine Chemicals), 스웨덴 옴살라), pGEM1 (프로메가 바이오텍 (Promega Biotech), 미국 위스콘신주 메디슨), 및 pET (노바젠 (Novagen), 미국 위스콘신주 메디슨) 및 pRSET (인비트로젠 코퍼레이션 (Invitrogen Corporation), 미국 캘리포니아주 칼스바드) 시리즈의 벡터 (Studier, F.W., J. Mol. Biol. 219: 37(1991); Schoepfer, R. Gene 124: 83(1993))와 같이 상업적으로 이용가능한 플라스미드로부터 유래된 것이 있다. 재조합 원핵 숙주 세포 발현 벡터에 공통적으로 이용된 프로모터 서열로는, T7 (Rosenberg, et al. Gene 56, 125-135 (1987)), β -락타마제 (페니실린아제), 락토스 프로모터 시스템 (Chang et al., Nature 275:615, (1978); Goeddel et al., Nature 281:544, (1979)), 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 (Goeddel et al., Nuci. Acids Res. 8:4057, 1980) 및 tac 프로모터 (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.)가 있다.

[0097] 본 발명에 이용가능한 효모는 사카로마이세스 속, 피키아 속, 악티노마이세테스 (*Actinomycetes*) 속 및 클루비메로마이세스 (*Kluyveromyces*) 속의 것을 포함한다. 효모 벡터는 종종 2 μ 효모 플라스미드 유래의 복제 기점 (origin) 서열, 자가 복제 서열 (ARS), 프로모터 구역, 폴리아데닐화를 위한 서열, 전사 종결 서열 및 선별 마커 유전자를 포함할 것이다. 효모용 벡터에 적합한 프로모터 서열은, 특히 메탈로티오네인 프로모터, 3-포스포글리세레이트 키나제 프로모터 (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) 또는 에놀라제, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 핵소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제와 같은 다른 당분해 효소의 프로모터 (Holland et al., Biochem. 17:4900, 1978)를 포함한다. 효모 발현에서 사용하기 위한 다른 적합한 벡터 및 프로모터는 또한 문헌 [Fleer et al., Gene, 107: 285-195 (1991)]에 개시되어 있다. 다른 효모에 적합한 프로모터 및 벡터, 및 효모 형질전환 프로토콜이 당업계에서 널리 공지되어 있다. 효모 형질전환 프로토콜이 공지되어 있다. 이러한 프로토콜이 문헌 [Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1929(1978)]에 기재되어 있다. 히넨 프로토콜은 선별 배지 내에서 Trp⁺ 형질전환체를 선별한다.

[0098] 또한, 재조합 항체를 발현하기 위하여, 포유동물 또는 곤충 숙주 세포 배양 시스템, 예를 들어 이중 단백질 생산용 바큘로바이러스 시스템을 채택할 수 있다. 곤충 시스템에서, AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)를 벡터로 사용하여 외부 유전자를 발현시킬 수 있다. 상기 바이러스는 스포도테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 증식한다. 항체 코딩 서열은 개별적으로 바이러스의 비필수 구역 (예, 폴리헤드린 유전자)에 클로닝하여, AcNPV 프로모터 (예, 폴리헤드린 프로모터)의 조절 하에 위치시킬 수 있다.

[0099] NSO 또는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 본 발명의 항체의 포유동물 발현용 세포로 사용할 수 있다. 포유동물 숙주 세포 발현 벡터용 전사 및 번역 조절 서열은 바이러스 게놈으로부터 절제할 수 있다. 통상적으로 사용되는 프로모터 서열 및 인핸서 서열은 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스 2, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 및 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV)로부터 유래된다. SV40 바이러스 게놈 유래의 DNA 서열을 사용하여, 포유동물 숙주 세포에서 구조 유전자 서열 발현을 위한 다른 유전자 성분, 예를 들어, SV40 기점, 초기 및 후기 프로모터, 인핸서, 스플라이스 (splice) 및 폴리아데닐화 부위를 제공할 수 있다. 바이러스 초기 및 후기 프로모터는 둘다 바이러스 복제 기점을 또한 포함할 수 있는 단편으로서 바이러스 게놈으로부터 용이하게 획득할 수 있기 때문에, 특히 이들을 이용할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 사용하기 위한 예시적인 발현 벡터는 상업적으로 구입가능하다.

[0100] **항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드**

[0101] 추가로, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산, 예를 들어 DNA를 제공한다. 예시적인 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명은 엄격한 혼성화 조건 또는 보다 낮은 엄격도의 혼성화 조건 하에서 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0102] 당업계에 공지된 임의의 방법으로, 폴리뉴클레오티드를 획득할 수 있으며, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서

열을 결정할 수 있다. 예를 들어, 항체의 뉴클레오티드 서열이 공지된 경우, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화학 합성 올리고뉴클레오티드로부터 만들 수 있으며 (예, 문헌 [Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)]에 기재된 바와 같이), 즉 항체를 코딩하는 서열의 일부를 포함하는 중복되는 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 상기 올리고뉴클레오티드를 어닐링 및 라이게이션한 다음, 라이게이션된 올리고뉴클레오티드를 PCR로 증폭시키는 것을 수반한다.

[0103] 별법으로, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적합한 공급원의 핵산으로부터 생성시킬 수 있다. 항체 분자의 서열이 공지되어 있지만 특정 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 클론이 이용가능하지 않다면, 면역글로불린을 코딩하는 핵산을 화학적으로 합성하거나 또는 적합한 공급원 (예, 항체 cDNA 라이브러리 또는 본 발명의 항체를 발현하기 위해 선별된 하이브리도마 세포와 같이 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포로부터 단리한 핵산, 바람직하게는 폴리 A+ RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리)으로부터 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화가능한 합성 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해, 또는 예를 들어 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 클론을 동정하기 위해 특정 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용한 클로닝에 의해 수득할 수 있다. PCR에 의해 생성시킨 증폭된 핵산은 이후 당업계에 널리 공지된 임의의 방법을 이용하여 복제가능한 클로닝 벡터에 클로닝할 수 있다.

[0104] 항체의 뉴클레오티드 서열 및 대응하는 아미노산 서열이 결정되면, 항체의 뉴클레오티드 서열을 뉴클레오티드 서열 조작에 대해 당업계에 널리 공지된 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기법, 부위 지정 돌연변이 유발, PCR 등 (예를 들어, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY]에 기재된 기술 참고)으로 조작하여, 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 제조, 예를 들어 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 유도할 수 있다.

[0105] 특정 실시태양에서, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 검사하여, 널리 공지된 방법에 의해, 예를 들어 다른 중쇄 및 경쇄 가변 구역의 공지 아미노산 서열과 비교하여 CDR의 서열을 동정함으로써, 서열 초과 변성 구역을 결정할 수 있다. 일반적인 재조합 DNA 기술을 이용하여, 하나 이상의 CDR을 프레임워크 구역 내에, 예를 들어 인간 프레임워크 구역 내에 삽입하여, 비-인간 항체를 전술한 바와 같이 인간화할 수 있다. 프레임워크 구역은 자연 발생 또는 컨센서스 프레임워크 구역일 수 있으며, 바람직하게는 인간 프레임워크 구역 (예, 인간 프레임워크 구역의 리스트에 대해서는 문헌 [Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)] 참조)이다. 바람직하게는, 프레임워크 구역과 CDR의 조합에 의해 생성시킨 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩한다. 바람직하게는, 상기한 바와 같이, 하나 이상의 아미노산 치환을 프레임워크 구역 내에 형성시킬 수 있으며, 바람직하게는 상기 아미노산 치환은 항체의 그의 항원에 대한 결합을 향상시킨다. 또한, 이러한 방법을 이용하여 사슬 내부 디설파이드 결합에 참여하는 하나 이상의 가변 구역의 시스테인 잔기를 아미노산 치환하거나 결실시켜, 하나 이상의 사슬 내부의 디설파이드 결합이 결핍된 항체 분자를 생성시킬 수 있다. 다른 폴리뉴클레오티드 변이도 본 발명에 포함되며, 당업계의 기술 범위에 속한다.

[0106] 또한, 적합한 항원 특이성의 마우스 항체 분자 유래 유전자를 적절한 생물학적 활성의 인간 항체 분자 유래의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써 "키메라 항체"를 생산하기 위해 개발된 기술 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))들을 사용할 수 있다. 상기한 바와 같이, 키메라 항체는 상이한 부분이 상이한 동물 종류로부터 유래된 분자, 예를 들어 뮤린 MAb로부터 유래된 가변 구역과 인간 면역글로불린 불변 구역을 갖는 분자, 예를 들어 인간화 항체이다.

[0107] 별법으로, 개시된 단일쇄 항체 생산 기술 (미국 특허 4,946,778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); 및 Ward et al., Nature 334:544-54 (1989))을 적용하여, 단일쇄 항체를 생산할 수 있다. 단일쇄 항체는 아미노산 브릿지 (bridge)를 통해 Fv 구역의 중쇄 및 경쇄 단편을 연결하여 단일쇄 폴리펩티드를 생성시킴으로써 형성된다. 또한, 이. 콜라이에서 기능적 Fv 단편의 어셈블리 기술을 사용할 수 있다 (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).

[0108] **항체 생산 방법**

[0109] 본 발명의 항체는 항체 합성 분야에 공지된 임의 방법으로 제조할 수 있으며, 특히 화학적 합성 또는 바람직하게는 재조합 발현 기술로 제조할 수 있다.

[0110] 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 단편, 유도체 또는 유사체 (예, 본 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄 또는 본 발

명의 단일쇄 항체)의 재조합 발현에는 항체 또는 항체의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 구축이 필요하다. 항체 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 수득되면, 항체 생산용 벡터를 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다. 발현 벡터는 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 포함하는 구성체이다. 상기 방법은 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다.

[0111] 발현 벡터를 통상적인 기술에 의해 숙주 세포로 전달하고, 이후 형질감염된 세포를 통상적인 기술에 의해 배양하여 본 발명의 항체를 생산한다. 본 발명의 한 측면에서, 중쇄 및 경쇄 모두를 코딩하는 벡터는 아래에서 상세히 설명하는 바와 같이, 전체 면역글로불린 분자 발현용 숙주 세포에서 공동 발현될 수 있다.

[0112] 상기한 바와 같이, 다양한 숙주 발현 벡터 시스템을 활용하여 본 발명의 항체 분자를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주 발현 시스템은 목적하는 코딩 서열을 생산한 후 정제할 수 있는 비히클이며, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염될 때 본 발명의 항체 분자를 계내에서 (in situ) 발현시킬 수 있는 세포이다. 이. 콜라이와 같은 세균 세포 및 진핵세포를 재조합 항체 분자의 발현을 위해, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해 일반적으로 이용한다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스의 주요 중조기 (intermediate early) 유전자 프로모터 성분과 같은 벡터와 함께 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)와 같은 포유동물 세포가 효과적인 항체 발현 시스템이다 (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

[0113] 또한, 삽입 서열의 발현을 조절하거나, 유전자 산물을 목적하는 특정 방식으로 변형 및 처리하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 이러한 단백질 산물의 변형 (예, 글리코실화) 및 처리 (예, 절단)가 단백질 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포가 단백질 및 유전자 산물의 번역후 처리 및 변형에 있어 특징적이며 특이적인 메카니즘을 갖는다. 발현되는 외부 단백질의 올바른 변형 및 처리를 위해, 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 인해, 유전자 산물의 1차 전사체, 글리코실화 및 인산화의 적절한 처리를 위한 세포 기구를 갖는 진핵 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는 CHO, COS, 293, 3T3 또는 골수종 세포를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0114] 장기간, 재조합 단백질의 고수율 생산을 위해, 안정적인 발현이 바람직하다. 예를 들어, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주를 공학적으로 처리할 수 있다. 바이러스 복제 기점을 포함하는 발현 벡터를 이용하기보다는, 숙주 세포를 적합한 발현 조절 성분 (예, 프로모터, 인핸서 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 조절되는 DNA 및 선별 마커로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 공학적으로 처리된 세포는 농축 배지에서 1-2일 동안 성장시킨 후, 선별 배지로 이송할 수 있다. 재조합 플라스미드 내의 선별 마커는 선별에 대한 내성을 부여하며, 세포가 플라스미드를 그의 염색체 내로 안정적으로 통합시키고 성장하여 포커스 (foci)를 형성하고, 이는 다시 클로닝되어 세포주로 팽창될 수 있다. 이러한 방법은 항체 분자를 발현하는 세포주를 공학적으로 처리하기 위해 유용하게 사용할 수 있다. 이와 같이 공학적으로 처리된 세포주는 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물의 스크리닝 및 평가에서 특히 유용할 수 있다.

[0115] tk, hgrpt 또는 aprt-세포에 각각 사용될 수 있는 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler et al., Cell 11:223(1977)), 히포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) 유전자를 포함하고 이로 제한되지 않는 많은 선별 시스템을 이용할 수 있다. 또한, 항대사산물 내성을 다음 유전자 선별을 위한 근거로서 사용할 수 있다: 메토티렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)), 미코페놀산에 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)), 및 히그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). 재조합 DNA 기술 분야에서 일반적으로 공지된 방법을 통상적으로 적용하여 목적하는 재조합 클론을 선별할 수 있으며, 이러한 방법은 예를 들어 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Ausubel et al.(eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 및 Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre- Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)]에 기재되어 있다.

[0116] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가시킬 수 있다 (문헌 [Bebbington and Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" (DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press, New York, 1987)] 참조). 항체를 발현하는 벡터 시스템 내의 마커가 증폭

가능한 경우에, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 억제제 수준의 증가는 마커 유전자의 카피 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 구역은 항체 유전자와 연합되어 있기 때문에, 항체 생산 역시 증가할 것이다 (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

[0117] 본 발명의 2종의 발현 벡터, 즉 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 숙주 세포를 동시 형질감염시킬 수 있다. 상기 2종의 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 동일한 수준으로 발현할 수 있는 동일한 선별 마커를 포함할 수 있다. 별법으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두를 코딩하며 발현할 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 무독성 중쇄의 과다 발현을 방지하기 위해 경쇄는 중쇄 앞에 위치하여야 한다 (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). 중쇄 및 경쇄의 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0118] 본 발명의 항체 분자는 동물에 의해 생산되거나, 화학적으로 합성되거나 또는 재조합 방법으로 발현된 후에, 면역글로불린 분자의 정제 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피 (예, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 이후의 특정 항원에 대한 친화도에 의한, 크기 배제 크로마토그래피), 원심분리, 용해도 차이 또는 단백질 정제에 대한 임의의 다른 표준 기술로 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 이종 폴리펩티드 서열에 융합되어, 정제를 용이하게 할 수 있다.

[0119] 본 발명은 폴리펩티드에 재조합 방법으로 융합되거나 또는 화학적으로 컨주게이션된 (공유 결합 및 비공유 결합 컨주게이션을 포함) 항체를 포함한다. 본 발명의 융합 또는 컨주게이션된 항체는 정제를 용이하게 하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Harbor et al., 상기 문헌, 및 PCT 공개 WO 93/21232; EP 439,095 ; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); 미국 특허 5,474,981; Gillies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452 (1991)]을 참고한다.

[0120] 더욱이, 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 정제를 용이하게 하기 위한 펩티드와 같은 마커 서열에 융합시킬 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 마커 아미노산 서열은 특히 pQE 벡터 (퀴아젠, 인크. (QIAGEN, Inc.), 미국 91311 캘리포니아주 채츠워스 이튼 예비뉴 9259)에 존재하는 태그와 같은 헥사-히스티딘 펩티드이고, 많은 서열을 상업적으로 입수할 수 있다. 문헌 [Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)]에 개시된 바와 같이, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 정제를 용이하게 한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질 유래의 에피토프인 "HA" 태그 (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) 및 "플래그 (flag)" 태그를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0121] **항체의 진단 용도**

[0122] 본 발명의 항체는 공유 결합에 의한 부착이 항원에 대한 결합을 간섭하지 않도록 항체에 대한 모든 종류의 분자를 공유 결합에 의한 부착에 의해 변형시킨 유도체를 포함한다. 예를 들어, 한정하기 위한 것은 아니지만, 항체 유도체는 예를 들어 비오틴화, HRP 또는 임의의 다른 검출가능한 모이어티에 의해 변형된 항체를 포함한다.

[0123] 본 발명의 항체는 예를 들어 시험관내 및 생체내 진단 방법을 모두 포함하여 인자 D를 검출하기 위해 사용될 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 항체는 눈 병태 또는 질병에 걸린 대상의 눈에서 얻은 생물학적 샘플 내의 인자 D의 수준을 정성적으로 및 정량적으로 측정하기 위한 면역분석에 사용한다. 일반적으로, 면역분석은 예를 들어 문헌 [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (그 전부가 본원에 참고로 포함됨)]에 기재되어 있다.

[0124] 아래에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 본 발명의 항체를 단독으로 또는 다른 조성물과 함께 사용할 수 있다. 항체는 추가로 N- 또는 C-말단에서 이종 폴리펩티드에 재조합 방법으로 융합되거나, 또는 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 컨주게이션 (공유 및 비공유 컨주게이션 포함)될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 검출 분석에서 표지로서 유용한 분자에 재조합 방법으로 융합되거나 컨주게이션될 수 있다.

[0125] 또한, 본 발명은 이환된 개체의 눈에서 보체 경로 성분의 수준을 검출하기 위한 진단제에 컨주게이션된 항체 또는 그의 단편의 용도를 포함한다. 항체를 진단 용도로 사용하여, 예를 들어 제시된 치료 요법의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 과정의 일부로서, 예를 들어 눈 병태 또는 질병의 발병 또는 진행을 모니터링할 수 있다. 검출은 검출가능한 물질과 항체를 커플링함으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보조기 (prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 생체발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방사 촬영술을 이용한 양전자 방사 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 검출가능한 물질

은 당업계에 공지된 기술을 이용하여 항체 (또는 그의 단편)에 직접 또는 매개물 (예, 당업계에 공지된 링커)을 통하여 간접적으로 커플링되거나 컨주게이션될 수 있다. 본 발명에 따라 진단제로서 사용하기 위해 항체에 컨주게이션시킬 수 있는 금속 이온의 예는 미국 특허 4,741,900를 참조한다. 적합한 효소의 예로는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제가 있으며, 적합한 보조기 복합체의 예로는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 있으며, 적합한 형광 물질의 예로는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린이 있으며, 발광 물질의 예로는 루미놀이 있으며, 생체발광 물질의 예로는 루시페라제, 루시페린 및 에퀴오린이 있으며, 적합한 방사성 물질로는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In 또는 ⁹⁹Tc가 있다.

[0126] 또한, 항체는 표적 항원의 면역분석 또는 정제에 특히 유용한 고체 지지체에 부착시킬 수 있다. 고체 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0127] 인자 D에 특이적으로 결합하는 표지된 항체, 및 그의 유도체 및 유사체는 인자 D의 이상 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병, 질환, 및/또는 병태를 검출하거나, 진단하거나, 모니터링하기 위한 진단 목적으로 사용될 수 있다. 본 발명은 (a) 인자 D에 특이적인 본 발명의 하나 이상의 항체를 사용하여 개체의 세포 또는 체액 내에서 인자 D의 발현을 분석하고, (b) 상기 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하고, 여기서 표준 발현 수준에 비해 분석된 인자 D 발현 수준의 증가 또는 감소는 이상 발현을 나타내는 것인, 인자 D의 이상 발현의 검출 방법을 제공한다.

[0128] 항체는 샘플, 예를 들어 안구액 내의 인자 D의 존재 및/또는 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 검출 방법은 샘플을 항-인자 D 항체와 접촉시키고 샘플에 결합된 항체의 양을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0129] 본 발명은 (a) 본 발명의 하나 이상의 항체를 사용하여 개체의 세포 또는 체액 내에서 인자 D의 발현을 분석하고, (b) 상기 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하고, 여기서 표준 발현 수준에 비해 분석된 인자 D 발현 수준의 증가 또는 감소는 특정 질환을 나타내는 것인, 질환을 진단하기 위한 진단 분석 방법을 제공한다.

[0130] 본 발명의 항체를 당업자에게 공지된 전통적인 면역조직학적 방법을 사용하여 생물학적 샘플 내의 단백질 수준을 분석하기 위해 사용할 수 있다 (예, Jalkanen et al., J. cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987) 참조). 단백질 유전자 발현 검출에 이용가능한 다른 항체 기반 방법은 효소결합 면역흡수 분석 (ELISA) 및 방사성 면역 분석 (RIA)과 같은 면역분석법을 포함한다. 적합한 항체 분석 표지는 당업계에 공지되어 있으며, 효소 표지, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 요오드 (¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소 (¹⁴C), 황 (³⁵S), 트리튬 (³H), 인듐 (¹¹²In) 및 테크네튬 (⁹⁹Tc)과 같은 방사성 동위원소, 루미놀과 같은 발광 표지, 및 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 표지 및 비오틴을 포함한다.

[0131] 본 발명의 한 측면은 대상, 바람직하게는 포유동물 및 가장 바람직하게는 인간의 눈에서 보체 활성화와 연관된 질병 또는 질환의 검출 및 진단이다. 한 실시태양에서, 진단은 a) 환자의 눈으로부터 샘플을 채취하고; b) 보체 성분, 예를 들어 C3a 또는 C3b 또는 C5a의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 배경 수준은 검출된 표지된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 사전에 측정된 표준값과 비교하는 것을 포함한 다양한 방법으로 결정할 수 있다.

[0132] 한 실시태양에서, 질병 또는 질환의 모니터링은 질병 또는 질환의 진단 방법을 초기 진단 후 1개월 경과시, 6개월 경과시, 1년 경과시 등의 시점에 반복하여 수행할 수 있다.

[0133] **보체 경로 억제제의 치료 용도**

[0134] 보체 경로 억제제는 안질환, 예를 들어 노인성 황반 변성에 걸린 대상에게 투여될 수 있다. 치료학적 모이어티가 컨주게이션되거나 되지 않은 항체를 치료제로서 사용할 수 있다. 본 발명은 보체 경로 억제제를 동물, 포유동물, 또는 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 보체 경로 활성화를 수반하는 안 질환, 질병, 또는 병태를 치료하기 위한 보체 경로 억제제, 특히 항체의 용도에 관한 것이다. 동물 또는 대상은 특정 치료를 필요로 하는 동물, 예를 들어 특정 질환, 예를 들어 보체 관련 질환으로 진단된 동물일 수 있다. 인자 D에 대해 작용하는 항체는 보체 대체 경로의 억제에 유용하고, 따라서 보체 경로 관련 질환 또는 병태의 억제에 유용하다. 특히, 본 발명은 AMD, 당뇨 망막병증, 및 맥락막 혈관신생의 치료에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 치료상 허용되는 용량의 항체, 또는 항체들, 또는 본 발명의 항체의 콕테일 (cocktail)을 투여하거나, 또는 이들 항체를 상이한 기원의 다른 분자와 함께 투여함으로써, 보체 경로 성분의 활성화 효과는 치료된 포유동물에서 감소되거나

제거될 수 있다.

- [0135] 본 발명의 치료 화합물은 본 발명의 항체 (본원에 기재된 바와 같은 그의 단편, 유사체 및 유도체 포함) 및 아래 설명되는 본 발명의 항체 (본원에 기재된 바와 같이, 그의 단편, 유사체 및 유도체 및 항-개별특이형 항체를 포함)를 코딩하는 핵산을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 항체는 보체 경로, 특히 대체 경로, 특히 인자 D의 이상 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병, 질환 또는 병태를 치료, 억제 또는 예방하기 위해 사용할 수 있다. 인자 D의 이상 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병, 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방은 상기 질병, 질환 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 완화시키는 것을 비제한적으로 포함한다. 본 발명의 항체는 당업계에 공지되거나 본원에 설명된 바와 같은 제약학상 허용되는 조성물로 제공될 수 있다.
- [0136] 보체 경로의 이상 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 질환의 치료, 억제 및 예방에서 효과적인 항체의 양은 표준 임상 기술에 의해 결정할 수 있다. 항체는 질병 상태를 개선시키기 위해 질병에 맞는 치료 요법으로, 예를 들어 하루 또는 수일에 걸쳐 1회 또는 수회 투여하거나, 또는 안 질환 또는 병태를 예방하기 위해 장기간에 걸쳐 주기적으로 투여할 수 있다.
- [0137] 또한, 시험관내 분석을 임의로 사용하여 최적 투여량 범위 결정을 도울 수 있다. 체계의 정확한 용량은 역시 투여 경로, 질병 또는 질환의 심도에 따라 결정될 것이며, 의사의 판단 또는 각 환자의 상태에 따라 결정하여야 한다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로 얻은 용량-반응 곡선으로부터 추정할 수 있다.
- [0138] 항체의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은 일반적으로 환자 체중 1 kg당 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 바람직하게는, 환자에게 투여되는 투여량은 환자 체중 1 kg당 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 1 mg/kg 내지 10 mg/kg이다. 일반적으로, 인간 항체는 외부 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종의 항체보다 인체 내에서 보다 긴 반감기를 가진다. 따라서, 인간 항체의 적은 투여량 및 투여 횟수 감소가 가능하다. 나아가, 본 발명에 따른 항체의 투여량 및 투여 횟수는 예를 들어 지질화 (lipidation)와 같은 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 침투 (예를 들어, 뇌 내로의)를 증강시킴으로써 낮출 수 있다. 바람직한 측면에서, 항체는 실질적으로 정제된 (예, 그의 효과를 제한하거나 원하지 않는 부작용을 생성시키는 물질이 실질적으로 없는) 것이다.
- [0139] 다양한 전달 시스템이 알려져 있고, 본 발명의 항체 투여에 사용할 수 있으며, 주사, 예를 들어 리포솜, 미세입자, 미세캡슐 내 캡슐화 (encapsulation), 화합물을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 세포내 이입 (endocytosis) (예를 들어, Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산 구성을 포함한다.
- [0140] 항체는 모든 허용가능한 방식으로 포유동물에게 투여할 수 있다. 도입 방법은 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외, 흡입 및 경구 경로를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 그러나, 본 발명의 목적에서, 바람직한 투여 경로는 안내이다.
- [0141] 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 또한, 본 발명의 치료 항체 또는 조성물을 심실내 및 수막강내 주사를 포함한 임의의 적합한 경로에 의해 중추 신경계에 도입하는 것이 바람직할 수 있으며, 심실내 주사는 옴마야 저장체 (Ommaya reservoir)와 같은 저장체가 부착된 심실내 카테테르에 의해 용이하게 시행될 수 있다.
- [0142] 다른 실시태양에서, 항체는 소낭 (vesicle), 특히 리포솜 형태로 전달될 수 있다 (Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; 일반적으로 동일한 문헌 참조).
- [0143] 다른 실시태양에서, 항체는 조절 방출 시스템의 형태로 전달할 수 있다. 한 실시태양에서, 펌프를 사용할 수 있다 (Langer, 상기 문헌; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989) 참조). 다른 실시태양에서, 중합체 물질을 사용할 수 있다 (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.) CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performances, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989) 참조). 또다른 실시태양에서, 조절 방출 시스템을 치료 표적에 근접하여 위치시킬 수 있다.
- [0144] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 유용한 제약 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 치료 유효량의 항체와 생리

학상 허용되는 담체를 포함한다. 특정 실시태양에서, 용어 "생리학상 허용되는"은 미국 연방 또는 주정부의 규제 당국으로부터 승인을 받았거나 또는 미국 약전에서 또는 동물, 특히 인간 사용에 대해 일반적으로 인정된 다른 약전에 기재된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제가 함께 투여되는 희석제, 어쥘런트, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 상기 생리학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어 물 및 석유, 동물유, 식물유 또는 합성유를 포함한 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등일 수 있다. 제약 조성물을 정맥 내로 투여할 때 물이 바람직한 담체이다. 또한, 염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액을 액체 담체로서, 특히 주사용 용액으로서 사용할 수 있다. 적합한 제약 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 호분, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등이 있다. 상기 조성물은 또한 바람직한 경우에 미량의 습윤제, 유효제 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 용액제, 현탁제, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐제, 분말제, 서방형 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 상기 조성물은 통상적인 결합제 및 트리글리세리드와 같은 담체와 함께 좌제로서 제제화할 수 있다. 경구 제제는 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적합한 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 개시되어 있다. 이러한 조성물은 환자에게 투여하기에 적절한 형태를 제공하기 위해 유효량의 항체, 바람직하게는 정제된 형태의 항체를 적합한 함량의 담체와 함께 함유할 것이다. 제제는 투여 방식에 적합하여야 한다.

[0145] 한 실시태양에서, 조성물은 인간의 정맥내 투여용으로 채용된 제약 조성물로서 일반적인 공정에 따라 제제화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 버퍼 중의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위의 통증을 약화시키는 리그노카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 예를 들어 동결건조한 건조 분말 또는 무수 농축물과 같은 단위 투여 형태로, 앰플 또는 사के트 (sachette)와 같이 활성 물질의 함량이 표시된 밀폐 용기 내에 별개로 또는 함께 혼합하여 넣는다. 조성물을 주입에 의해 투여하는 경우, 제약 등급의 멸균수 또는 염수를 포함하는 주입 병을 이용하여 투여할 수 있다. 조성물을 주사로 투여하는 경우, 투여 전에 성분을 혼합할 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수 앰플을 제공할 수 있다.

[0146] 또한, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물의 하나 이상의 성분이 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 임의로, 상기 용기(들)에 제약학적 또는 생물학적 산물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기구에서 지정한 형태의 주의사항이 부착될 수 있으며, 이 주의사항은 정부 기구에서 인간에게 투여하기 위한 제조, 이용 또는 판매를 승인하였음을 명시한다.

[0147] 또한, 본 발명의 항체는 이중 폴리펩티드, 약물, 방사성 뉴클레오티드 또는 독소와 같은 다양한 효과기 분자에 컨쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 5,314,995; 및 EP 396,387을 참조한다. 항체 또는 그의 단편을 세포독소와 같은 치료학적 모이어티, 예를 들어 세포 증식 억제제 또는 살세포제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어 ²¹³Bi와 같은 알파-방사체에 컨쥬게이션시킬 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 해로운 임의의 물질을 포함한다. 그 예로는 파클리탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈클라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 및 이들의 유사체 또는 상동체를 포함한다. 치료제는 항대사산물 (예, 메토타렉세이트, 6-머갑토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예, 메클로레타민, 티오에파클로람부실, 벨팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부설관, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 cis-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예, 다우노루비신 (기존의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예, 닥티노마이신 (기존의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)) 및 항-체세포 분열제 (예, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0148] 상기 치료학적 모이어티를 항체에 컨쥬게이션하기 위한 기술은 공지되어 있다 [예를 들어, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.),

pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982) 참고]. 별법으로, 항체는 제2 항체에 컨쥬게이션되어 항체 이중컨쥬게이트를 형성할 수 있다 (예를 들어, 세갈 (Segal)의 미국 특허 4,676,980 참조).

[0149] 본 발명의 컨쥬게이트는 일정한 생물학적 반응을 변형하는데 사용할 수 있으며, 치료제 또는 약물 모이어티는 고전적인 화학치료제로 제한되는 것으로 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 약물 모이어티는 목적하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 엑소톡신 또는 디프테리아 독소와 같은 독소, 종양 괴사인자, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 세포자멸제, 예를 들어 TNF- α , TNF- β , AIM I (국제 공개 WO 97/33899), AIM II (국제 공개 WO 97/34911), Fas 리간드 (Takahashi et al., Int. Immunol., 6:1567-1574 (1994)), VEGF (국제 공개 WO 99/23105), 혈전제 또는 항혈관신생제, 예를 들어 안지오스타틴 또는 엔도스타틴과 같은 단백질; 또는 예를 들어 림포킨, 인터루킨-1 (IL-1), 인터루킨-2 (IL-2), 인터루킨-6 (IL-6), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF) 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0150] **항체 기반 유전자 요법**

[0151] 본 발명의 다른 측면에서, 항체 또는 그의 결합 단편을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산은 유전자 요법에 의해 보체 경로의 이상 발현 및/또는 활성화와 관련된 질병 또는 질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위해 투여된다. 유전자 요법은 발현된 또는 발현가능한 핵산을 개체에게 투여함으로써 수행되는 요법을 의미한다. 본 발명의 상기 실시태양에서, 핵산은 치료 효과를 매개하는 그의 코딩 단백질을 생산한다. 이용가능한 유전자 요법에 사용되는 임의의 방법을 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 그 방법의 예를 아래에서 설명한다.

[0152] 유전자 요법의 전체적인 개요로서, 문헌 [Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); 및 Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993)]을 참조한다.

[0153] 한 측면에서, 화합물은 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 상기 핵산 서열은 항체 또는 단편 또는 키메라 단백질 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 적합한 숙주 내에서 발현시키는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 이러한 핵산 서열은 항체 코딩 구역에 작동가능하게 연결된 프로모터를 갖고, 상기 프로모터는 유도성 또는 구성적 (constitutive)이며, 임의로 조직-특이적이다.

[0154] 다른 특정 실시태양에서, 항체 코딩 서열 및 임의의 다른 요구되는 서열이 게놈 내의 요구되는 부위에서 상동 재조합을 촉진시키는 구역의 측면에 위치하여, 항체 코딩 핵산을 염색체 내부에서 발현시키는 핵산 분자가 사용된다 (Koller and Smithies, Proc. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijistra et al., Nature 342:435-438 (1989)). 특정 실시태양에서, 발현된 항체 분자는 단일쇄 항체이며, 별법으로, 핵산 서열은 항체의 중쇄 및 경쇄 모두, 또는 그의 단편을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0155] 핵산의 환자내 전달은 핵산 또는 핵산 운반 벡터에 환자를 직접적으로 노출시키는 직접 방식, 또는 세포를 먼저 시험관 내에서 핵산으로 형질전환시킨 다음, 환자에게 이식하는 간접 방식일 수 있다. 이러한 두 방식은 생체 내 또는 생체의 유전자 요법으로서 각각 공지되어 있다.

[0156] 특정 실시태양에서, 핵산 서열은 발현되어 코딩된 산물을 생산하는 생체 내로 직접 투여된다. 이는 예를 들어 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 핵산 서열을 제조하고, 예를 들어 결합이 있는 또는 약독화된 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 벡터를 이용한 감염에 의해 (미국 특허 4,980,286), 또는 네이키드 (naked) DNA의 직접 주입에 의해, 또는 미세입자 충격 (microparticle bombardment) (예, 유전자 총; 바이오리스팅 (Biolistic), 듀퐁 (Dupont)), 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염체를 이용한 코팅, 리포솜, 미세입자, 미세캡슐내 캡슐화에 의해, 또는 핵으로 들어가는 것으로 알려진 펩티드에 연결시킨 형태로 핵산 서열을 투여함으로써, 수용체 매개 세포내 이입을 수행하는 리간드에 연결된 형태 (수용체를 특이적으로 발현하는 표적 세포 유형에 사용될 수 있는)로 핵산 서열을 투여함으로써 (예, Wu and Wu, J. Bio. Chem., 262:4429-4432 (1987)) 등과 같이, 당업계에 공지된 다수의 방법들로 수행할 수 있다. 다른 실시태양에서, 리간드가 엔도솜을 파괴하는 융합원성 (fusogenic) 바이러스 펩티드를 포함하여 핵산이 라이소솜에 의한 분해를 피할 수 있는 핵산-리간드 복

합체를 형성시킬 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 핵산은 세포 특이적인 흡수 및 발현에 있어서, 특이적인 수용체를 표적화함으로써 생체 내에서 표적화될 수 있다 (예, PCT 공개 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188, WO 93/20221). 별법으로, 핵산을 세포 내부로 도입하고, 상동 재조합에 의해 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내로 통합될 수 있다 (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989)).

[0157] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 사용한다. 예를 들어, 레트로바이러스를 사용할 수 있다 (Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). 이러한 레트로바이러스 벡터는 바이러스 계통의 정확한 패키지와 숙주 세포 DNA로의 통합에 필요한 성분을 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 항체 코딩 핵산 서열은 환자 내로의 유전자 전달을 용이하게 하는 1종 이상의 벡터에 클로닝된다. 레트로바이러스 벡터에 대한 보다 구체적인 사항은 문헌 [Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)]에서 확인할 수 있으며, 상기 문헌은 줄기 세포를 화학요법에 대해 보다 내성으로 만들기 위해 조혈 줄기 세포에 mdrl 유전자를 전달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 용도를 개시하고 있다. 유전자 요법에서의 레트로바이러스 벡터의 용도를 개시하고 있는 다른 문헌으로는, Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); 및 Grossman and Wilson, Curr. Opin. Gen. and Dev. 3:110-114 (1993)가 있다.

[0158] 또한, 본 발명에 아데노바이러스를 사용할 수 있다. 아데노바이러스는 특히 본 발명에서 호흡 상피에 항체를 전달하는데 있어 매우 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 자연에서 호흡 상피를 감염시킨다. 아데노바이러스계 전달 시스템의 다른 표적은 간, 중추 신경계, 내피 세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있다는 잇점을 갖는다. 문헌 [Kozarsky 및 Wilson, Curr. Opin. Gen. Dev. 3:499-503 (1993)]에 아데노바이러스 기반 유전자 요법의 개략적인 내용이 기재되어 있다. 문헌 [Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)]은 붉은 털 원숭이의 호흡 상피에 유전자를 전달하기 위해 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것을 입증하였다. 아데노바이러스를 유전자 요법에 사용하는 다른 예는 문헌 [Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT 공개 WO94/12649; 및 Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)]에서 볼 수 있다. 아데노 연관 바이러스 (AAV)는 또한 유전자 요법에 사용하는 것이 제안되었다 (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 미국 특허 5,436,146; 6,632,670; 6,642,051).

[0159] 다른 유전자 요법은 전기천공, 리포펙션 (lipofection), 인산칼슘 매개 형질감염 또는 바이러스 감염과 같은 방법으로 유전자를 조직 배양물의 세포에 전달하는 것을 포함한다. 일반적으로, 전달 방법은 세포에 선별 마커의 전달을 포함한다. 이후 세포를 전달시킨 유전자를 받아들이고 발현하는 세포를 분리하기 위하여 선별 조건 하에 둔다. 이러한 세포를 이후 환자에게 전달한다.

[0160] 상기 실시태양에서, 핵산은 생성되는 재조합 세포를 생체 내로 투여하기 전에 세포에 도입된다. 상기 도입은 형질감염, 전기천공, 미세주입, 핵산 서열을 포함하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터를 이용한 감염, 세포 융합, 염색체 매개 유전자 전달, 미세세포 매개 유전자 전달, 스페로플라스트 (spheroplast) 융합 등을 포함하고 이로 제한되지 않는, 당업계에 공지된 임의의 방법으로 수행할 수 있다. 외부 유전자를 세포 내로 도입하기 위한 많은 기술이 당업계에 알려져 있으며 (예를 들어, Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985) 참고), 수여 세포의 필수적인 발생 및 생리학적 기능을 교란시키지 않는 경우에 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 이러한 기술은 핵산이 세포에 의해 발현가능하고, 바람직하게는 그의 세포 자손체에서 유전가능하며 발현가능하도록, 핵산의 세포로의 안정적인 전달을 제공하여야 한다.

[0161] 생성되는 재조합 세포는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 환자에게 전달할 수 있다. 재조합 혈액 세포 (예, 조혈 줄기 또는 전구 세포)는 바람직하게는 정맥 내로 투여된다. 이용되는 세포의 양은 원하는 효과, 환자 상태 등에 따라 결정되며, 당업자가 결정할 수 있다.

[0162] 유전자 요법을 위해 핵산이 도입될 수 있는 세포는 임의의 요구되는, 이용가능한 세포 유형을 포함하며, 상피 세포, 내피 세포, 각질 세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간 세포; 혈액 세포, 예를 들어 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거대핵세포, 과립구; 다양한 줄기 또는 전구 세포, 특히 예를 들어 골수, 제대혈, 말초혈, 태아 간 등에서 수득되는 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0163] 한 실시태양에서, 유전자 요법에 사용되는 세포는 환자의 자가 세포이다. 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 서열을 세포 또는 그의 자손체에서 발현가능하도록 세포 내로 도입한 다음, 재조합 세포를 치료 효과를 위해 생체

내로 투여한다. 특정 실시태양에서, 줄기 세포 또는 전구 세포를 사용한다. 시험관 내에서 단리하여 유지시킬 수 있는 임의의 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 본 발명의 실시태양에 따라 사용할 수 있다 (예를 들어 PCT 공개 WO 94/08598; Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); 및 Pittelkow and Scott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986) 참조).

[0164] siRNA에 의한 보체 경로 성분 발현의 조절

[0165] siRNA는 전통적인 길항제, 예를 들어 소분자 또는 항체의 효과가 보다 작을 수 있는 유전자 발현의 조절 연구에서 분석 도구로서 유용한 것으로 입증되었다 (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003)). 시험관 내에서 합성된, 21 내지 23개 뉴클레오티드 길이의 이중 가닥 RNA는 간접 RNA (iRNA)로서 작용하여 유전자 발현을 특이적으로 억제할 수 있다 (Fire A., Trends in Genetics 391; 806-810 (1999)). 상기 iRNA는 그의 표적 RNA의 분해를 매개함으로써 작용한다. iRNA는 30개 미만의 뉴클레오티드 길이로 존재하기 때문에, 세포의 항바이러스 방어 메카니즘을 촉발하지 않는다. 상기 메카니즘은 인터페론 생산, 및 숙주 세포 단백질 합성의 전반적인 중단을 포함한다. 실제로, siRNA는 합성한 후, DNA 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 상기 벡터는 형질감염되어 siRNA를 높은 수준으로 발현할 수 있다. 높은 수준의 siRNA 발현은 세포에서 생산되는 단백질의 양을 최저치로 만들거나 유의하게 감소시키기 위해 사용되고, 따라서 단백질의 과다발현이 암과 같은 질환에 연관되는 것으로 생각되는 실험에 유용하다. siRNA는 세포의 항원 생산을 제한하고 보체 캐스케이드의 활성화를 억제함으로써 기능하는, 보체 경로 단백질의 유용한 길항제이다.

[0166] 펩티드 모방체 및 소분자

[0167] 펩티드를 펩티드 모방체로 대체할 수 있음이 당업계의 보통의 기술자에게 공지되어 있다. 펩티드 모방체는 일반적으로 그의 향상된 생체이용성 및 단백질 분해 효소 공격의 상대적인 결여 때문에 펩티드보다 치료제로서 더 바람직하다. 본원에 개시된 보체 관련 펩티드의 구조를 모방하는 펩티드 모방체를 설계하기 위해 분자 모델링 기술을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 보체 경로 단백질의 구조 분석으로부터 얻은 데이터를 기초로 하여 확인될 수 있는 펩티드 모방체 및 다른 선도 (lead) 화합물을 제공한다. 잠재적인 인자 D 유사체는 도킹 (docking) 프로그램, 예를 들어 GRAM, DOCK, 또는 AUTODOCK을 사용한 컴퓨터 모델링을 이용하여 조사할 수 있다. 상기 과정은 잠재적인 인자 D 유사체의 컴퓨터 피팅 (fitting)을 포함할 수 있다. 또한, 컴퓨터 프로그램을 사용하여 유사체의 잠재적인 결합 부위에 대한 유인, 반발 (repulsion), 및 입체 방해 (steric hindrance)를 추정할 수 있다. 일반적으로, 보다 긴밀하게 맞을수록 (예를 들어, 입체 방해가 더 작고/작거나 유인력이 더 클수록) 잠재적인 약물의 효능이 더 클 것이고, 이것은 이들 특성이 보다 긴밀한 결합 상수와 일치하기 때문에. 또한, 잠재적인 약물의 설계시에 특이성이 클수록 약물이 발현 시스템의 다른 특성을 방해하지 않을 가능성이 더욱 클 것이다. 이것은 다른 단백질과의 원치 않는 상호작용에 의한 잠재적인 부작용을 최소화시킬 것이다.

[0168] 초기에, 잠재적인 인자 D 유사체는 예를 들어 재조합 박테리오파지에 의해 생산된 랜덤 펩티드 라이브러리 또는 화학물질 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다. 이러한 방식으로 선택된 유사체 리간드는 이어서 하나 이상의 유망한 잠재적인 리간드가 확인될 때까지 컴퓨터 모델링 프로그램에 의해 체계적으로 변형될 수 있다.

[0169] 상기 컴퓨터 모델링은 필수적으로 무작위적인 무한한 화학적 변형과는 달리 한정된 수의 합리적인 화학적 변형을 선택할 수 있도록 하고, 이중 어느 하나가 유용한 약물로 유도될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 3차원 구조 및 컴퓨터 모델링을 사용하여, 매우 많은 화합물이 신속하게 스크리닝되고, 인내를 요하는 수 없이 많은 화합물의 합성을 수행하지 않으면서 몇몇의 가능한 후보물질을 결정할 수 있다.

[0170] 잠재적인 인자 D 유사체가 확인된 후에, 유사체는 머크 (Merck), 글락소 웰컴 (Glaxo Wellcome), 브리스톨 마이어스 스쿼브 (Bristol Meyers Squib), 몬산토/셜 (Monsanto/Searle), 일라이 일리 (Eli Lilly), 노바티스 (Novartis) 및 파마시아 업존 (Pharmacia UpJohn)을 포함하는 대규모 화학회사로부터 상업적으로 입수가 가능한 화학물질의 라이브러리로부터 선택될 수 있거나, 또는 별법으로 잠재적인 리간드는 드 노보 (de novo) 합성된다. 상기한 바와 같이, 하나 또는 심지어 비교적 작은 군의 특정 화합물의 드 노보 합성이 약물 설계 기술 분야에서 합리적으로 수행된다.

[0171] 별법으로, 항-인자 D 항체의 가변 구역의 분자 구조를 기초로 하여, 항체의 결합 구역의 분자 구조를 모방하고 인자 D의 활성을 억제하는 소분자를 생성시키고 스크리닝하기 위해 분자 모델링 및 합리적인 분자 설계를 이용할 수 있다. 상기 소분자는 펩티드, 펩티드 모방체, 올리고뉴클레오티드, 또는 유기 화합물일 수 있다.

[0172] 실시예

- [0173] 습윤 AMD의 모델로서 레이저-유도된 맥락막 혈관신생 (CNV)에서 항체의 효능
- [0174] 항체의 안내 주사의 효능을 문헌 [Krzystolik MG et al., Arch Ophthalmol. 2002; 120: 338-346]에 설명된 바와 같이 레이저-손상 CNV 모델에서 시험할 수 있다. 상기 모델은 AMD의 예방 및/또는 개선을 위한 임의의 약물 후보의 효능을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 상기 레이저 유도된 CNV 모델은 원숭이 황반에서 CNV를 유도하기 위해 아르곤 그린 (argon green) 레이저를 사용한다. CNV 병변의 수와 유의한 혈관조영적 누출 사이에 우수한 상관관계가 존재한다.
- [0175] 연구의 2개의 기 (phase)가 존재한다: 1기 (예방기)는 대개 레이저 손상 2 내지 3주 후에 나타나는 CNV 형성을 억제하기 위해 CNV의 레이저 유도 전에 및 레이저에 노출 1주 후에 항체 치료의 개시를 포함한다. 2기 (치료기)는 CNV 병변이 1기로부터의 대조 눈에서 예상될 때 제42일 (레이저 손상 3주 후)에 개시된다. 2기는 기존의 CNV 병변의 정도 및 누출 약화에 대한 치료 효과를 평가한다.
- [0176] 10마리의 사이노몰거스 원숭이 (*Macaca fascicularis*)가 대개 상기한 종류의 연구에서 이용된다. 모든 과정에 대해 원숭이를 예를 들어, 염산케타민 (20 mg/kg); 말레산아세프로마진 (0.125 mg/kg); 및 황산아트로핀 (0.125 mg/kg)의 근육내 주사로 마취시킨다. 필요한 경우 5 내지 6 mg/kg 염산케타민의 보조 마취제를 투여할 수 있다. 또한, 0.5% 염산프로파라카인이 일반적으로 점안 마취에 사용된다. 정맥내 펜토바르비탈 나트륨 용액 (5 mg/kg)을 사용하는 보조 마취제를 안구적출 전에 투여할 수 있다. 실험 후 동물을 안락사시켰다.
- [0177] 항체 치료
- [0178] 시험할 항체는 생리학적 완충액 내에 예를 들어, 약 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 투여한다. 대조 눈에는 시험할 항체를 제외한 모든 성분으로 이루어진 비히클을 주사한다. 예를 들어 각각의 눈에 약 50 μl 의 항체 또는 비히클을, 점안 마취제 및 5% 포비돈 요오드 용액을 주입한 후 30-게이지 바늘 및 튜베르쿨린 주사기를 사용하여 각각의 눈에 평평부를 통해 안내 주사하였다. 항체를 바이알로부터 5- μm 필터를 통해 얻고, 안내 주사를 위해 새로운 (날카로운) 30-게이지 바늘을 사용한다. 주사 후, 살균성 안연고, 예를 들어 바시트라신을 원개 내에 주입한다. 주사 부위는 대개 공막에 대한 외상을 피하기 위해 변경시킨다.
- [0179] 1기에, 각각의 동물의 우안 또는 좌안을 예를 들어, 약 500 μg (각 눈당 50 μl)의 용량의 항체를 안내 주사하도록 무작위로 배정하고, 상기 눈을 예방 눈으로 칭한다. 사용된 용량은 상기 효능 연구 이전에 안전성 및 독성학 연구를 기초로, 또는 다른 임상학상 적절한 수단에 의해 결정할 수 있다. 다른 눈은 비히클을 안내 주사하도록 배정되고, 대조 눈으로 칭한다. 각 동물의 두 눈에는 대개 레이저 치료 전에 제0일 및 제14일에 시험할 항체 또는 비히클을 단독으로 2회 안내 주사한다. 제21일에, 모든 눈을 CNV 병변을 유도하도록 아르곤 그린 레이저 광응고 처리한다. 제28일 (레이저 유도 1주 후)에, 예방 눈에는 항체를 추가로 주사하고, 대조 눈은 비히클을 주사한다. 연구의 2기는 CNV가 발병하는 것으로 예상되는 제42일 또는 레이저 유도 3주 후에 시작한다. 제42일에 플루오레세인 혈관조영술 후, 각 동물의 두 눈에는 예를 들어 약 500 μg (각 눈당 50 μl) 용량의 항체를 안내 주사할 것이고, 이는 제56일에 반복된다.
- [0180] 실험적 CNV의 유도
- [0181] CNV 막은 슬릿램프 (slit-lamp) 및 피아노 (piano) 안저 콘택트렌즈를 사용하여 아르곤 그린 레이저 화상 (Coherent Argon Dye Laser 920; 코히어런트 메디칼 레이저 (Coherent Medical Laser), 미국 캘리포니아주 팔로 알토)을 이용하여 사이노몰거스 원숭이의 황반에서 유도된다. 9개의 병변은 마스크를 쓴 외과의에 의해 각각의 눈의 황반에 대칭으로 놓인다. 레이저 변수는 50 내지 100 μm 스폿 크기, 0.1초 지속시간, 및 350 내지 700 mW 범위의 전력을 포함한다. 사용된 전력은 선택된 전력 하에 수포 및 적은 출혈을 생성시키는 레이저의 능력에 의해 결정된다. 출혈이 인지되지 않으면, 동일한 레이저 과정에 따라 추가의 레이저 스폿이 제1 스폿에 인접하게 놓일 것이다. CNV의 정도 및 누출을 검출하고 측정하기 위해 색상 사진 및 플루오레세인 혈관조영술이 대개 사용된다. 그러나, 레이저-유도된 CNV 및 그의 연관된 효과를 측정할 수 있는 임의의 방법을 사용할 수 있다.
- [0182] 안과 검사
- [0183] 동물의 눈을 상대적 동공 구심운동 장애에 대해 검토한 후, 2.5% 염산페닐에프린 및 0.8% 트로피카미드로 확대시켰다. 두 눈을 슬릿램프 생체현미경 및 간접 검안경 (ophthalmoscopy)을 사용하여 0일, 14일, 28일, 42일 및 56일 (항체 주사 이전); 1일, 15일, 29일, 43일 및 57일 (주사 후); 21일 (레이저 전); 35일 및 49일 (중간일); 및 63일 (안구적출 및 치사)에 검사한다.

[0184] 색상 사진술 및 플루오레세인 혈관조영술

[0185] 안저 사진술은 대개 모든 동물에 대해 안과 검사와 동일한 날에 시행한다. 사진은 안저 카메라 (Canon Fundus CF-60Z; 캐논 유에스에이 인크. (Canon USA Inc, 미국 뉴욕주 레이크 석세스)) 및 35-mm 필름을 사용하여 찍을 수 있지만, 임의의 촬영 장치를 사용할 수 있다.

[0186] 플루오레세인 혈관조영술을 위해 이미지넷 (Imagenet) 디지털 혈관조영술 시스템 (Topcon 501 A and Imagenet system; 탑콘 아메리카 코퍼레이션 (Topcon America Corp, 미국 뉴저지주 파라무스))을 사용할 수 있다. 양쪽 눈의 레드-프리 (red-free) 사진을 대개 1 mL/s의 속도로 0.1 mL/kg 체중의 10% 나트륨 플루오레세인 (에이콘 인크. (Akorn Inc, 미국 루이지애나주 아비타 스프링스))을 사용하는 플루오레세인 혈관조영술 후에 얻는다. 플루오레세인 주사 후, 먼저 우안, 이어서 좌안의 후극부의 처음 1분에서 일련의 급속 영상을 얻는다. 추가의 쌍의 영상은 대개 약 1 내지 2분 및 5분에 얻는다. 2분 내지 5분에는, 중간주변 영역 (관자놀이 및 코)의 2개의 영상을 각 눈에서 얻는다. 플루오레세인 혈관조영술은 기저선 (0일) 및 7, 14, 29, 42, 49, 57 및 63일에 수행한다.

[0187] 안과 데이터의 분석

[0188] 사진 및 혈관조영사진을 혈관조영적 누출, 출혈, 또는 임의의 다른 이상의 증거에 대해 평가한다. 안저 출혈을 3개 미만의 원판 (disc) 영역을 포함하는 망막 출혈을 등급 1로 규정하고, 3 내지 6개의 원판 영역에서의 출혈을 등급 2로 규정하고, 6개 초과인 원판 영역의 출혈을 등급 3으로 규정하는 등급 시스템에 기초하여 등급을 나눈다. 출혈과 CNV 막 또는 레이저 유도 부위의 연관성을 또한 평가한다. 임상학상 유의한 출혈은 6개 원판 영역 이상의 임의의 안저 출혈로서 규정된다.

[0189] 눈 염증을 또한 슬릿램프 생체현미경을 사용하여 평가한다. 전실 및 유리체 세포를 2-mm 슬릿램프로 고배율에서 계수하고, 미국 안과 학회 (American Academy of Ophthalmology)의 방법을 이용하여 등급을 나눈다. 35일, 42일, 49일, 56일 및 63일에 수행한 플루오레세인 혈관조영사진을 만장일치로 등급을 나누는 대개 2명의 숙련된 검사자가 검토함으로써 CNV 병변의 등급을 분류한다. CNV 병변은 비교를 위해 표준화 혈관조영술을 이용하여 다음 방식에 따라 등급을 나눈다. 등급 1 병변은 과도한 형광이 없다. 등급 2 병변은 누출이 없이 과도한 형광을 나타낸다. 등급 3 병변은 초기 또는 중간-전이 영상에서 과도한 형광 및 후기 누출을 보인다. 등급 4 병변은 전이기에 밝은 과도한 형광 및 처리된 영역을 넘어선 후기 누출을 보인다. 등급 4 병변은 임상학상 유의한 것으로 규정된다.

[0190] 일반화 추정 방정식을 사용하는 집단-총계 패널 데이터 (Population-Aggregated Panel Data with Generalized Estimating Equations) 및 발생률비 (IRR)를 사용하여 통계 분석을 수행할 수 있다. 발생률은 보통 주어진 간격 동안 발생하는 등급 4 병변의 수를 유도된 병변의 총 수로 나눈 값으로 정의된다. 1기에, IRR은 대조 눈에서의 등급 4 병변의 발생률에 대한 예방 눈에서의 등급 4 병변의 발생률의 비를 나타낸다. IRR 1은 발생률 사이에 차이가 없음을 의미한다. 1보다 훨씬 작은 수는 예방군 대 대조군에서 등급 4 병변의 발생의 감소를 나타낼 것이다. 2기에, 대조 눈 대 치료 눈에서 등급 4 병변의 발생을 비교한다. 이는 먼저 대조군으로 지정되지만, 42일 및 56일에 항체를 사용하여 치료되고 치료 눈이 되는 눈의 세트에서 등급 4 병변의 발생을 시간 경과에 따라 비교함을 의미한다.

[0191] AMD의 치료에 유용한 약제의 스크리닝

[0192] 노인성 황반 변성 (AMD)의 연구 및 치료는 단백질 화학유인 단백질-1 (Ccl-2; 또한 MCP-1로도 알려짐) 또는 그의 동족체 (cognate)인 C-C 케모킨 수용체-2 (Ccr-2)가 결여된 마우스를 포함하는 새로운 동물 모델을 사용하여 달성할 수 있다 (Ambati, J. et al. Nat Med. 2003 Nov; 9(11):1390-7. Epub 2003 Oct 19). 상기 마우스는 망막 색소 상피 (RPE) 내의 리포푸신 및 RPE 아래의 결정체의 축적, 광수용체 위축 및 맥락막 혈관신생 (CNV)을 비롯한 AMD의 주요 특징을 나타낸다.

[0193] 바람직한 약제를 사용한 상기 마우스의 치료는 AMD를 치료하는데 있어서 그의 효능에 대한 상기 약제의 효능 평가를 허용한다.