



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0039550
(43) 공개일자 2008년05월07일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7010022(분할)

(22) 출원일자 2008년04월25일

심사청구일자 2008년04월25일

(62) 원출원 특허 10-2001-7014172

원출원일자 2001년11월06일

심사청구일자 2005년02월18일

번역문제출일자 2008년04월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/040018

국제출원일자 2000년05월04일

(87) 국제공개번호 WO 2000/67796

국제공개일자 2000년11월16일

(30) 우선권주장

60/133,018 1999년05월07일 미국(US)

60/139,621 1999년06월17일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

아이텍 파마슈티칼즈 인코포레이티드

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 칼란 로드
3030

(72) 발명자

커드, 존, 쥐.

미국 94010 캘리포니아주 힐즈보로우 리저브와 로
드 128

컨켈, 로리, 에이.

미국 94611 캘리포니아주 오클랜드 엑시터 درا이
브 7060

그릴로-로페즈, 안토니오, 제이.

미국 92067 캘리포니아주 란쇼 썬타페 비아 델 브
라보 17577

(74) 대리인

김영, 주성민

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질을 이용한 자가면역질환의 치료

(57) 요약

본 발명은 B 세포 표면 마커, 예컨대 CD19 또는 CD20에 결합하는 길항물질로 자가면역 질환을 치료하는 데 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질의 치료적 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물의 자가면역 질환의 치료 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 B 세포 표면 마커, 예컨대 CD19 또는 CD20에 결합하는 길항물질을 이용한 자가면역 질환의 치료에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 림프구는 조혈 과정 동안에 골수에서 생성되는 많은 유형의 백혈구 중의 하나이다. 2개의 큰 림프구 집단이 존재한다: B 림프구 (B 세포) 및 T 림프구 (T 세포). 본 발명에서 특히 관심의 대상이 되는 림프구는 B 세포이다.

<3> B 세포는 골수에서 성숙하고, 골수를 떠나면서 세포 표면에 항원 결합 항체를 발현한다. 비감작 B 세포는, 막 결합 항체가 특이적으로 작용하는 항원을 처음으로 만나게 되면 세포가 급속히 분열되기 시작하고, 그 자손이 기억 B 세포 및 "형질 세포"라 불리는 주효 세포(effector cell)로 분화된다. 기억 B 세포는 더욱 긴 수명을 갖고 있으며, 원래의 모세포와 동일한 특이성으로 막결합 항체를 계속 발현한다. 형질 세포는 막결합 항체를 생성하지 않고 분비될 수 있는 형태로 항체를 생성한다. 분비된 항체는 체액성 면역에서 중요한 주효인자 분자이다.

<4> CD20 항원 (또한, 인간 B-림프구-제한된 분화 항원이라 불림, Bp35)은 B 전구 림프구 및 성숙된 B 림프구 상에 위치한 약 35 kD의 분자량을 가진 소수성 경막 단백질이다 [Valentine 등, J.Biol.Chem. 264(19):11282-11287 (1989); 및 Einfeld 등, EMBO J. 7(3):711-717(1988)]. 이 항원은 또한 B 세포 비호지킨 림프종 (NHL)의 90% 이상에서 발현되지만 [Anderson 등, Blood 63(6):1424-1433(1984)], 조혈 간세포, B 전구 세포, 정상 형질 세포 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 [Tedder 등, J.Immunol. 135(2):973-979(1985)]. CD20은 세포 주기 개시 및 분화를 위한 활성화 과정에서 초기 단계(들)를 조절하며 [Tedder 등, 상동], 칼슘 이온 채널로 작용할 가능성도 있다 [Tedder 등, J.Cell.Biochem. 14D:195(1990)].

<5> B 세포 림프종에서 CD20의 발현이 일어난다면, 이 항원은 이러한 림프종의 "표적화"를 위한 후보로서 작용할 수 있다. 본질적으로, 이러한 표적화는 다음과 같이 일반화할 수 있다: B 세포의 CD20 표면 항원에 특이적인 항체를 환자에게 투여한다. 이러한 항-CD20 항체는 (표면상으로는) 정상 및 악성 B 세포 양쪽모두의 CD20 항원에 특이적으로 결합하며; CD20 표면 항원에 결합된 항체는 신생물 B 세포의 파괴 및 고갈을 이끌어 낼 수 있다. 추가로, 종양을 파괴하는 잠재력을 가진 화학 약품 또는 방사능 표지를 항-CD20 항체에 접합시켜 그 결과 이러한 약품이 신생물 B 세포에 특이적으로 "전달"되도록 할 수 있다. 어떤 방식을 택하든 주된 목표는 종양을 파괴하는 것이고, 구체적인 방식은 사용되는 특정한 항-CD20 항체에 따라 결정될 수 있으며, 따라서 CD20 항원을 표적화하는데 이용가능한 방식은 상당히 다양할 수 있다.

<6> CD19는 B 세포 계통의 세포 표면 상에서 발현되는 다른 항원이다. CD20과 유사하게, CD19는 간세포 단계로부터 형질 세포로의 마지막 분화 직전의 시점까지 이 계통의 분화 단계 전체에 걸쳐 세포 상에서 발견된다 [Nadler 등, Lymphocyte Typing II:2:3-37 및 Appendix, Renling 등, eds. (1986), Springer Verlag]. 그러나 CD20과는 달리, CD19에 결합하는 항체는 CD19 항원의 내입을 유발한다. CD19 항원은 여러 항체 중에서도 특히 HD237-CD19 항체 ("B4"항체라고도 불리운다)에 의해 확인된다 [Kiesel 등, Leukemia Research II, 12:1119 (1987)]. CD19 항원은 말초 혈액 단핵 세포의 4 ~ 8 %와, 말초 혈액, 비장, 림프절 또는 편도로부터 단리된 B 세포의 90 % 이상에 존재한다. CD19는 말초 혈액 T 세포, 단핵구 또는 과립구에서 검출되지 않는다. 사실상, 모든 비-T 세포 급성 림프아구성 백혈병(ALL), B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 B 세포 림프종은 항체 B4에 의해 검출가능한 CD19를 발현한다 [Nadler 등, J.Immunol. 131:244(1983); 및 Nadler 등, Progress in

Hematology Vol. XII pp.187-206, Brown, E. ed. (1981) Grune & Stratton, Inc].

<7> B 세포 계통의 세포에 의해 발현되는 분화단계 특이적 항원을 인식하는 추가의 항체들이 확인되었다. 이들 중에는, CD21 항원에 대항하는 B2 항체; CD22 항원에 대항하는 B3 항체; 및 CD10 항원에 대항하는 J5 항체 (CALLA라고도 불리운다)가 존재한다. 미국 특허 5,595,721호 (1997년 1월 21일 특허됨, Kaminski 등) 참조.

<8> 리텍시맵(rituximab) (RITUXAN^(R)) 항체는, CD20 항원에 대항하는, 유전공학적으로 가공된 키메라형 생쥐/인체 모노클로날 항체이다. 리텍시맵은 미국 특허 5,736,137호 (1998년 4월 7일 특허됨, Anderson 등)에서 "C2B8"로서 불리워진 항체이다. RITUXAN^(R)은 재발되거나 치료저항성인 저급 또는 소포성, CD20 양성 B 세포 비호지킨 림프종을 앓는 환자의 치료를 위해 처방된다. 시험관내 작용 메카니즘 연구 결과, RITUXAN^(R)이 인간 보체에 결합하여 보체 의존성 세포독작용(CDC)에 의해 림프계 B 세포주를 용해시킨다는 것이 밝혀졌다 [Reff 등, Blood 83(2):435-445 (1994)]. 추가로, RITUXAN^(R)은 항체 의존성 세포성 세포독작용(ADCC)에 대한 분석에서 상당한 활성을 보인다. 더욱 최근에, RITUXAN^(R)은 삼중수소로 표지된 티미딘 혼입 분석에서 항증식 효과를 갖고 있고, 직접적으로 세포고사를 유발하는 반면, 다른 항-CD19 및 CD20 항체는 그렇지 않은 것으로 밝혀졌다 (Maloney 등, Blood 88(10):637a (1996)). RITUXAN^(R)과 화학요법제 및 독소 간의 상승작용이 또한 실험적으로 관찰되었다. 특히, RITUXAN^(R)은 내약물성 인간 B 세포 림프종 세포주를 독소루비신, CDDP, VP-16, 디프테리아 독소 및 리신의 세포독성 효과에 민감하게 만든다 (Demidem 등, Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186 (1997)). 생체내 전임상 연구의 결과, RITUXAN^(R)이, 아마도 보체 및 세포 매개 과정을 통해, 게잡이원숭이의 말초 혈액, 림프절 및 골수로부터 B 세포를 고갈시킨다는 것이 밝혀졌다 [Reff 등, Blood 83(2):435-445 (1994)].

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명의 목적은 B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질을 이용하여 포유동물의 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<10> 발명의 요약

<11> 첫번째 측면에서, 본 발명은, B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질의 치료적 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물의 자가면역 질환의 치료 방법을 제공한다.

<12> 또 다른 측면에서, 본 발명은 용기 및 그 안에 함유된 조성물을 포함하고, 이 조성물이 B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질을 포함하며, 또한 자가면역 질환에 걸렸거나 그 소인을 가진 환자를 치료하는 것을 조성물의 이용자에게 지시하는 포장 삽입물을 더 포함하는 제품에 관한 것이다.

<13> 바람직한 구현양태의 상세한 설명

<14> I. 정의

<15> 본 명세서에서 "B 세포 표면 마커"란, B 세포 표면에 결합하는 길항물질로 표적화될 수 있는, B 세포의 표면에 발현되는 항원을 말한다. B 세포 표면 마커의 예는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 및 CD86 백혈구 표면 마커를 포함한다. 특히 중요한 B 세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B 세포 조직에 비해 B 세포 상에서 우선적으로 발현되며, 전구체 B 세포 및 성숙한 B 세포 양쪽 모두에서 발현될 수도 있다. 하나의 구현양태에서, 마커는 간세포 단계로부터 형질 세포로의 마지막 분화 직전의 시점까지 이 계통의 분화 단계 전체에 걸쳐 B 세포 상에서 발견되는 CD20 또는 CD19와 같은 것이다. 본원에서 바람직한 B 세포 표면 마커는 CD19 및 CD20이다.

<16> "CD20" 항원은 말초 혈액 또는 림프계 기관에서 보이는 B 세포 중 90 % 이상의 표면상에서 발견되는 ~35 kDa, 비글리코실화 인단백질이다. CD20은 초기 B 전구 세포 발달시에 발현되며, 형질 세포 분화시까지 유지된다.

CD20은 악성 B 세포뿐 아니라 정상 B 세포 상에도 존재한다. 문헌에서 CD20에 대한 다른 명칭은 "B-림프구-제한된 항원" 및 "Bp35"이다, CD20 항원은 예를 들어 문헌 [Clark 등, PNAS (USA) 82:1766 (1985)]에 기재되어 있다.

<17> "CD19"항원은 예를 들어 HD237-CD19 또는 B4 항체 [Kiesel 등, Leukemia Research II, 12:1119(1987)]에 의해 확인되는 ~90 kDa 항원을 말한다. CD20과 유사하게, CD19는 간세포 단계로부터 형질 세포로의 마지막 분화 직전의 시점까지 이 계통의 분화단계 전체에 걸쳐 세포 상에서 발견된다. CD19에 대한 길항물질의 결합은 CD19 항원의 내입을 유발할 수도 있다.

<18> 본 명세서에서 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직 때문에 발생하고 그 조직을 상대로 하는 비악성 질병 또는 장애이다. 본 명세서에서 논하는 자가면역 질환은 구체적으로 악성 또는 암성 질병 또는 상태를 제외한 것이며, 특히 B 세포 림프종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 모상 세포 백혈병 및 만성 골수아구성 백혈병을 제외한다. 자가면역 질병 또는 장애의 예는, 건선 및 피부염(예, 아토피성 피부염)을 포함한 염증성 피부 질환; 전신성 경피증 및 경화증; 염증성 장 질환과 연관된 반응 (예컨대, 크론병 및 궤양성 대장염); 호흡곤란증 (성인 호흡곤란증; ARDS 포함); 피부염; 뇌막염; 뇌염; 포도막염; 결장염; 사구체신염; 알레르기 질환, 예컨대 습진, 천식 및 T 세포의 침윤과 관련된 다른 상태 및 만성 염증성 반응; 아테롬성동맥경화증; 백혈구 유착 결핍; 류머티스 관절염; 전신 홍반성루푸스(SLE); 진성 당뇨병 (예, 제I형 진성 당뇨병 또는 인슐린 의존성 진성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노 증후군; 자가면역 갑상선염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌(Sjogren) 증후군; 연소성 당뇨병; 및 결핵, 유육종증, 다발성근염, 육아종증 및 맥관염에서 전형적으로 발견되는 사이토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연된 과민증과 연관된 면역 반응; 악성 빈혈 (아디슨 증후군); 백혈구 누출과 연관된 질병; 중추 신경계(CNS) 염증성 장애; 다기관 상해 증후군; 용혈성 빈혈 (한성 글로불린혈증 또는 콕스(Coombs) 양성 빈혈증을 포함하지만, 이에 한정되지 않음); 중증 근무력증; 항원-항체 복합체 매개 질병; 항사구체 기저막 질병; 항인지질 증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브스(Graves')병; 램버트-이튼(Lambert-Eaton) 근무력증; 유전포창; 천포창; 자가면역 다내분비질환; 라이터(Reiter's)병; 강직인간(stiff-man) 증후군; 베체트(Behcet)병; 거대 세포 동맥염; 면역 복합체 신염; IgA 신장병증; IgM 다신경병증; 면역 혈소판감소성 자반병(ITP) 또는 자가면역 혈소판감소증 등을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

<19> "길항물질"은, B 세포 표면 마커에 결합시에, 포유동물에서 B 세포를 파괴 또는 고갈시키고(시키거나) 예를 들어 B 세포에 의해 유발되는 체액성 반응을 감소 또는 방지함으로써 한 가지 이상의 B 세포 기능을 방해하는 분자이다. 길항물질은 바람직하게는 그것으로 처리된 포유동물에서 B 세포를 고갈시킬 수 있다 (다시 말해서, 순환하는 B 세포의 함량을 저하시킬 수 있다). 이러한 고갈은 항체 의존성 세포 매개 세포독작용 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독작용(CDC), B 세포 증식의 억제 및/또는 B 세포 사멸의 유도(예를 들어, 세포괴사)와 같은 여러 메커니즘을 거쳐 달성될 수 있다. 본 발명의 범위에 포함된 길항물질은, B 세포 마커에 결합하고 임의로 세포독성 물질에 접합되거나 융합된, 항체, 합성 또는 천연 서열 펩티드 및 소분자 길항물질을 포함한다. 바람직한 길항물질은 항체를 포함한다.

<20> "항체 의존성 세포 매개 세포독작용" 및 "ADCC"란, Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예, 내츄럴 킬러(Natural Killer) (NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 유발하는 세포 매개 반응을 말한다. ADCC를 매개하는 주된 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포상에서 이루어지는 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991)]의 464면에서 표 3에 요약되어 있다. 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 5,500,362호 또는 5,821,337호에 기재된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수도 있다. 이러한 분석에 유용한 주요 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 내츄럴 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes 등, PNAS(USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같이 동물 모델에서 생체내 평가될 수도 있다.

<21> "인간 주요 세포"는 하나 이상의 FcR를 발현하고 주요인자 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게, 이 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 주요인자 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 내츄럴 킬러(NK)세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하며; PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다.

<22> 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은, 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 것(감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ

RII 및 Fc γ RIII 소부류에 속하는 수용체와 이런 수용체들의 대립형질 변이체 및 스플라이싱이 다르게 된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")를 포함하며, 이들은 주로 세포질내 도메인에서 차이가 있는 서로 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 세포질내 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 세포질내 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프(ITIM)를 함유한다 [참조, Daeron, Annu.Rev.Immunol. 15:203-234 (1997)]. FcR들은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu.Rev.Immunol 9:457-92 (1991); Capel 등, Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas 등, J.Lab.Clin.Med. 126:330-41 (1995)]에서 고찰한 바 있다. 앞으로 확인될 FcR들을 포함한 다른 FcR들도 본 명세서에서 사용된 용어 "FcR"에 포함된다. 또한, 이 용어는 모체 IgG를 태아에 전달하는 역할을 하는 신생아기 수용체 FcRn도 포함한다 [Guyer 등, J.Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim 등, J.Immunol. 24:249 (1994)].

- <23> "보체 의존성 세포독작용" 또는 "CDC"란 보체의 존재하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 말한다. 보체 활성화 경로는 보체계의 첫번째 성분 (C1q)이 동종 항원과 복합체를 이룬 분자 (예, 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro 등, J.Immunol.Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.
- <24> "성장 억제" 길항물질은, 그 길항물질이 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지하거나 감소시키는 것이다. 예를 들면, 길항물질은 시험관내 및/또는 생체내에서 B 세포의 증식을 막거나 감소시킬 수 있다.
- <25> "세포고사를 유도하는" 길항물질은, 표준 세포고사 분석, 예컨대 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막소포 (세포고사체라고 불리움)의 형성에 의해 판정할 때, B 세포 등의 계획된 세포 사멸을 유도하는 길항물질이다.
- <26> 본 명세서에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용된 것이며, 구체적으로 손상되지 않은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 둘 이상의 손상되지 않은 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면 항체 단편까지를 포함한다.
- <27> "항체 단편"은 손상되지 않은 항체의 일부, 바람직하게는 항원 결합 영역 또는 가변부를 포함하는 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 다이아바디(diabodies); 선형 항체; 단일사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- <28> "천연 항체"는 통상 2개의 동일한 경쇄(L)와 2개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 여러 가지 면역글로불린 아이소타입의 중쇄들 간에는 디설파이드 결합의 수에 차이가 있다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적인 간격을 두고 사슬내 디설파이드 다리결합을 갖는다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_H)에 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에는 가변 도메인(V_L), 그리고 다른 말단에는 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫번째 불변 도메인과 나란히 정렬되고; 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 나란히 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄 가변 도메인들 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다.
- <29> 용어 "가변"이란, 가변 도메인의 특정한 부위가 항체들 간에 서열이 광범위하게 다르고, 이들 부위가 고유의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 말하는 것이다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포되어 있지 않다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 양쪽 모두에서 고도가변부라 불리우는 3개의 구역에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보존이 더 많이 되는 부위는 프레임워크 영역 (FR)이라 불리운다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 각각 4개의 FR을 포함하고, 이들 FR은 대부분 β -시트 배위를 가지며 3개의 고도가변부에 의해 연결되고, 이들 고도가변부는, β -시트 구조를 연결하면서 때로는 그 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 사슬에서 고도가변부는 FR에 의해 밀접하게 뭉쳐져 있고, 다른 사슬의 고도가변부와 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 [참조; Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는 데 직접적으로 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포성 세포독작용(ADCC)에 대한 항체의 참여와 같은 다양한 주요인자 기능을 나타낸다.
- <30> 항체를 과파인으로 소화시키면, 각각 하나의 항원 결합 부위를 갖는, "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편 및 잔류 "Fc" 단편 (이것의 명칭은 쉽게 결정화될 수 있다는 점을 반영한 것이다)을 생성한다. 펩신

처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다.

- <31> "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 이 영역은 단단히 비공유 결합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 각각의 가변 도메인의 3개의 고도가변부가 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 형성시키는 것은 이 배위형태일 때이다. 집합적으로, 6개의 고도가변부가 항원 결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 심지어 단 하나의 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 단지 3개의 고도가변부를 포함하는 Fv의 1/2)이라도, 비록 전체 결합 부위에 비해 친화력이 낮기는 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖고 있다.
- <32> Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫번째 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 항체 경첩부에 있던 하나 이상의 시스테인을 포함하여 몇 개의 잔기가 첨가되었다는 점에서 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 하나 이상의 자유 티올기를 포함하고 있는 Fab'를 일컫는 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편들은 본래는 그들 사이에 경첩 시스테인을 갖는 한쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학 결합도 또한 공지되어 있다.
- <33> 척추동물 중에서 얻은 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는, 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 불리우는 2개의 명백히 구별되는 유형 중의 하나로 배정될 수 있다.
- <34> 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 항체들은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 손상되지 않은 항체는 5개의 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 나누어지며, 이들의 일부는 다시 소부류 (아이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 나뉠 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 이라 불리운다. 여러 면역글로불린 부류의 서브유닛 구조 및 3차원 배위가 공지되어 있다.
- <35> "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 이들 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하며, 이 링커는 scFv가 항원 결합을 위해 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 한다. scFv에 대한 검토는 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)]를 참조한다.
- <36> 용어 "다이아바디"란 2개의 항원 결합 부위를 가진 작은 항체 단편을 말하는 것이고, 이때 상기 단편들에서는 중쇄 가변 도메인(V_H)이 동일한 폴리펩티드 사슬(V_H-V_L) 내에서 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결되어 있다. 동일한 사슬에 있는 2개의 도메인이 쌍을 이룰 수 있도록 하기에는 길이가 짧은 링커를 사용함으로써, 각 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 이룰 수밖에 없고 그리하여 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 다이아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 충분히 설명되어 있다.
- <37> 본 명세서에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 말하는 것이며, 균질한 항체 집단이란 다시 말해서 집단을 이루는 각각의 항체들이 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 서로 동일하다는 것이다. 모노클로날 항체는 특이성이 높고, 단일 항원성 부위에 대항하여 유도된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체들을 포함하는 종래의 (폴리클로날) 항체와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일의 결정인자에 대항하여 유도된다. 이들의 특이성 이외에도 추가로, 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 장점을 갖고 있다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 특징을 나타내는 것이며, 특정한 방법에 의한 항체의 생산이 요구되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler 등, Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들어질 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 4,816,567호 참조)에 의해 만들어질 수도 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson 등, Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks 등, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.
- <38> 본 명세서에서 모노클로날 항체는 구체적으로, 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래된 항체 또는 특정한 항체 부류 또는 소부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 그에 상동성이고, 반면 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 다른 항체 부류 또는 소

부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 그와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린)뿐 아니라 이러한 항체의 단편까지를 포함한다 (미국 특허 4,816,567호, Morrison 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). 본 명세서에서 주요한 키메라 항체는 비인간 영장류 (예를 들어, 비비 원숭이, 붉은털 원숭이 또는 계잡이원숭이와 같은 구세계 원숭이)로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변부 서열 (미국 특허 5,693,780)을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

<39> 비인간 (예, 생쥐) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 인간화된 항체는 대부분 수용자의 고도가변부에 있는 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 가진 생쥐, 쥐, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종의 고도가변부 (공여자 항체)에 있는 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변이는 항체 성능을 더욱 개선시키기 위해 행해진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 여기에서 고도가변 루프의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, FR의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열에 상응한다. 또한, 인간화된 항체는 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변부 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변부를 포함한다. 이에 대한 더욱 상세한 사항은 문헌 [Jones 등, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr.Op.Struct.Biol. 2:593-596(1992)]을 참조한다.

<40> 용어 "고도가변부"는 본 명세서에서 사용될 때 항체에서 항원 결합을 담당하는 아미노산 잔기를 일컫는 것이다. 고도가변부는 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인에 있는 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에 있는 잔기 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) 및/또는 "고도가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어 경쇄 가변 도메인에 있는 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에 있는 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia and Lesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에서 정의된 고도가변부 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

<41> 주목 대상 항원, 예를 들어 B 세포 표면 마커에 "결합하는" 길항물질은, 길항물질이 그 항원을 발현하는 세포를 표적화하기 위한 치료제로서 유용할 수 있도록 충분한 친화력 및/또는 결합능으로 그 항원에 결합할 수 있는 것이다.

<42> CD20 항원에 결합하는 항체의 예로는, 현재 "리텍시맵" ("RITUXAN^(R)")이라고 불리우는 "C2B8" (미국 특허 5,736,137호, 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); "Y2B8"로 명명된 이트림-[90]-표지된 2B8 생쥐 항체 (미국 특허 5,736,137호, 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); 경우에 따라 ¹³¹I로 표지되어 "¹³¹I-B1" 항체를 생성하는 생쥐 IgG2a "B1" (BEXXARTM) (미국 특허 5,595,721호, 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); 생쥐 모노클로날 항체 "1F5" (Press 등, Blood 69(2):584-591 (1987)); "키메라 2H7" 항체 (미국 특허 5,677,180호, 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); 및 국제 백혈구 유형화 워크샵(International Leukocyte Typing Workshop) (Valentine 등, Leukocyte Typing III (McMichael, Ed, p.440, Oxford University Press (1987))로부터 입수 가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2가 포함된다.

<43> CD19 항원에 결합하는 항체의 예는 문헌 [Hekman 등, Cancer Immunol. Immunother. 32:364-372 (1991)] 및 [Vlasveld 등, Cancer Immunol. Immunother. 40:37-47 (1995)]에 기재된 항-CD19 항체 및 문헌 [Kiesel 등, Leukemia Research II, 12:1119(1987)]에 기재된 B4 항체를 포함한다.

<44> 본 명세서에서 용어 "리텍시맵" 또는 "RITUXAN^(R)"이란, CD20 항원에 대항하는 유전공학적으로 가공된 키메라형 생쥐/인체 모노클로날 항체를 말하는 것이고, 본 명세서에서 참고문헌으로 인용된 미국 특허 5,736,137호에서 "C2B8"로 명명되어 있다. 이 항체는 생쥐의 경쇄 및 중쇄 가변부 서열 및 인간 불변부 서열을 함유하는 IgG₁ 카파 면역글로불린이다. CD20 항원에 대한 리텍시맵의 결합 친화도는 약 8.0 nM이다.

<45> "단리된" 길항물질이란, 확인되고, 자연 환경의 성분으로부터 분리 및/또는 회수된 길항물질을 말한다. 자연 환경의 오염 성분은 길항물질의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수도 있다. 바람직한 구현양태에서는, 길항물질을 (1) 로우리법에 의해 판정시에

길항 물질이 95 중량% 이상, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상이 되도록, (2) 회전 컵 배열결정장치의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용한 환원 또는 비환원 조건하 SDS-PAGE에 의할 때 균질할 정도로 정제한다. 단리된 길항물질은, 길항물질의 자연 환경의 성분 중 적어도 하나라도 존재하지 않을 것이므로, 재조합 세포내에 있는 상태 그대로의 길항물질을 포함한다. 그러나 통상적으로, 단리된 길항물질은 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

<46> 치료 목적을 위한 "포유 동물"이란, 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 경주용 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 포함한 포유동물로서 분류되는 동물을 일컫는 것이다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

<47> "치료"란 치료적 처리 및 예방 또는 방지 수단을 모두 일컫는 것이다. 치료가 요구되는 대상은, 이미 질병 또는 장애를 갖고 있는 대상 뿐만 아니라 질병 또는 장애를 예방하는 것이 필요한 대상을 포함한다. 따라서, 포유동물은 질병 또는 장애를 갖는 것으로 진단될 수도 있거나 또는 쉽게 질병에 걸리거나 질병에 대한 감수성이 있는 것일 수도 있다.

<48> 표현 "치료적 유효량"이란 문제의 자가면역 질환을 예방, 경감 또는 치료하기에 효과적인 길항물질의 양을 말하는 것이다.

<49> 본 명세서에서 보조 요법을 위해 사용된 용어 "면역억제제"는 치료하고자 하는 포유동물의 면역 체계를 억제하거나 차폐시키는 작용을 하는 물질을 말한다. 이것은 사이토킨 생성을 억제하고, 자가 항원 발현을 낮게 조절하거나 억제하고, 또는 MHC 항원을 차폐하는 물질을 포함한다. 이러한 약제의 예는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 (미국 특허 4,665,077호, 그의 개시내용은 본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다); 아자티오프린; 시클로포스파미드; 브로모크립틴; 다나졸; 답손; 글루타르알데히드 (이는 미국 특허 4,120,649호에 기재된 바와 같이 MHC 항원을 차폐한다); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린A; 당코르티코스테로이드와 같은 스테로이드, 예를 들어 프레드니손, 메틸프레드니솔론 및 텍사메타손; 항-인터페론- γ , $-\beta$ 또는 $-\alpha$ 항체, 항-종양 괴사 인자- α 항체, 항-종양 괴사 인자- β 항체, 항-인터류킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체를 포함한 사이토킨 또는 사이토킨 수용체 길항물질; 항-CD11a 및 항-CD18 항체를 포함한 항-LFA-1 항체; 항-L3T4 항체; 이중 항-립스구 글로불린; 팬(pan)-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (WO90/08187, 1990년 7월 26일 공고); 스트렙토키나아제; TGF- β ; 스트렙토도르나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 테옥시스페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (Cohen 등, 미국 특허 5,114,721호); T-세포 수용체 단편 (Offner 등, Science, 251:430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, Nature, 341:482 (1989) 및 WO91/01133); 및 T10B9와 같은 T 세포 수용체 항체 (EP 340,109)를 포함한다.

<50> 본 명세서에서 사용된 용어 "세포독성 물질"이란 세포의 기능을 억제 또는 방지하고(하거나) 세포의 파괴를 유발하는 물질을 말한다. 이 용어는 방사능 동위원소 (예, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사능 동위원소), 화학요법제, 및 소분자(small molecule) 독소 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소적 활성 독소 또는 그의 단편과 같은 독소를 포함하는 것으로 이해된다.

<51> "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학물질이다. 화학요법제의 예는 티오테파 및 시클로포스파미드 (CYTOXANTM)와 같은 알킬화제; 부술판, 임프로술판 및 피포술판과 같은 알킬 술포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포로아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함한 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라머스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 히드로클로라이드, 멜파란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니머스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 니트로겐 머스타드; 카르머스틴, 클로로조토신, 포테머스틴, 로머스틴, 니머스틴, 라니머스틴과 같은 니트로소우레아; 아클라시노마이신, 액티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 펠로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신과 같은 항생물질; 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5FU)과 같은 항-대사산물; 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메토크세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-메르캅토프린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈,

아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시폴리리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토테인, 트릴로스탄과 같은 항-아드레날; 프로린산과 같은 염산 인공주입제; 아세글락톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 테포파민; 데메콜린; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 아토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티안; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 펜나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK^(R); 라죽산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2'2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노머스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (TAXOL^(R)), 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology)(미국 뉴저지주 프린스턴) 및 독세탁셀 (TAXOTERE^(R)), 롱-뵈랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer) (프랑스, 앙토니)); 클로람부실; 켄시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토프린; 메토평렉세이트; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토프시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐브린; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로르니틴 (DMFO); 레티논산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 이들의 제약학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다. 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예컨대 타목시펜, 팔록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜 (Fareston)을 포함한 항에스트로겐; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린과 같은 항안드로겐; 및 이들의 제약학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체도 또한 이러한 정의에 포함된다.

<52> 용어 "사이토킨"은, 세포간 매개물질로서 다른 세포 상에 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반명이다. 이러한 사이토킨의 예는 림포킨, 모노킨 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토킨 중에는, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 파라티로이드 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체 형성 호르몬(LH); 간세포 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반성 락토젠; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 필러제-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-결합 펩티드; 인히빈; 액티빈; 맥관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF- β ; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGFs), 예컨대 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론- α , - β 및 - γ ; 콜로니 자극 인자 (CSFs), 예컨대 대식구-CSF (M-CSF); 과립구-대식구-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (ILs), 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함한 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본 명세서에 사용된 용어 사이토킨은 천연 원천으로부터 또는 재조합 세포 배양액으로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 균등물을 포함한다.

<53> 본 출원에서 사용된 용어 "약물 전구체"는, 모약물에 비해 종양 세포에 대한 세포독성이 적고, 더욱 활성인 모체 형태로 효소적으로 활성화되거나 전환될 수 있는, 제약학적 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 말하는 것이다. 참조, 예를 들어 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382. 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella 등, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt 등, (ed.), pp.247-267, Humana Press (1985)]. 본 발명의 약물 전구체는, 더욱 활성인 세포독성 자유 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트 함유 약물 전구체, 티오포스페이트 함유 약물 전구체, 설페이트 함유 약물 전구체, 펩티드 함유 약물 전구체, D-아미노산 변형 약물 전구체, 글리코실화 약물 전구체, β -락탐 함유 약물 전구체, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드 함유 약물 전구체 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드 함유 약물 전구체, 5-플루오로시토신 및 기타 5-플루오로우리딘 약물 전구체를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용하기 위한 약물 전구체 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<54> "리포솜"은 포유동물에 약물 (예컨대, 본 명세서에 개시된 길항물질 및 임의로 화학요법제)을 전달하기에 유용한 지질, 인지질 및/또는 계면활성제의 여러 유형으로 구성된 소포이다. 리포솜의 성분들은 통상 생물학적 막

의 지질 배열과 유사한 2층 형성으로 배열된다.

<55> 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 시판 포장에 상업용으로 포함되는 지시사항을 일컫는 것이며, 지시, 용법, 용량, 투여, 금기사항, 및/또는 치료 제품의 사용에 관한 경고에 대한 정보를 포함하고 있다.

<56> II. 길항물질의 제조

<57> 본 발명의 제조 방법 및 제품은 B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질을 사용하거나 이를 포함한다. 따라서, 이러한 길항물질의 생성 방법을 여기에서 설명할 것이다.

<58> 길항물질(들)을 제조하거나 선별하기 위해 사용되는 B 세포 표면 마커는 예를 들어 원하는 에피토프를 함유하는 항원의 가용성 형태 또는 그의 일부일 수도 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 그의 세포 표면에서 B 세포 표면 마커를 발현하는 세포들을 사용하여 길항물질(들)을 발생시키거나 선별할 수 있다. 길항물질을 생성하기 위해 유용한 B 세포 표면 마커의 다른 형태도 당업자에게 명백하다. 바람직하게는, B 세포 표면 마커는 CD19 또는 CD20 항원이다.

<59> 바람직한 길항물질은 항체인긴 하지만, 항체 이외의 길항물질들도 본 발명에서 의도된다. 예를 들면, 길항물질은 세포독성 물질 (예를 들면 본 명세서에 기재된 것과 같은 세포독성 물질)에 임의로 융합되거나 이와 접합된 소분자 길항물질을 포함할 수도 있다. 소분자의 라이브러리를 당해 B 세포 표면 마커에 대해 스크리닝하여 그 항원에 결합하는 소분자를 동정할 수도 있다. 나아가 소분자를 그의 길항 특성에 대해 스크리닝하고(하거나) 세포독성 물질과 접합시킬 수도 있다.

<60> 길항물질은 합리적인 설계 또는 파아지 디스플레이에 의해 발생된 펩티드일 수도 있다 (예를 들어 1998년 8월 13일 공고된 W098/35036호 참조). 하나의 구현양태에서, 선택된 분자는 항체의 CDR를 기초로 하여 설계된 "CDR 모사체" 또는 항체 유사체일 수도 있다. 이러한 펩티드들은 그 스스로 길항물질일 수도 있으나, 펩티드의 길항 특성을 추가하거나 증진시키기 위하여 펩티드를 세포독성 물질에 임의로 융합시킬 수도 있다.

<61> 다음은 본 발명에 따라 사용되는 항체 길항물질의 제조를 위한 일례의 기술에 관한 설명이다.

<62> (i) 폴리클로날 항체

<63> 관련된 항원 및 면역보강제를 다수 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사함으로써 동물 내에서 폴리클로날 항체가 바람직하게 증가된다. 이작용성 또는 유도체화 약제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신 안히드라이드, SOCl_2 , 또는 $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}$ (여기에서, R 및 R'은 상이한 알킬기이다)를 사용하여, 관련된 항원을 면역화시키고자 하는 중에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림페트 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제에 접합시키는 것이 유용할 수도 있다.

<64> 예를 들어 (각각 토끼 또는 생쥐에 대하여) $100\mu\text{g}$ 또는 $5\mu\text{g}$ 의 단백질 또는 접합체를 3 부피의 프로인트 완전 보조액과 결합시키고, 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써 동물을 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1 개월 후에, 프로인트 완전 보조액 중의 펩티드 또는 접합체를 원래의 양의 1/5 내지 1/10의 양으로 사용하여 여러 부위에서 피하 주사함으로써 동물을 추가면역시킨다. 7 내지 14일 후에, 동물을 사형시키고 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 역가가 정제기에 들때까지 동물을 추가면역시킨다. 동물을, 상이한 단백질에 접합되고(되거나) 상이한 가교 시약을 통해 접합된, 동일한 항원의 접합체로 추가면역시키는 것이 바람직하다. 접합체는 또한 단백질 융합으로서 재조합 세포 배양액중에서 형성될 수 있다. 또한, 알BUM과 같은 응집제를 사용하여 면역 반응을 증진시키는 것이 적절하다.

<65> (ii) 모노클로날 항체

<66> 실질적으로 균질한 항체의 집단, 다시 말해서 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이를 제외하고는 집단을 구성하는 각각의 항체들이 서로 동일한 집단으로부터 모노클로날 항체가 수득된다. 즉, 수식어 "모노클로날"이란, 항체의 특성이 별개의 항체들의 혼합물이 아님을 나타내는 것이다.

<67> 예를 들면, 모노클로날 항체는, 문헌 [Kohler 등, Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 형성될 수 있고, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567호)에 의해 형성될 수도 있다.

<68> 하이브리도마 방법에서, 생쥐 또는 햄스터와 같은 기타 적절한 숙주 동물을 상기 기재된 바와 같이 면역화하여, 면역화를 위해 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를

유발시킨다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화할 수도 있다. 이어서, 림프구를 적절한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)].

- <69> 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 접종하고, 바람직하게는 융합되지 않은 친주 골수종 세포의 생육 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적절한 배양 배지에서 생육시킨다. 예를 들면, 친주 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)를 갖고 있지 않다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 HGPRT-결여 세포의 생육을 막는 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이다 (HAT 배지),
- <70> 바람직한 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의하여 항체의 안정한 고 수준 생성을 지탱하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 세포이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 생쥐 골수종 세포주, 예를 들어 셀크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) (미국 캘리포니아 샌디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 생쥐 종양으로부터 유래된 것, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (미국 매릴랜드 락빌)로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X-63-Ag8-653 세포이다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위하여 인간 골수종 및 생쥐-인간 이종골수종 세포주가 또한 기재되어 있다 [Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].
- <71> 항원에 대항하여 유도된 모노클로날 항체의 생성을 위하여, 하이브리도마 세포가 생육하는 배양액 배지를 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침강법에 의해 또는 시험관내 결합 분석, 예컨대 방사능면역분석시험 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡수 측정법 (ELISA)에 의해 결정된다.
- <72> 모노클로날 항체의 결합 친화력은 예를 들면 문헌 [Munson 등, Anal.Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐트차드 분석에 의해 결정될 수 있다.
- <73> 원하는 특이성, 친화력 및/또는 활성을 갖는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 동정한 후에, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 생육시킬 수 있다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]. 이러한 목적을 위해 적절한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물내에서 복수 종양으로서 생체내에서 생육시킬 수도 있다.
- <74> 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체를, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록시라파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 면역글로불린 정제 절차에 의하여, 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절히 분리한다.
- <75> 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 종래의 절차를 사용하여 (예를 들면, 생쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 쉽게 단리 및 서열결정된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 제공원으로 사용된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터내에 위치시킨 다음, 이것을 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 이.콜리 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포내로 이입시켜, 재조합 숙주 세포내에서 모노클로날 항체의 합성을 수득할 수 있다. 세균내에서 항체를 암호화하는 DNA의 재조합 발현에 관한 검토 논문은 문헌 [Skerra 등, Curr.Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)]을 포함한다.
- <76> 추가의 구현양태에서, 문헌 [McCafferty 등, Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 제조된 항체 파아지 라이브러리로부터 항체 또는 항체 단편을 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson 등, Nature, 352:624-628 (1991)] 및 문헌 [Marks 등, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)]은 각각 파아지 라이브러리를 사용한 생쥐 및 인간 항체의 단리를 기재하고 있다. 이후의 문헌들은 매우 큰 파아지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서, 콤비네이토리얼 감염 및 생체내 재조합 뿐만 아니라 사슬 셔플링(chain shuffling) [Marks 등, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]에 의한 고친화력 (nM 범위) 인간 항체의 생성을 설명하고 있다 [Waterhouse 등, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266 (1993)]. 따라서, 이러한 기술들은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안법이다.
- <77> 예를 들면, 동종 생쥐 서열 대신에 인간의 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 암호화 서열을 치환함으로써 (미국

특허 4,816,567호; Morrison 등, Proc.Natl.Acad.Sci USA, 81:6851 (1984)), 또는 비면역글로불린 폴리펩티드에 대한 암호화 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 암호화 서열에 공유 결합시킴으로써, DNA를 변형시킬 수도 있다.

<78> 전형적으로, 이러한 비면역글로불린 폴리펩티드를 항체의 불변 도메인에 대해 치환하거나, 또는 이들을 항체의 하나의 항원 결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환하여, 항원에 대해 특이성을 갖는 하나의 항원 결합 부위와 다른 항원에 대해 특이성을 갖는 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 형성한다.

<79> (iii) 인체화 항체

<80> 비인간 항체를 인체화하기 위한 방법이 당 기술분야에 설명되어 있다. 바람직하게는, 인체화 항체는 비인간 원천으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는 종종 "수입(import)" 잔기로서 일컬어지며, 이는 전형적으로 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인체화는 필수적으로 윈터(Winter) 등의 방법 [Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239:1534-1536 (1988)]에 따라 인간 항체의 상응하는 서열을 고도가변부 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인체화" 항체는, 손상되지 않은 인간 가변 도메인보다 실질적으로 작은 부분이 비인간 종에서 유래한 상응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567호)이다. 실제로, 인체화 항체는, 일부 고도가변부 잔기 및 가능하다면 일부의 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위에 있는 잔기로 대체된 인간 항체이다.

<81> 인체화 항체를 형성하는 데 사용되는 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는 데 매우 중요하다. 이른바, "최적합 (best-fit)"이라 불리는 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인체화 항체를 위한 인간 프레임워크 영역(FR)으로서 받아들인다 [Sims 등, J.Immunol., 151:2296 (1993); Chothia 등, J.Mol.Biol., 196:901 (1987)]. 다른 방법은, 특정한 경쇄 또는 중쇄 하위군의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크 영역을 사용한다. 몇 개의 상이한 인체화 항체에 대해 동일한 프레임워크가 사용될 수도 있다 [Carter 등, Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta 등, J.Immunol., 151:2623 (1993)].

<82> 항체가 항원에 대한 높은 친화력 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유한 채로 인체화되는 것이 더욱 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 바람직한 방법에 따르면, 모서열 및 인체화 서열의 3-차원 모델을 사용한 모서열 및 각종 개념적인 인체화 생성물의 분석 과정에 의해 인간화된 항체를 제조한다. 3-차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수가능하고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3-차원 배위 구조를 예시하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용될 수 있다. 이러한 디스플레이를 정밀하게 검사하면, 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기들의 역할을 분석할 수 있으며, 다시 말해서 잔기가 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 미치는 영향을 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 수용자 및 수입 서열로부터 선택 및 조합할 수 있고, 그 결과 원하는 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화력이 달성될 수 있다. 일반적으로, 고도가변부 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는 데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 연관된다.

<83> (iv) 인간 항체

<84> 인체화에 대한 대안으로서, 인간 항체를 발생시킬 수 있다. 예를 들면, 면역화시에, 내인성 면역글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 전체 범위를 생성할 수 있는 형질전환 동물 (예, 생쥐)을 생산할 수 있다. 예를 들면, 키메라 및 생식세포주 변이 생쥐에서 항체 중쇄 결합 영역(J_H) 유전자가 동형접합 결실되면, 내인성 항체 생성이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 이러한 생식세포주 변이 생쥐에 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 배열을 이식하면, 항원 공격시에 인간 항체가 생성되어진다. 예를 들면 문헌 [Jakobovits 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits 등, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann 등, Year in Immuno., 7:33 (1993); 및 미국 특허 5,591,669호, 5,589,369호 및 5,545,807호] 참조.

<85> 대안적으로, 면역화되지 않은 공여체로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성하기 위하여, 파아지 디스플레이 기술 [McCafferty 등, Nature 348:552-553 (1990)]이 사용될 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자가 M13 또는 fd와 같은 필라멘트상 박테리오파아지의 주 또는 부 외피 단백질 유전자의 어느 하나 내에 프레임내 클로닝되고, 파아지 입자의 표면상에서 기능적 항체 단편으로서 표시된다. 필라멘트상 입자는 파아지 계놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에,

항체의 기능적 특성을 기초로 하여 선택하면, 결국 그러한 특성들을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자가 선택된다. 따라서, 파아지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파아지 디스플레이는 여러 형태로 실시될 수 있다; 이를 검토하기 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. 및 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 단편의 몇가지 원천이 파아지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson 등, Nature, 352:624-628 (1991)]은 면역화된 생쥐의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 랜덤 콤비네이토리어 라이브리리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 단리하였다. 면역화되지 않은 인간 공여체로부터 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있고, 문헌 [Marks 등, J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991), 또는 Griff 등, EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라서 다양한 항원 배열 (자기-항원 포함)에 대한 항체를 필수적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 5,565,332호 및 5,573,905호 참조.

<86> 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 인간 항체가 발생될 수도 있다 [미국 특허 5,567,610호 및 5,229,275호 참조].

<87> v) 항체 단편

<88> 항체 단편의 생성을 위해 다양한 기술이 개발되어왔다. 전통적으로, 이러한 단편들은 손상되지 않은 항체의 단백질분해 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto 등, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan 등, Science, 229:81(1985)] 참조). 그러나, 이러한 단편들은 제조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. 예를 들면, 항체 단편들은 상기 언급된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편들은 이.콜리로부터 직접적으로 회수되고 화학적으로 결합하여 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 [Carter 등, Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. 다른 접근법에 따르면, 제조합 숙주 세포 배양액으로부터 F(ab')₂ 단편을 직접적으로 단리할 수 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 접근법은 당 업자에게 명백하다. 다른 구현양태에서, 선택된 항체는 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)이다. 참조, W093/16185; 미국 특허 5,571,894호; 및 미국 특허 5,587,458호. 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 5,641,870호에 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 일특이성 또는 이특이성일 수도 있다.

<89> (vi) 이특이성 항체

<90> 이특이성 항체는 2 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 일례의 이특이성 항체들이 B 세포 표면 마커의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이러한 다른 항체들이 처음의 B 세포 마커를 결합할 수 있고, 두번째 B 세포 표면 마커를 더욱 결합할 수 있다. 대안적으로, B-세포에 대한 세포 방어 메카니즘에 초점을 맞추기 위하여, 항-B 세포 마커 결합 팔을, T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2 또는 CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(FcγR), 예컨대 FcγRI(CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)과 같은 백혈구 상의 시동(triggering) 분자에 결합하는 팔과 결합시킬 수도 있다. 세포독성 물질을 B 세포에 국소화하기 위하여, 이특이성 항체들을 사용할 수도 있다. 이러한 항체들은 B 세포 마커-결합 팔 및 세포독성 물질 (예, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토타렉세이트 또는 방사능 동위원소 합텐)를 결합하는 팔을 갖는다. 이특이성 항체들은 전체 길이 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이특이성 항체)로서 제조될 수 있다.

<91> 이특이성 항체의 형성 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 전체 길이 이특이적 항체의 전통적인 제법은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현을 기초로 하고, 이때 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 [Millstein 등, Nature, 305:537-539 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 랜덤한 조합으로 인하여, 이러한 하이브리도마 (쿠아드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이들 중에서 단지 하나만이 정확한 이특이적 구조를 갖는다. 통상 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 성가신 일이며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차가 W093/08829호 및 문헌 [Traunecker 등, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

<92> 상이한 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 가진 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 적어도 일부의 경첩, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 적어도 하나의 융합에 존재하는, 경첩 결합에 필요한 부위를 함유하는 첫번째 중쇄 불변부(CH1)를 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA를 별도의 발현 벡터내에 삽입하고, 적절한 숙주 유기체내에 동시-이입한다. 이는, 구축에서 사용되는 동일하지 않은 비율의 3개의 폴리펩티드 사슬이 최적의 수율을 제공하는 경우의 구현양태에서, 3개의 폴

리펩티드 단편의 상호 비율을 조절함에 있어서 상당한 융통성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2 이상의 폴리펩티드 사슬이 높은 수율로 발현되거나 또는 그 비율이 특별한 의미가 없을 때에는, 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬에 대한 암호화 서열을 하나의 발현 벡터내에 삽입할 수 있다.

<93> 이러한 접근법의 바람직한 구현양태에서, 이특이성 항체들은 하나의 팔에 첫번째 결합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 팔에서 (두번째 결합 특이성을 제공하는) 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍으로 구성된다. 이특이성 분자의 단지 1/2에서 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터 바람직한 이특이성 화합물을 분리하는 것을 도와준다는 것이 밝혀졌다. 이러한 접근법은 W094/04690호에 개시되어 있다. 이특이성 항체의 생성에 대한 더욱 상세한 사항은 예를 들어 문헌 [Suresh 등, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

<94> 미국 특허 5,731,168호에 기재된 다른 접근법에 따르면, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면을 조작하여 재조합 세포 배양액으로부터 회수되는 이중이량체의 퍼센트를 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 별변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 첫번째 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 더욱 큰 측쇄 (예, 티로신 또는 트립토판)으로 대체한다. 큰 아미노산 측쇄를 더욱 작은 것 (예, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써, 두번째 항체 분자의 계면 위에 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 형성된다. 이는 동중이량체와 같은 다른 원치않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.

<95> 이특이성 항체는 가교되거나 또는 "이중접합" 항체를 포함한다. 예를 들면, 이중접합체내의 항체의 하나를 아비딘에 결합시키고, 다른 것을 비오틴에 결합시킬 수 있다. 이러한 항체들은 예를 들면, 면역 체계 세포의 표적을 원하지 않는 세포에 맞추기 위해 (미국 특허 4,676,980호), 그리고 HIV 감염을 치료하기 위해 (W091/00360, W092/200373, 및 EP03089) 제안되어 있다. 이중접합 항체들은 통상적인 가교 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 적절한 가교제가 당 기술분야에 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 4,676,980호에 개시되어 있다.

<96> 항체 단편으로부터 이특이성 항체를 생성하기 위한 기술도 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들면, 화학적 결합을 사용하여 이특이성 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan 등, Science, 229:81(1985)]은 손상되지 않은 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재하고 있다. 이러한 단편들은 디티올 착물화제인 소듐 아르세나이트의 존재하에서 환원되어 인접한 디티올들을 안정화하고 분자간 디설파이드 형성을 막는다. 이어서, 생성된 Fab' 단편들을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 메르캅토에틸아민과의 환원에 의해 Fab'-TNB 유도체의 하나를 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이특이성 항체를 형성한다. 생성된 이특이성 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 시약으로 사용될 수 있다.

<97> 최근의 진보는 이.콜리로부터 Fab'-SH 단편을 직접적으로 회수하는 것을 수월하게하며, 이들은 화학적으로 결합하여 이특이성 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby 등, J.Exp.Med., 175:217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이특이성 항체 F(ab')₂ 분자의 생성을 기재하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이.콜리로부터 별도로 분리되고, 시험관내에서 직접적으로 화학 결합되어 이특이성 항체를 형성한다. 이렇게 형성된 이특이성 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방암 표적에 대항하여 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수 있다.

<98> 재조합 세포 배양액으로부터 직접적으로 이특이성 항체 단편을 형성 및 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들면, 류신 지퍼를 사용하여 이특이성 항체가 제조되었다. 문헌 [Kostelny 등, J.Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동중이량체를 경첩부에서 환원시켜 단량체를 형성한 다음 재-산화시켜 항체 이중이량체를 형성하였다. 이 방법은 항체 동중이량체의 생성을 위해 사용될 수도 있다. 문헌 [Hollinger 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "다이하바디" 기술은 이특이성 항체 단편을 형성하기 위한 대안적인 메커니즘을 제공하고 있다. 단편은, 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커에 의해, 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결되어진 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인을 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루도록 하여, 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단일 사슬 F_v (sF_v) 이량체의 사용에 의해 이특이성 항체 단편을 형성하기 위한 다른

전략이 또한 보고되어 있다. 문헌 [Gruber 등, J.Immunol., 152:5368 (1994)] 참조.

- <99> 2 이상의 결합가를 가진 항체도 의도된다. 예를 들면, 삼특이성 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt 등, J.Immunol., 147:60 (1991)].
- <100> **III. 길항물질의 접합체 및 다른 변형**
- <101> 본 발명의 방법에서 사용되거나 제품에 포함되는 길항물질을 임의로 세포독성 물질에 접합시킨다.
- <102> 이러한 길항물질-세포독성 물질 접합체의 생성에서 유용한 화학요법제는 상기 기재된 바와 같다.
- <103> 길항물질 및 하나 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 마이탄신 (미국 특허 5,208,020호), 트리코텐, 및 CC1065의 접합체도 또한 본 발명에서 의도된다. 본 발명의 하나의 구현양태에서, 길항물질을 하나 이상의 마이탄신 분자 (예를 들어, 길항물질 분자 당 약 1 내지 약 10개의 마이탄신 분자)에 접합시킨다. 예를 들어, 마이탄신을 May-SS-Me로 전환시킬 수 있고, 이것을 May-SH3으로 환원시키고 변형된 길항물질 [Chari 등, Cancer Research 52:127-131 (1991)]과 반응시켜 마이탄신노이드-길항물질 접합체를 생성할 수도 있다.
- <104> 대안적으로, 길항물질을 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합시킨다. 항생물질의 칼리케아미신 계는 피코몰 이하 농도에서 이중-가닥 DNA의 파열을 일으킬 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다 [Hinman 등, Cancer Research 53:3336-3342 (1993) 및 Lode 등, Cancer Research 58:2925-2928 (1998)].
- <105> 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편인 디프테리아 A 사슬, 엑소톡신 A 사슬 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터), 루신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 커트신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일 공고된 W093/21232호 참조.
- <106> 본 발명은 핵분해 활성을 가진 화합물 (예, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase)과 접합된 길항물질을 더욱 포함한다.
- <107> 방사능접합된 길항물질의 생성을 위하여 여러 방사능 동위원소가 이용될 수 있다. 그의 예는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , 및 Lu의 방사능 동위원소를 포함한다.
- <108> 각종 이작용성 단백질 결합제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜티올)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일)핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨릴렌 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 길항물질 및 세포독성 물질의 접합체를 형성할 수도 있다. 예를 들면, 문헌 [Vitetta 등, Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 리신 면역독소를 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 길항물질에 방사능뉴클레오티드를 접합시키기 위한 일례의 킬레이트 제이다. W094/11026 참조. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진하는 "절단가능한 링커"일 수도 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰아이드 함유 링커 [Chari 등, Cancer Research 52:127-131 (1991)]를 사용할 수도 있다.
- <109> 대안적으로, 길항물질 및 세포독성 물질을 포함하는 융합 단백질이 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 형성될 수도 있다.
- <110> 또 다른 구현양태에서, 길항물질을 종양 예비표적화에서 사용하기 위한 "수용체" (예컨대 스트렙타비딘)에 접합시킬 수도 있고, 이때 길항물질-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 정화제를 사용하여 순환으로부터 비결합된 접합체를 제거하고, 이어서 세포독성 물질 (예, 방사능뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예, 아비딘)를 투여한다.
- <111> 또한, 본 발명의 길항물질을 약물 전구체-활성화 효소와 접합시켜, 약물 전구체 (예를 들어, 펩티딜

화학요법제, W081/01145 참조)를 활성 항암 약물로 전환시킬 수도 있다. 예를 들어, W088/07378호 및 미국 특허 4,975,278호 참조.

- <112> 이러한 접합체의 효소 성분은, 약물 전구체를 더욱 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 약물 전구체에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.
- <113> 본 발명의 방법에서 유용한 효소는, 포스페이트 함유 약물 전구체를 자유 약물로 전환시키기에 유용한 알칼리 포스파타제; 설페이트 함유 약물 전구체를 자유 약물로 전환시키기에 유용한 아틸솔파타제; 비독성 5-플루오로 시토신을 항암 약물, 5-플루오로우라실로 전환시키기에 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 약물 전구체를 자유 약물로 전환시키기에 유용한 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텡신 (예컨대 카텡신 B 및 L)과 같은 프로테아제; D-아미노산 치환체를 함유하는 약물 전구체를 전환시키기에 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화 약물 전구체를 자유 약물로 전환시키기에 유용한 β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제와 같은 탄수화물-절단 효소; β -락탐으로 유도체화된 약물을 자유 약물로 전환시키기에 유용한 β -락타마제; 및 그들의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 자유 약물로 전환시키기에 유용한 페니실린 아미다제, 예컨대 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 대안적으로, 효소 활성을 가진 항체 (당 기술분야에서 "항체효소(abzyme)"으로 또한 알려져 있음)를 사용하여 본 발명의 약물 전구체를 자유 활성 약물로 전환시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Massey, Nature 328:457-458 (1987)] 참조). 중앙 세포 집단에 항체효소를 전달하기 위하여, 길항물질-항체 효소 접합체를 본 명세서에서 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.
- <114> 본 발명의 효소는 당 기술분야에 공지된 기술, 예컨대 상기 언급된 이중작용성 가교 시약의 사용에 의해 길항 물질에 공유 결합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 효소의 하나 이상의 기능적 활성 부위에 연결되어진, 본 발명의 길항물질의 하나 이상의 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당 기술분야에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger 등, Nature, 312:604-608 (1984)] 참조).
- <115> 길항물질의 다른 변형도 본 발명에서 의도된다. 예를 들면, 길항물질을 여러 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중의 하나에 연결시킬 수도 있다.
- <116> 본 명세서에 개시된 길항물질은 리포솜으로서 제형될 수도 있다. 길항물질을 함유하는 리포솜은 당 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 문헌 [Epstein 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 미국 특허 4,485,045호 및 4,544,545호; 및 1997년 10월 23일 공고된 W097/38731호]에 기재된 바와 같이 제조된다. 증진된 순환 시간을 가진 리포솜이 미국 특허 5,013,556호에 개시되어 있다.
- <117> 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 원하는 직경을 가진 리포솜을 얻기 위하여, 리포솜을 한정된 공극 크기의 필터를 통해 압출시킨다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 문헌 [Martin 등, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 디설파이드 상호교환 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 화학요법제가 임의로 리포솜 내에 함유된다. 문헌 [Gabrizon 등, J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)] 참조.
- <118> 본 명세서에 기재된 단백질 또는 펩티드 길항물질의 아미노산 서열 변형(들)도 의도된다. 예를 들면, 길항물질의 결합 친화력 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수도 있다. 길항물질의 아미노산 서열 변형체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 길항물질 핵산내에 도입하거나, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들면 길항물질의 아미노산 서열 내에서 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기내로의 삽입, 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합에 의해 최종 구축물에 이르는 수 있다. 아미노산 변화는, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 바꾸는 것과 같이, 길항물질의 후-번역 과정을 변경시킬 수도 있다.
- <119> 돌연변이유발을 위해 바람직한 위치인 길항물질의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은, 문헌 [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같이 "알라닌 주사 돌연변이유발"이라 불리운다. 여기에서, 표적 잔기의 잔기 또는 기가 확인되고 (예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu와 같은 하전된 잔기), 중성 또는 음 하전을 띤 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 치환되어, 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 이어서, 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가의 변형

또는 기타 변형을 도입함으로써, 치환에 대해 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치를 개선시킨다. 즉, 아미노산 서열 변형을 도입하기 위한 위치는 미리 결정하는 반면, 돌연변이 그 자체의 특징은 미리 결정될 필요가 없다. 예를 들면, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위하여, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 주사 또는 랜덤 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 길항물질 변형체를 원하는 활성에 대해 선별한다.

<120> 아미노산 서열 삽입은, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입 뿐만 아니라, 하나의 잔기에서부터 100 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 범위에 걸친 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 길항물질 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 길항물질을 포함한다. 길항물질 분자의 다른 삽입 변형체는 효소의 길항물질의 N- 또는 C-말단에 대한 융합, 또는 길항물질의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드를 포함한다.

<121> 다른 유형의 변형체는 아미노산 치환 변형체이다. 이러한 변형체들은 상이한 잔기로 대체된 길항물질 분자에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 항체 길항물질의 치환 돌연변이유발을 위해 매우 주요한 부위는 고도가 변부를 포함하지만, FR 변경도 의도된다. 보존적 치환을 "바람직한 치환기"라는 제목하에 아래 표 1에 나타낸다. 이러한 치환에 의해 생물학적 활성이 변화된다면, 표 1에서 "일례의 치환기"로 명명되거나 이하의 아미노산 부류를 참조로 하여 더욱 기재된 바와 같이, 더욱 실질적인 변화가 도입될 수도 있고 생성물을 선별할 수 있다.

표 1

본래의 잔기	일례의 치환기	바람직한 치환기
Ala(A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp(D)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu(L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

<123> 길항물질의 생물학적 성질에서의 실질적인 변화는, (a) 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조, 예컨대 시트 또는 나선형 배위, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는데 미치는 영향이 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생 잔기는 일반적인 측쇄 성질을 기준으로 하여 여러 군으로 나뉜다:

<124> (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

<125> (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

<126> (3) 산성: asp, glu;

<127> (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

<128> (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

- <129> (6) 방향족: trp, tyr, phe.
- <130> 비보존 치환은 이러한 부류중의 하나의 요소를 다른 부류로 바꾸는 것을 필요로 한다. 길항물질의 적절한 배위를 유지하는데 관련되지 않은 시스테인 잔기를, 일반적으로 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선시키고, 비정상적인 가교를 막을 수도 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)을 길항물질에 첨가하여 안정성을 개선시킬 수도 있다 (특히, 길항물질이 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).
- <131> 치환 변형체의 특히 바람직한 유형은 모 항체의 하나 이상의 고도가변부 잔기를 치환하는 것과 연관된다. 일반적으로, 추가의 발생을 위해 선택된 변형체(들)은, 이들이 발생된 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 갖고 있다. 이러한 치환 변형체를 발생시키기 위한 편리한 방법은 파아지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙 분열이다. 간단하게, 여러 개의 고도가변부 부위 (예, 6 ~ 7개 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 가능한 모든 아미노 치환을 발생시킨다. 이렇게 발생된 항체 변형체는, 각각의 입자내에 채워진 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합으로서 필라멘트 파아지 입자로부터 1결합가 형태로 나타난다. 이어서, 파아지-표시된 변형체를 본 명세서에 개시된 바와 같이 그들의 생물학적 활성 (예, 결합 친화력)에 대해 선별한다. 변형을 위한 후보 고도가변부 부위를 확인하기 위하여, 알려진 주사 돌연변이유발을 수행하여, 항원 결합에 상당히 기여하는 고도가변부 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 항체와 항원 사이에서 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유리할 수도 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃한 잔기들은 본 명세서에 상술된 기술에 따른 치환을 위한 후보가 된다. 일단 이러한 변형체들이 생성되면, 본 명세서에 기재된 바와 같이 변형체의 패널을 선별하고, 추가의 발생을 위하여 하나 이상의 관련된 분석시험에서 뛰어난 성질을 가진 항체를 선택할 수도 있다.
- <132> 길항물질의 아미노산 변형체의 다른 유형은 길항물질의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경이라 함은, 길항물질에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기를 결실시키고/거나 길항물질에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다.
- <133> 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결이란, 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 잔기가 결합되는 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기에서, X는 프롤린 이외의 임의의 아미노산이다)은, 아스파라긴 측쇄로의 탄수화물 잔기의 효소적 결합을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드내에 이러한 트리펩티드 서열 중의 하나가 존재하는 것은 잠재적인 글리코실화 부위를 발생시킨다. O-연결된 글리코실화란, 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스의 하나를 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 결합시키는 것을 말하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 또한 사용될 수도 있다.
- <134> 길항물질에 글리코실화 부위를 첨가하는 것은, 아미노산 서열이 하나 이상의 상기-기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대하여). 변경은 또한, 원래의 길항물질 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 추가 또는 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (O-글리코실화 부위에 대해).
- <135> 길항물질의 아미노산 서열 변형체를 암호화하는 핵산 분자는 당 기술분야에 공지된 여러 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법들은, 천연 원천으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변형체의 경우), 또는 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위 특이적) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 길항물질의 미리 제조된 변형체 또는 비변형 형태의 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 비제한적으로 포함한다.
- <136> 예를 들어, 길항물질의 항원-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 증진시키기 위하여, 본 발명의 길항물질을 주효인자 기능에 대해 변형시키는 것이 바람직할 수도 있다. 이것은 하나 이상의 아미노산 치환을 항체 길항물질의 Fc 영역에 포함시킴으로써 달성될 수도 있다. 대안적으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입하여, 이 영역에서 사슬간 디설파이드 결합을 형성시킬 수도 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내면화 능력 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron 등, J.Exp.Med. 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)] 참조. 증가된 항-종양 활성을 가진 동종이량체 항체는 문헌 [Wolff 등, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 것과 같은 헤테로이작용성 가교제를 사용하여 제조될 수도 있다. 대안적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖도록 조작될 수 있으며, 이에 의해 증가된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수도 있다. 문헌 [Stevenson 등, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)] 참조.
- <137> 길항물질의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여, 예를 들어 미국 특허 5,739,277호에 기재된 바와 같이 살베이지

(salvage) 수용체 결합 에피토프를 길항물질(특히 항체 단편) 내에 혼입할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 "살베이지수용체 결합 에피토프"란, IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 원인이 되는 IgG 분자 (예, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 말한다.

IV. 제약학적 제제

원하는 정도의 순도를 가진 길항물질을 임의의 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 [Remington's Pharmaceutical Sciences 제 16 판, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합함으로써, 본 발명에 따라 사용되는 길항물질의 치료 제제를 저장을 위한 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조한다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성인 것이고, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (옥타데실디메틸벤질 압모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저 분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린과 같은 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당류; 소듐과 같은 염-형성 반대 이온; 금속 착물 (예, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온 계면활성제, 예컨대 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

예시적인 항-CD20 항체 제제는 본 명세서에 참고문헌으로 인용된 W098/56418호에 기재되어 있다. 이 공보에는 40 mg/mL 리텍시맵, 25mM 아세테이트, 150 mM 트레할로스, 0.9% 벤질알콜, 0.02% 폴리소르베이트20을 포함하고, 2-8 °C에서 최소 2년의 보관 수명을 갖는 pH 5.0의 액상 다회투여 제제를 기재하고 있다. 다른 항-CD20 제제는 9.0 mg/ml 염화나트륨, 7.35 mg/ml 시트르산나트륨 이수화물, 0.7 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 주사용 살균수 중에 10 mg/ml 리텍시맵을 포함한다 (pH 6.5).

피하 투여를 위해 적합한 동결건조된 제제는 W097/04801호에 기재되어 있다. 이러한 동결건조된 제형은 적절한 희석제를 사용하여 고 단백질 농도로 재구성될 수도 있고, 재구성된 제형을 치료하고자 하는 포유동물에 피하 투여할 수도 있다.

여기에서 제제는 치료하고자 하는 특정한 적응증에 필요한 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가진 화합물을 함유할 수도 있다. 예를 들면, 세포독성 물질, 화학요법제, 사이토 킨 또는 면역억제제 (예를 들어, T 세포에 작용하는 것, 예컨대 시클로스포린 또는 T 세포에 결합하는 항체, 예를 들어 LFA-1에 결합하는 항체)를 더 제공하는 것이 바람직할 수도 있다. 이러한 기타 약제의 유효량은 제제에 존재하는 길항물질의 양, 치료하고자 하는 질병 또는 장애의 유형, 및 상기 언급된 기타 요인에 의존한다. 이들은 일반적으로 상기한 것과 동일한 투여량, 같은 투여 경로로 사용되거나 또는 상기 사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

활성 성분들은 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들면 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미소캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트)미소캡슐 내에 각각 콜로이드성 약물 전달 체계 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 미소에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 거대에멀전으로 포획될 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

서방형 제제를 제조할 수도 있다. 서방형 제제의 적절한 예는 길항물질을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이 매트릭스는 성형된 제품, 예컨대 필름 또는 미소캡슐의 형태이다. 서방형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919호), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해가능한 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOTTM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 등이다.

생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균되어 있어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

V. 길항물질에 의한 치료

- <147> B 세포 표면 항원에 결합하는 길항물질을 포함한 조성물을 양호한 의약 관행과 일치하는 방식으로 제형, 투약 및 투여한다. 이러한 상황에서 고려될 요인은 치료하고자 하는 특정한 질병 또는 장애, 치료될 특정한 포유동물, 개개의 환자의 임상 상태, 질병 또는 장애의 원인, 약물 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 및 의약업자에게 공지된 기타 요인을 포함한다. 투여되는 길항물질의 치료적 유효량은 이러한 고려사항에 의해 결정된다.
- <148> 일반적 제안으로서, 1회 투약당 비경구적으로 투여되는 길항물질의 치료적 유효량은 1일당 환자 체중 1kg에 대해 약 0.1 내지 20 mg의 범위이고, 사용되는 길항물질의 전형적인 초기 범위는 약 2 내지 10 mg/kg의 범위이다.
- <149> 바람직한 길항물질은 항체, 예를 들어 세포독성 물질에 접합되지 않은 RITUXAN^(R)과 같은 항체이다. 비접합된 항체를 위해 적절한 투여량은 예를 들어 약 20 mg/m² 내지 약 1000 mg/m²의 범위이다. 하나의 구현양태에서, 항체의 투여량은 RITUXAN^(R)에 대해 현재 추천되는 양과는 상이하다. 예를 들면, 투여량이 약 20 mg/m² 내지 약 250 mg/m², 예를 들면 약 50 mg/m² 내지 약 200 mg/m²의 범위인 경우, 실질적으로 375 mg/m² 미만의 항체를 한번 이상 환자에게 투여할 수도 있다.
- <150> 또한, 항체를 한번 이상의 초기 투여분(들)으로 투여한 다음, 한번 이상의 후속 투여분(들)으로 투여할 수도 있으며, 이때 후속 투여분(들) 중 항체의 mg/m² 투여량은 초기 투여분(들) 중 항체의 mg/m² 투여량보다 많다. 예를 들면, 초기 투여량은 약 20 mg/m² 내지 약 250 mg/m² (예를 들어, 약 50 mg/m² 내지 약 200 mg/m²)일 수 있고, 후속 투여량은 약 250 mg/m² 내지 약 1000 mg/m²의 범위일 수 있다.
- <151> 그러나, 상기 명기한 바와 같이, 이들 제안된 길항물질의 양은 치료시 재량에 따라 크게 달라질 수 있다. 적절한 투여량 및 계획을 선택하는 데 있어서 주요 요인은 상기 기재한 바와 같이 얻어지는 결과이다. 예를 들면, 진행중인 질병과 급성 질병의 치료를 위해서는 처음에 비교적 다량의 투여량이 필요할 수도 있다. 더욱 효과적인 결과를 얻기 위해서는, 질병 또는 장애에 따라, 질병 또는 장애의 첫번째 징후, 진단, 출현, 또는 발생 시점에 가능한 한 가까운 시기에, 또는 질병 또는 장애가 수그러들 때 길항물질을 투여한다.
- <152> 길항물질을 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내를 포함한 적절한 수단에 의해 투여하고, 원한다면, 국소 면역억제 처리, 병변내 투여에 의해 투여한다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 예를 들어 길항물질의 투여량을 저하시키면서 펄스 주입에 의해 길항물질을 적절히 투여할 수도 있다. 바람직하게는, 부분적으로 투여가 순간인지 또는 장기적인지의 여부에 따라, 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투여한다.
- <153> 세포독성 물질, 화학요법제, 면역억제제 및/또는 사이토킨과 같은 다른 화합물을 길항물질과 함께 투여할 수도 있다. 조합된 투여는 별개의 제형을 사용하거나 단일 제약학적 제형을 사용하는 동시투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하며, 이때 투여 기간은 양쪽 (또는 모든) 활성 약제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하게 되는 기간인 것이 바람직하다.
- <154> 단백질 길항물질을 환자에게 투여하는 것과는 별개로, 본 출원은 유전자 요법에 의한 길항물질의 투여도 상정한다. 길항물질을 암호화하는 핵산의 투여는 "치료적 유효량의 길항물질을 투여"한다는 표현에 포함된다. 예를 들면 1996년 3월 14일에 공고된 W096/07321호 (세포내 항체를 발생시키기 위한 유전자 요법의 용도)를 참조한다.
- <155> 핵산 (임의로 벡터내에 함유됨)을 환자의 세포내에 넣기 위한 2가지 주요한 접근법: 생체내 방법 및 생체의 방법이 존재한다. 생체내 전달을 위해서는, 핵산을 통상 길항물질이 요구되는 부위에서 환자 내에 직접적으로 주입한다. 생체의 치료를 위해서는, 환자의 세포를 제거하고, 핵산을 이렇게 단리된 세포내에 도입하고, 변형된 세포를 직접적으로 또는 예를 들면 환자에게 이식될 다공질 막내에 캡슐화하여 환자에게 투여한다 (예를 들면, 미국 특허 4,892,538호 및 5,283,187호 참조). 핵산을 생체 세포내에 도입하기 위해 이용될 수 있는 다양한 기술이 존재한다. 이러한 기술은, 핵산이 시험관내에서 또는 숙주 세포내의 생체내에서 배양된 세포내로 운반되는지의 여부에 따라 변한다. 핵산을 시험관내에서 포유동물 세포내로 운반시키기에 적절한 기술은, 리포솜의 사용, 전기영동, 미소주입, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 칼슘 포스페이트 침전 방법 등을 포함한다. 유전자의 생체의 전달을 위해 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.
- <156> 일반적으로 바람직한 생체내 핵산 운반 기술은 바이러스 벡터 (예컨대 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스 I 바이러스, 또는 아데노-결합 바이러스) 및 지질계 체계 (유전자의 지질-매개 운반을 위해 유용한 지질은 예를 들

면 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol이다)를 사용한 이입을 포함한다. 일부 상황에서, 표적 세포를 표적으로 하는 약제, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 대해 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 원천에 제공하는 것이 바람직하다. 리포좀이 사용될 경우, 표적화 및/또는 흡수를 촉진하기 위하여, 세포 내이입과 연관된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정한 세포 유형에 반응하는 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환시에 내면화되는 단백질을 위한 항체, 및 세포내 국소화를 표적으로 하고 세포내 반감기를 증진시키는 단백질이 사용될 수 있다. 수용체-매개 세포내이입 기술은 예를 들면 문헌 [Wu 등, J.Biol.Chem. 262:4429-4432 (1987); 및 Wagner 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87:3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 현재 공지된 유전자 표지 및 유전자 요법 프로토콜에 관한 검토는 문헌 [Anderson 등, Science 256:808-813 (1992)]를 참조한다. 또한, W093/25673호 및 그 공보에 인용된 참고문헌을 참조한다.

VI. 제품

본 발명의 다른 구현양태에서, 상기 기재된 질병 또는 장애의 치료를 위해 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 용기 위에 있거나 용기와 연관된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적절한 용기는 예를 들면 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 각종 재료로부터 형성될 수도 있다. 용기는 선택된 질병 또는 질환을 치료하기 위해 효과적인 조성물을 보유하거나 함유하고 있으며, 무균성 입구를 가질 수도 있다 (예를 들면, 용기는 피하 주사 바늘로 구멍뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥 주사액 주머니 또는 바이알일 수도 있다). 조성물내의 하나 이상의 활성 약제는 B 세포 표면 마커를 결합하는 길항물질이다. 라벨 또는 포장 삽입물은, 조성물이 본 명세서에 기재된 것과 같은 자가면역 질환을 갖거나 이에 걸리기 쉬운 환자를 치료하기 위해 사용됨을 나타낸다. 제품은 또한 제약학적으로 허용가능한 희석 완충액, 예컨대 주사를 위한 정균수 (BWFJ), 포스페이트-완충 식염수, 링게르 액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 두번째 용기를 더욱 포함할 수도 있다. 이것은 또한 기타 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여 시판품 및 사용자 관점에서 유리한 다른 물질들을 더욱 포함할 수도 있다.

본 발명의 더욱 상세한 사항은 이하 비제한적 실시예에 의해 예증된다. 본 명세서에서 열거된 모든 문헌의 개시내용은 참고문헌으로 포함되는 것이다.

효 과

본 발명의 방법에 의해, B 세포 표면 마커에 결합하는 길항물질의 치료적 유효량을 포유동물에게 투여하여 포유동물의 자가면역 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

실시예 1

류머티스 관절염(RA)으로 임상 진단을 받은 환자들을 리텍시맵 (RITUXAN^(R)) 항체로 치료한다. 치료 대상 환자는 B 세포 악성이 관찰되지 않는 사람으로 한다. 또한, 임의로, 살리실레이트와 같이 RA를 치료하기 위해 사용되는 하나 이상의 약제; 인도메타신, 페닐부타존, 페닐아세트산 유도체 (예, 이부프로펜 및 페노프로펜), 나프탈렌 아세트산 (나프록센), 피롤알칸산 (토메틴), 인돌아세트산 (술린락), 할로젠화 안트라닐산 (메클로페나메이트 소듐), 피록시감, 조메피락 및 디플루니살과 같은 비스테로이드성 항염증 약물; 클로로퀸과 같은 항말라리아약; 금 염류; 페니실라민; 또는 메토타렉세이트 또는 코르티코스테로이드와 같은 면역억제제를 이들 약물에 대해 공지된 투여량이나 적은 투여량으로 사용하여 환자를 추가로 치료한다. 그러나 환자를 RITUXAN^(R)만으로 치료하는 것이 바람직하다.

RITUXAN^(R)을 하기 투약 계획중 하나에 따라 환자에게 정맥내(IV) 투여한다:

(A) 1일째에 50 mg/m² IV

8, 15 및 22일째에 150 mg/m² IV

(B) 1일째에 150 mg/m² IV

8, 15 및 22일째에 375 mg/m² IV

- <168> (C) 1, 8, 15 및 22일째에 375 mg/m^2 IV
- <169> 주요 반응, 다시말해서 아침 경직증, 고통스럽고 부어오른 관절의 수, 적혈구 침강(ESR)의 개선, 및 환자와 의사에 의해 평가시에 5-포인트 등급의 질병 중증도에서 2-포인트 이상의 개선이, 파울러스(Paulus) 지수 [Paulus 등, *Athrititis Rheum.* 33:477-484 (1990)]에 의해 결정된다. RITUXAN^(R)의 투여는 상기 기재된 것과 같이 치료된 환자에서 RA의 하나 이상의 증세를 경감시킬 것이다.
- <170> **실시예 2**
- <171> 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA), 예를 들어 한성 글로불린혈증 또는 콤스(Coombs) 양성 빈혈로 진단된 환자를 RITUXAN^(R) 항체로 치료한다. AIHA는 환자의 적혈구와 반응하는 자가 항체에 기인한 후천성 용혈성 빈혈이다. 치료 대상 환자는 B 세포 악성이 관찰되지 않는 사람으로 한다.
- <172> RITUXAN^(R)을 하기 투약 계획 중 하나에 따라 환자에게 정맥내(IV) 투여한다:
- <173> (A) 1일째에 50 mg/m^2 IV
- <174> 8, 15 및 22일째에 150 mg/m^2 IV
- <175> (B) 1일째에 150 mg/m^2 IV
- <176> 8, 15 및 22일째에 375 mg/m^2 IV
- <177> (C) 1, 8, 15 및 22일째에 375 mg/m^2 IV
- <178> 추가의 보조 요법 (예컨대 당코르티코이드, 프레드니손, 아자티오프린, 시클로포스파미드, 빈카-라텐 혈소판 또는 다나졸(Danazol))을 RITUXAN^(R) 요법과 조합할 수도 있으나, 치료 과정 전체에 걸쳐 환자를 RITUXAN^(R)을 단일 약제로 써서 치료하는 것이 바람직하다.
- <179> 전체 반응 속도는, 표준 화학 매개변수에 의해 결정되는 바와 같이, 혈액 계수에서의 개선, 수혈 필요성의 감소, 개선된 헤모글로빈 수준 및/또는 용혈 징후의 감소를 기초로 하여 결정한다. RITUXAN^(R)의 투여는 상기 기재된 바와 같이 치료된 환자에서 용혈성 빈혈의 하나 이상의 징후를 개선시킬 것이다. 예를 들면, 상기 기재된 바와 같이 치료된 환자는, 적어도 1 g/dl 의 헤모글로빈의 증가를 나타내고 혈청 락트산 탈수소효소 빌리루빈에 의해 측정시에 화학적 용혈 매개변수의 50% 개선 또는 정상으로의 회복을 나타낼 것이다.
- <180> **실시예 3**
- <181> 성인 면역 혈소판감소성 자반병(ITP)은 면역 매개 혈구감소증 중 가장 흔한 예를 구성하는 비교적 드문 혈액 질환이다. 질병은 전형적으로 심각한 혈소판감소증과 함께 나타나며, 이는 골수 내의 정상 내지 증가된 거핵구의 존재하에서 급속한 출혈과 연관될 수 있다. ITP를 가진 대부분의 환자들은 혈소판 막의 외면 상에서 표적 항원에 대항하여 유도된 IgG 항체를 가지며, 그 결과 비장에서 혈소판 격리가 일어나고 혈소판의 세망내피 파괴가 촉진된다 [Bussell, J.B. *Hematol.Oncol. Clin. North Am.* (4):179(1990)]. 다수의 치료적 개입이 ITP의 치료에서 효과적인 것으로 나타났다. 스테로이드는 일반적으로 제 1 선 요법으로 간주되고, 그 후에 대부분의 환자들이 정맥 면역글로불린(IVIG), 비장절제술, 또는 빈크리스틴 또는 면역억제/세포독성 물질을 포함한 기타 의료요법의 후보자가 된다. ITP환자의 80% 이하가 처음에 스테로이드 과정에 반응하지만, 거의 대부분이 완전하고 지속적인 차도를 얻지 못하였다. 비장절제술은 스테로이드 실패에 대한 일반적인 제 2 선 요법으로서 추천되었으며, 거의 60%에서 지속적인 차도가 얻어지지만, 감염에 대한 면역은 감소될 수 있다. 비장절제술은 실질적인 이환율(15%) 및 사망률(2%)과 관련될 수 있는 주요한 외과 수술이다. IVIG는 또한 제 2 선 의료요법으로 사용되었으나, ITP를 가진 성인 환자의 단지 적은 비율만이 차도를 얻었다.
- <182> 코르티코스테로이드 및/또는 비장절제술에서 발생하는 연관된 이환율을 갖지 않는, 활성화된 B 세포에 의한 자기항체의 생성을 방해하는 임의 치료법이, ITP를 가진 다수의 환자를 위해 중요한 치료 방법을 제공한다.
- <183> ITP로 임상 진단된 환자 (예를 들어 혈소판 계수 $< 50,000/\mu\text{l}$)를, 임의로 스테로이드 요법과 조합하여, 리텍시맵 (RITUXAN^(R))으로 치료한다. 치료 대상 환자는 B 세포 악성이 관찰되지 않는 사람으로 한다.

- <184> RITUXAN^(R)을 하기 투약 계획 중 하나에 따라 환자에게 정맥내(IV) 투여한다:
- <185> (A) 1일째에 50 mg/m^2 IV
- <186> 8, 15 및 22일째에 150 mg/m^2 IV
- <187> (B) 1일째에 150 mg/m^2 IV
- <188> 8, 15 및 22일째에 375 mg/m^2 IV
- <189> (C) 1, 8, 15 및 22일째에 375 mg/m^2 IV
- <190> RITUXAN^(R)의 주입 전에 각각 1회 투여량으로 디펜히드라민 25 - 50 mg을 정맥내 투여하고 아세트아미노펜 650 mg을 경구 투여하여 환자를 예비치료한다. 무균 주사기 및 21 게이지 또는 그 이상의 바늘을 사용하여, 필요한 양의 RITUXAN^(R)을 바이알로부터 무균의 병원체-비함유 0.9 % 염화나트륨, USP (식염수)를 함유하는 IV 주머니로 옮긴다. RITUXAN^(R)의 최종 농도는 약 1 mg/ml이다. 초기 투여량 주입 속도를 처음 반시간동안 25 mg/시간으로 시작한 다음, 30 분 간격으로 50 mg/시간씩 증가시켜 최대 200 mg/시간까지 증가시킨다. RITUXAN^(R)의 첫 투약 과정이 잘 수용된다면, 이후의 과정의 주입 속도를 50 mg/시간에서 시작하여 30 분 간격으로 100 mg/시간씩 증가시켜 300 mg/시간을 넘지 않는 최대 속도까지 증가시킨다. 활력 징후 (혈압, 맥박, 호흡, 체온)를 매 15 분씩 4회 또는 안정해질 때까지 측정한다 다음, 주입이 완결된 후 매 시간마다 측정한다.
- <191> RITUXAN^(R)의 4 주 치료 후에 2 주 간격으로 2회의 연속된 시기에 결정된 혈소판 계수를 기초로 하여 전체 반응 속도를 결정한다. RITUXAN^(R)으로 치료된 환자는 위약으로 치료된 환자에 비해 혈소판 계수상 개선을 보일 것이다. 예를 들면, 혈소판 계수가 $<20,000/\mu\text{l}$ 였던 환자에서, 혈소판 계수가 $20,000/\mu\text{l}$ 이상으로 증가하면 반응으로 간주된다; $>20,000/\mu\text{l}$ 의 혈소판 계수 및 임상적 출혈 징후를 가진 환자에 대해서는, 총 혈소판 계수의 증가가 $10,000/\mu\text{l}$ 또는 그 이상이고 징후의 소산이 나타날 경우 반응으로서 간주된다. 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 문헌 [George 등 "Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: A Practice Guideline Developed by Explicit Methods for The American Society of Hematology" Blood 88:3-40 (1996)] 참조.