

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/395
A61K 39/00

(11) 공개번호 10-2005-0100366
(43) 공개일자 2005년10월18일

(21) 출원번호 10-2005-7012463
(22) 출원일자 2005년06월30일
 번역문 제출일자 2005년06월30일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2003/005700 (87) 국제공개번호 WO 2004/058298
 국제출원일자 2003년12월31일 국제공개일자 2004년07월15일

(30) 우선권주장 60/437,145 2002년12월31일 미국(US)

(71) 출원인 이뮤노메딕스, 인코오포레이티드
 미국뉴저저주 07950 모리스플레인즈 어메리칸로드300

(72) 발명자 골든베르그 데이비드 엠.
 미국 뉴저저주 07945 멘드함, 캐롤라이스 팜 로드 1
 한센 한스
 미국 미시시피주 39466 피카운, 앵글러 드라이브 6014

(74) 대리인 윤동열

심사청구 : 없음

(54) 비접합된 항체들 및 접합된 항체들, 항체 조합들 및 융합단백질들을 이용한 B 세포 악성종양 및 자가면역 질병의면역치료요법

요약

본 발명은 약제학적으로 허용가능한 운반체 및 적어도 하나 이상의 접합된 항체를 포함하는 포유동물 치료 조성물을 동시에 또는 순차적으로 투여하여 포유동물에서 B-세포 관련 질병, T-세포 관련 질병 또는 자가면역 질병을 치료 및 진단하는 방법에 관한 것으로서, 여기에서 비-방사성라벨된 항체와 함께 예비-복용(pre-dosing)하는 과정을 수행하지 않는다.

색인어

B-세포 관련 질병, T-세포 관련 질병, 자가면역 질병, 비호지킨스 림프종, 항-CD22 단클론 항체, 인간화된 LL2 단클론 항체

명세서

기술분야

본 발명은 B-세포 관련 질병, 특히 침투적 비호지킨스 림프종(non-Hodgkin's lymphomas)을 치료하기 위한 면역치료법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 포유동물 치료 조성을 투여하여 포유동물에서 B-세포 관련 질병, T-세포 관련 질병 또는 자가면역 질병을 치료 및 진단하는 방법에 관한 것으로서, 여기에서 비-방사성라벨된 항체로 예비-복용(pre-dosing)하는 과정을 수행하지 않는다.

배경기술

B-세포 림프종들은 단클론 항체(Mab)와 함께 치료를 위한 좋은 표적들이 되는 표면 항원들을 발현한다. 단독으로 사용되거나(항체 자체) 또는 화학요법과 함께 연계하여 사용되는 항체들은 독소들 또는 방사성면역치료(radioimmunotherapy; RAIT)를 위한 방사성핵종에 접합될 수 있다. 방사성라벨된 항체는 용량 분포(dose distribution)를 개선하기 위하여 비라벨된 항체 이후에(Kaminski, M.S. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **19**:3918-3928, 2001) 또는 함께(Press, O.W. *et al.*, *New Engl. J. Med.* **329**:1219-24, 1993) 투여된다. 가장 적절한 조사원들은 뮤린(murine) 또는 키메라인 비라벨된 항체와의 조합으로 방사성라벨된 마우스 항체를 사용한다. 이것은 키메라 항체와 비교하여 그것은 짧은 반감기를 가지기 때문에 독물학적 관점에서 마우스 항체를 방사성라벨이 유리하다고 조사되었다. 긴 반감기를 가지는 단클론 항체는 혈액 및 골수에서 방사성면역접합체의 잔류 시간을 길게 하고 대개 이로 인해 독성을 더 유도한다. 항체가 자체적으로 독성을 유도하므로 마우스 및 키메라의 비라벨된 항체들 모두가 전해지는 바에 의하면 체내 정상 세포들 및 조직들에 항원이 충분히 배어들어 용량 분포를 개선하는데 사용된다(cf. Kaminski, 미국특허 제5,595,721호; Wiseman *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **39**:181-194, 2001).

암의 표적화된 방사성치료요법(방사성면역치료요법; RAIT)에서 단클론 항체들의 사용은 비호지킨스 림프종(NHL)과 같은 혈액학적 질병들에서 충격(striking) 임상 반응을 제공한다. 새로운 전략들은 순환하는 방사성핵종의 전신 독성(systemic toxicity) 및 방사물에 의한 종양들의 감광성(sensitization)을 최소화하는 노력으로 현재 검토 중이다. 먼저 예비표적화(pretargeting)에 의해 수행되어지고 나중에 방사선감수성(radiosensitizing) 약물과의 조합 치료요법으로 수행된다. Govindan, S.V. *et al.*, *Current Trends, Pharmaceutical Science and Technology Today* **3**:90-98, 2000 참조.

RAIT의 항-종양 활성은 주로 불균질 용량 침착(heterogeneous dose deposition)으로 저용량을 방사선 조사를 계속해서 지속적으로 감소하도록 방출하는 항체에 부착되는 방사성라벨의 결합된 방사능에 의한 것이다. 네 개의 방사성라벨된 항체 생성물들은 NHL의 RAIT를 상품화하기 위하여 진행되고 있다. 이들은 ^{131}I -토시투모맵(^{131}I -tositumomab; 벅사TM(BexxarTM)), ^{90}Y -이브리투모맵 티우세탄(^{90}Y -ibrutumomab tiuxetan; 제바린TM(ZevalinTM)), ^{90}Y -에프라투주맵(^{90}Y -epratuzumab, hLL2) 및 ^{131}I -Lym-1을 포함한다. 이들 생성물의 보다 상세한 설명에 관해서는 Goldenberg, D.M., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **39**:195-201, 2001 및 Goldenberg, D.M., *J. Nucl. Med.* **43**:693-713, 2002를 참조한다.

벅사(Corixa Corp., 시애틀, 워싱턴) 및 제바린(IDEC-Y2B8; IDEC Pharmaceuticals, 샌디에고, 캘리포니아주)은 모두 정상 및 악성 B-림프구의 표면에서 발현되는 CD20 항원에 대한 뮤린 단클론 항체이다. 벅사는 한랭(cold) 뮤린 항체와 함께 첨가되는 IgG2a 뮤린 단클론 항체로서 사용되는 반면에, 제바린은 뮤린 항체 라벨되고 생성물에 한랭 인간-마우스 키메라 리투시맵(rituximab)(RituxanTM, IDEC-Genentech)이 첨가된다. 두 가지 생성물 모두 비라벨된 벅사 항체 450mg 1-h 주입 및 제바린과 함께 리투시맵 450mg 4-6h 주입을 포함하는 종양 표적화를 개선하기 위한 예비치료요법 한랭 항체 용량을 제공한다. 두 가지 생성물 모두 항체 자체 보다 더 높고 내구력있는 반응을 보이지만, 용량 한정 독성, 현재한 골수독성(myelotoxicity)을 가진다. 제바린은 회귀성 저등급 또는 형질전환된 B 세포 비호지킨스 림프종의 치료용으로 미국 식품의약국(Food and Drug Administration; FDA)에 의해 승인되었다. 이들 방사성라벨된 항-CD-20 단클론 항체는 종양 부위를 유리하게 하는 한랭 항체들의 용량에 의해 우선되어야 한다. 실제로, ^{111}In -제바린의 특이적 부위 수는 예비복용을 포함하는 경우 특이적 종양 부위들에서 종양 흡수를 78%에서 15%로 떨어뜨린다(Wiseman *et al.*, *ibid*).

에프라투주맵(^{90}Y -에프라투주맵)은 항-CD22 항원에 대한 인간화된 IgG₁ 항체이다. 상기 항원은 항체 결합에서 빠르게 내재화된다. 상기 항체 자체는 난포(follicular)에서 효과를 보일뿐만 아니라 대형 B-세포 림프종(Leonard, J.P. *et al.*, Epratuzumab(hLL2, anti-CD22 humanized monoclonal antibody) is an active and well-tolerated therapy for refractory/relapsed diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma(NHL). *Blood(Suppl)* 96:578a[abstr. 2482], 2000; Press, O.W. *et al.*, Immunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Hematology(Am. Soc. Hematolg Educ. Program)*, p. 221-40, 2001)을 확산하는 것이 보고되었다. 에프라투주맵은 반복용량에 의해 맞추어진 인간 항-인간 항

체들(HAHA)이 발생하는 것을 기대할 수 없다. 마우스 모체 항체인 mLL2는 ^{131}I 로 라벨되고 B-세포 림프종의 여러가지 아형에 효능을 보인다(Linden, O. *et al. Clin. Cancer Res.* **5**:3287s-3291s, 1999). 내재화 이후, ^{131}I -라벨된 항체는 탈할로겐화되고 상기 방사성핵종은 세포로부터 방출된다. 이트루파 같은 방사성금속은 내재화에서 세포 내에 잔존한다(Sharkey, R.M., *et al., Cancer Immunol. Immunother.* **44**:179-88, 1997). ^{90}Y 의 짧은 물리적 반감기는 에프라투주맵의 긴 반감기에 대한 일부 등급에서 상쇄하고, 이들의 조합에 의한 유리(retention)를 제공한다.

RAIT는 대개 단독 주입으로 주어진다. 그러나, O'Donoghue, J.A., *Dosimetric Principles of Targeted Radiotherapy, in Radioimmunotherapy of Cancer*, A.R. Fritzberg(ed.), Marcel Dekker, Inc., p. 1-20, New York, Basel, 2000에 요약되어 있는 대로 분별(fractionation)이 흡수된 용량에서 이종성의 문제를 처리하기 좋기 때문에 분별되는 연구의 이론상 이점이 존재한다. 또한 보다 적은 주입 횟수로 방사성라벨된 항체의 대량 단독 투여를 분할함으로써 치료 반응을 개선시킬 수 있음을 지지하는 실험적 자료가 된다(Schlom, J. *et al., J. Natl. Cancer Inst.* **82**:763-71, 1990). 두 가지뿐만 아니라 다수의 주입을 통한 접근은 마우스 항체들을 사용하여 임상적으로 탐색되어 왔다(DeNardo, G.L., *et al. Cancer Biother. Radiopharm.* **13**:239-54, 1998; Vose, J.M., *et al., J. Clin. Oncol.* **18**:1316-23, 2000).

CD22 항원 발현에서 종양내 변이성이 보고되었다. 다섯 명의 환자들에게서 채취한 신선한 종양 샘플에서, 림프종 세포 52-89%가 항-CD22 MAb HD6에 대한 항원을 생산하는 것이 발견되었다(Press, O.W. *et al., Cancer Res.* **49**:4906-12, 1989). 긴 범위 β -방출자를 사용하는 RAIT의 하나의 추정된 이점은 표적된 세포 주변에서 항원 음성 종양 세포들을 사멸하는 그들의 능력이다. 치료전에 종양 세포들의 항원 발현을 결정함으로써, 항-CD22 ^{90}Y -라벨된 에프라투주맵을 사용하는 RAIT의 세팅에서 이러한 구상의 임상적 타당성을 연구할 수 있다.

용량 분별의 이론상 이점 및 이를 지지하는 공지된 실험 자료를 확인하기 위한 조사가 착수되었다. 이 연구는 방사성라벨된 인간화된 항체를 사용하는 분별된 RAIT의 실행 가능성을 조사하는 것이 목적이었다. 인간화된 CD22 Mab 100mg으로 예비복용한 후에, 방사선량측정 목적을 위하여 ^{111}In 으로 라벨된 에프라투주맵, 이어서 $7.5\text{mCi}/\text{m}^2$ 에 이르는 용량에서 ^{90}Y -라벨된 에프라투주맵의 분별된 용량들을 일주일에 한번씩 2-3주 투여하여 나쁘지 않은 효과적인 방사성면역치료요법의 결과를 발견하였다(Linden *et al., Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17:490 [abstract 47]). 이들 임상적 연구들이 방사성면역접합체의 분별된 치료의 실현가능성을 제시하더라도, 안전성 및 유효성의 관점에서 방사성면역접합체의 단독 고(high)-용량 투여로 인한 비교가 존재하지 않았다. ^{111}In 을 가지는 "방사선량측정(dosimetry)" 용량은 항체 100mg를 함유하고 각각 이어지는 주입 또한 상기 항체 자체 용량을 함유하기 때문에, CD20 항체들을 포함하는 다른 언급된 연구들에서 제시하는 것과 같이 예비복용 효과로 주어지는 에프라투주맵의 총용량이 300mg 이상이 되는 경우에는 결정될 수 없다. 따라서, 이러한 방사성면역치료에서, 특히 CD22 항체들과 함께 반드시 어떠한 예비복용이 필요한지를 이들 연구들로 설명할 수 없었다.

선행기술에서 실시된 것처럼 정상 조직들 및 비장에서 항원 부위를 포화시키기 위하여, 본 발명에서는 다른 공지된 연구들 및 Kaminski의 미국특허 제5,595,721호와 달리 예비복용이 사용되지 않는다. 분명히 본 발명에 개시된 내용은 선행기술에서 실시된 것처럼 높은 항체 예비 복용의 필요성이 결여된 것을 보여준다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 비방사성라벨된 항체, 단편 또는 융합 단백질로 예비복용을 수행하지 않고 치료 조성물을 투여하여 포유동물에서 질병을 치료하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 상기에 기재된 치료방법을 투여면에서 간단하고 쉽게할 뿐만 아니라 치료학적 활성이 잔존하고 종양에 영향을 주는 항체 자체를 보다 고용량으로 사용하지 않고도 동일한 반응율을 가지도록 하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 림프종의 무통형(indolent forms)에만 영향을 주는 선행기술에 의해 증명된 것과는 대조적으로 침투적인 비호지킨스 림프종을 치료하는데 있어서 보다 효과적인 반응을 보이는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 상기 목적들 및 다른 목적들은 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 적어도 하나 이상의 접합된 항체 또는 그 단편 또는 접합된 항체 융합 단백질 또는 그 단편을 포함하는 치료 조성물을 동시에 또는 순차적으로 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 포유동물에서의 질병을 치료하기 위한 방법을 제공함으로써 본 발명의 구현예에 의해 완성되며, 여기에

서 비방사성라벨된 항체, 단편 또는 융합 단백질로 예비복용을 수행하지 않는다. 상기 비접합된 항체, 단편 또는 융합 단백질은 표적 이탈(target escape)로부터 종양 세포를 보존하는 지속 치료요법으로서 접합된 항체, 단편 또는 융합 단백질과 함께 선택적으로 첨가된다.

바람직한 구현예에서, 본 발명은 B-세포 관련 악성종양들과 같은 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 게다가, 본 발명에 의한 방법은 또한 T-세포 관련 악성종양들뿐만 아니라 자가면역 질병을 치료하는 데에도 유용하다.

또 다른 구현예에서, 본 발명의 접합된 및 비접합된 항체들, 단편들 및 융합 단백질들은 CD3, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, Ia, HMI.24, HLA-DR, 테나신(tenascin), MUC1 및 혈관내피 성장인자(VEGF) 및 태반 성장인자(PIGF)와 같은 혈관 내피 항원들을 포함하는 B-세포 종양 결합 항원들로 이루어진 군에서 선택된 항원에 대항하여 표적화될 수 있다. 혈관과 관련하여, 본 발명에 의한 접합된 및/또는 비접합된 항체들, 단편들 또는 융합 단백질들은 동일하거나 또는 다를 수 있다. 게다가, 이들 항체들은 인간, 뮤린, 키메라, 인간이하의 영장목화(subhuman primatized) 또는 인간화될 수 있다. 더욱이, 이들 항체들, 단편들 또는 융합 단백질들은 온전한 IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, scFvs, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 또는 테트라바디(tetrabodies)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 하나 이상의 치료제와 접합될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면에 의해서 상기 기재된 방법이 제공되고, 여기에서, 인간 및 가축 또는 반려동물과 같은 포유동물 환자들은 약물, 독소, 면역조절제, 길레이터, 붕소 화합물, 광역학 제제 및 방사성핵종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 치료제와 접합된 하나 또는 그 이상의 항체들과 함께 치료된다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 치료 조성물은 항체들 또는 면역조절제와 결합된 항체들의 결합에 의한 융합 단백질을 포함한다. 상기 융합된 항체들은 다른 항원들 뿐만 아니라 동일한 항원의 다른 에피토프들에 대한 항체들을 포함할 수 있다.

상기에서 언급된 방법도 본 발명의 범주에 속하며, 여기에서 접합된 및 비접합된 항체는 비경구적으로 포유동물에 투여되는 항-CD22 단클론 항체이며, 바람직한 투여량은 복용당 20-600mg 단백질이며, 보다 바람직하게는 복용당 20-150mg 단백질이고, 가장 바람직하게는 복용당 20-100mg 단백질이 적절하다. 또한 포유동물이 바람직하게는 복용당 20-150mg 단백질 및 보다 바람직하게는 복용당 20-100mg 단백질의 반복된 비경구적 복용량으로 항-CD22 항체를 수령할 수 있다. 이러한 복용은 Juweid *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5:3292s-3303s, 1999(여기에서는 ¹¹¹In 또는 다른 진단용 동위원소와 결합된 CD22 Mab 50mg의 사전복용이 요구된다)에 의하여 먼저 실시된 것과 같이 치료를 개선하거나 또는 선량측정 목적을 위하여 어떠한 예비복용을 요구하지 않고 실제 치료적 복용으로 주어진다. 예비복용하는 섭생없이 바로 효과적이 되는 항체의 다양한 단백질 복용량과 함께 치료 방사성면역접합체의 능력을 평가하기 위한 상기의 연구들에서 시도되지 않았다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 포유동물에서 질병을 치료하기 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 적어도 하나 이상의 표적 항원 및 치료제에 결합하는 다특이성 다가 항체, 단편 또는 융합 단백질 접합체를 포함하는 치료 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 비방사성라벨된 항체로 예비복용하는 과정을 수행하지 않는다.

또 다른 구현예에서, 포유동물에서 질병을 치료하는 방법은 하기 단계들을 포함한다:

- (a) 적어도 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 다특이성 다가 항체, 단편 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물을 포유동물에 투여하는 단계;
- (b) 선택적으로, 혈액순환에서 비-국부적 항체들을 제거하기 위한 조성물을 허용하는 제거제를 사용하는 단계; 및
- (c) 다특이성 다가 항체, 단편 또는 융합 단백질에 결합하는 치료 접합체의 약제학적 유효량을 포유동물에 투여하는 단계.

여기에서 비방사성라벨된 항체로 예비복용하는 과정을 수행하지 않는다.

본 발명의 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 상세한 설명 및 첨부된 청구항들에 의해 명백해질 것이다.

1. 용어정의

이어지는 설명에서, 많은 수의 용어들이 사용되었고, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 상기 용어들을 아래와 같이 정의하였다.

비호지킨스 림프종(NHL)은 임파선, 비장, 다른 기관들 및 종종 골수를 포함하는 림프종 질병의 집합을 말한다. NHL의 적어도 30여종의 다른 유형이 존재한다. 두 가지의 일반 유형들은 소포(저등급 또는 무통) 및 침투적인 미만성 대세포(diffuse large cell)(중간물질 또는 고등급) 림프종들이다.

본 발명에 기재된 항체는 온-길리(자연적으로 발생하거나 또는 정상 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정에 의해 생성된 것이다) 면역글로불린 분자(IgG 항체 등) 또는 항체 단편과 같이 면역글로불린 분자의 면역적인 활성(특이적으로 결합하는) 부분을 말한다.

항체 단편은 F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv와 같은 항체의 일부이다. 구조에 관계없이, 항체 단편은 온전한 항체에 의해 인지되는 동일 항원과 결합한다. 예를 들면, 항-CD22 단클론항체 단편은 CD22의 에피토프에 결합한다. 또한 용어 "항체 단편"은 복합체를 생성하기 위하여 특이 항원과 결합하여 항체와 같은 역할을 하는 어떤 합성적 또는 유전적으로 제조한 단백질을 포함한다. 예를 들면, 항체 단편들은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 구성하는 "Fv" 단편; 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩타이드 링커("scFv 단백질")에 의해 연결되는 재조합 단일쇄 폴리펩타이드 분자; 및 과가변 영역(hypervariable region)에 흡사한 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인지부와 같이 가변 영역을 구성하는 분리된 단편을 포함한다.

항체 자체 또는 환형 항체는 일반적으로 치료제에 접합되지 않은(비접합된) 순수한 항체를 말한다. 항체 분자의 Fc 부분이 상보적 고착 및 ADCC(항체 의존 세포 독성) 등의 작동체 기능을 제공하기 때문에, 항체 자체가 세포를 용해하는 활성으로 대사한다. 그러나, Fc 부분은 작용이 일어나는 세포자기사멸과 같은 다른 대사작용을 가지는 치료적 기능을 요구하지 않을 수 있다. 또한 항체 자체는 인간이하의 영장목화된, 키메라, 인간화된 또는 인간 항체 등의 특정 재조합 항체들뿐만 아니라, 다클론 및 단클론 항체를 모두 포함하는 비방사성라벨된 항체들이다.

키메라 항체는 하나의 종에서 유래되는 항체, 바람직하게는 설치류 항체의 상보성 결정 영역(complementarity determining regions; CDRs)을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 재조합 단백질이며, 반면에 항체 분자의 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래된다. 수의사가 이용할 경우, 상기 키메라 항체의 특정 도메인은 고양이 또는 개와 같은 다른 종으로부터 유래될 수 있다.

인간화된 항체는 하나의 종에서 유래된 항체의 CDRs를 가지는 재조합 단백질이고, 설치류 항체를 예로 들면, 설치류 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬을 인간의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인으로 전달시킨 재조합 단백질이다. 항체 분자의 특정 도메인들은 인간 항체로부터 유래된 것이다.

인간 항체는 항원 면역성검사에 반응하는 특이 인간 항체를 제조하기 위해 "제작"된 형질전환 마우스로부터 획득한 항체이다. 이러한 기술에서, 인간 중쇄 및 경쇄 자리의 성분은 내생적인 중쇄 및 경쇄 자리의 표적화된 분열을 가지는 배아 줄기 세포주에서 유래된 쥐의 세포주로 도입된다. 상기 형질전환 쥐는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있으며, 인간 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는데 사용할 수 있다. 형질전환 마우스로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Green *et al.*, *Nature Genet.* **7**: 13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* **368**: 856 (1994), 및 Taylor *et al.*, *Int. Immun.* **6**:579 (1994)에 기재되어 있다. 또한 온전한 인간 항체는 파지 전시 기술(phage display technology) 및 유전자 또는 염색체 형질감염 방법 등 당업계에 알려진 방법에 의해 제작된다. 생체 밖에서 비면역화된 도너(donor)에서 유래하는 면역글로불린 가변 도메인 유전자로부터 인간 항체 및 그 단편을 제조하는 방법은 McCafferty *et al.*, *Nature* **348**: 552-553 (1990)를 참고한다. 상기 기술에서, 항체 가변 도메인 유전자들은 필라멘트 박테리오파지의 주요한 또는 부수적 외피단백질(coat protein) 유전자의 프레임내에 클론되고, 파지 입자의 표면에서 기능성 항체 단편으로 전시된다. 필라멘트 입자는 파지 계놈의 단일 가닥 DNA 복사본을 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성들에 기초한 선택은 이러한 특성들을 보이는 항체를 인코딩하는 유전자의 선택으로 인한 것이다. 이런 방법에서, 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 전시는 전체 구성의 다양성으로 수행될 수 있으며, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* **3**: 5564-5571 (1993)에 개시되어 있다.

또한, 인간 항체들은 생체 밖에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다. 미국특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.

치료제는 항체 부분 또는 항체부분에 접합된 것으로, 즉 항체 또는 항체 단편, 또는 서브단편과 개별적으로, 동시에 또는 순차적으로 투여되는 분자 또는 원자이며, 질병의 치료에 유용하다. 치료제의 예로는 항체, 항체 단편, 약물, 독소, 핵산가수분해효소(nuclease), 호르몬, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 화합물, 광활성(photoactive) 제제 또는 염료, 및 방사성동위원소를 포함한다.

면역조절제는 인체의 면역 체계를 현존, 변화, 억제하거나 또는 촉진시키는 본 발명에서 정의된 치료제이다. 일반적으로, 본 발명에서 사용하는 면역조절제는 대식세포(macrophage), B-세포, 및/또는 T-세포와 같은 면역반응 캐스캐이드(immune response cascade)에서 증식하거나 활성화되는 면역세포들을 자극한다.

면역접합체(immunoconjugate)는 치료제 또는 진단제와 항체 성분의 접합체이다. 상기 진단제는 방사성 또는 비방사성 라벨, 조영제(자기공명영상화, 컴퓨터단층촬영(computed tomography) 또는 초음파를 위한 것)를 포함하고, 방사성 라벨은 감마-, 베타-, 알파-, 오제 전자- 또는 양전자 방출 동위원소일 수 있다.

발현벡터는 숙주세포에서 발현되는 유전자를 포함하는 DNA 분자이다. 일반적으로, 유전자 발현은 본질적 또는 유도적 프로모터(promoter)를 포함하는 특정 조절인자, 조직-특이적 조절인자 및 증가제의 조절하에서 발생된다. 상기 유전자는 조절인자에 "조절가능하게 결합된" 것을 일컫는다.

재조합 숙주(recombinant host)는 클로닝 벡터 또는 발현벡터를 함유하는 원핵(prokaryotic) 또는 진핵(eukaryotic) 세포일 수 있다. 또한, 상기 용어는 숙주세포 또는 숙주세포의 세포내 염색체 또는 게놈에 클로닝된 유전자를 함유하도록 유전적으로 변형된 형질전환동물(transgenic animal) 뿐만 아니라 원핵 또는 진핵세포를 포함한다. 적절한 포유류 숙주세포는 SP2/0세포와 같은 골수종 세포(myeloma cell) 및 NS0 세포 뿐만 아니라 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포, 하이브리도마(hybridoma) 세포주 및 항체들을 발현하는데 유용한 다른 포유류 숙주세포를 포함한다. 또한, 국제공개특허 제WO 0063403 A2호에 개시된 인간 세포주인 PER.C6이 MAbs 및 다른 융합 단백질을 발현하는데 유용하며, 이는 종래의 포유류 세포주인 CHO, COS, Vero, Hela, BHK, 및 SP2-세포주와 비교하여 2-200 배 이상의 재조합 단백질을 생성한다. 변형된 면역시스템을 갖는 특정 형질전환 동물들은 온전한 인간 항체들을 제조하는데 유용하다.

본 발명에서 사용한 항체 융합 단백질은 둘 또는 그 이상의 같거나 다른 단일쇄 항체 또는 같거나 다른 특이성을 갖는 항체 단편 시편이 결합된 항원-결합 분자를 재조합으로 생성하는 것이다. 융합 단백질의 원자가는 융합 단백질이 가지는 단일 항원 또는 에피토프에 있는 팔 또는 부위의 전체 결합수이며, 즉 일가, 이가, 삼가 또는 다가이다. 항체 융합 단백질의 다가는 항원에 결합하는데 다중 상호인력의 장점을 가질 수 있음을 의미하며, 따라서 항원에 대한 결합의 갈망을 증가시킨다. 특이성은 항체 융합 단백질이 얼마나 많은 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있는지를 의미하는 것이며; 일특이성, 양특이성, 삼특이성, 다특이성이 있다. 상기의 정의를 사용하여 천연 항체, 예를 들어, IgG는 2개의 결합 팔을 갖고 있기 때문에 이가이지만, 하나의 에피토프에 결합되기 때문에 일특이성이다. 일특이성, 다가 융합 단백질은 하나의 에피토프에만 결합하고, 에피토프에 대한 하나 이상의 결합 부위를 가지며, 예를 들어 두 개의 결합 부위들을 가지는 디아바디(diabody)는 동일한 항원과 반응한다. 융합 단백질은 단일 항체 성분, 상이한 항체성분의 다가 또는 다특이성 조합 또는 동일한 항체 성분의 여러 복제본을 포함할 수 있다. 융합 단백질은 부가적으로 항체 또는 항체 단편 및 치료제를 포함할 수 있다. 이러한 융합 단백질에 대한 적절한 치료제의 예로는 면역조절제("항체-면역조절제 융합 단백질") 및 독소("항체-독소 융합 단백질")를 포함한다. 하나의 바람직한 독소는 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)를 포함하며, 바람직하게는 재조합 RNase를 포함한다.

다특이성 항체는 2개의 상이한 항원들, 동일한 항원의 2개의 상이한 에피토프, 또는 부착소 및/또는 항원 또는 에피토프와 같이 상이한 구조를 가지는 적어도 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 하나의 특이성은 B-세포, T-세포, 골수(myeloid)-, 플라즈마- 및 비만세포(mast cell) 항원 또는 에피토프를 위한 것일 수 있다. 또 다른 특이성은 CD3, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, Ia, HMI.24, HLA-DR, 테나신(tenascin), MUC1 및 혈관내피 성장인자(VEGF) 및 태반 성장인자(PlGF)와 같은 혈관 내피 항원들을 포함하는 B-세포 종양 결합 항원과 같이 동일한 세포 유형에 있는 상이한 항원을 위한 것일 수 있다. 다특이성, 다가 항체들은 하나 이상의 결합부위를 갖는 구조이고, 결합부위는 상이한 특이성을 갖는다. 예를 들어, 디아바디(diabody)는 하나의 결합 부위가 하나의 항원과 반응하고, 다른 하나 또 다른 항원과 반응한다.

양특이성 항체는 상이한 구조인 2개의 표적들에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 양특이성 항체(bsAb) 및 양특이성 항체 단편(bsFab)는 예를 들어 B-세포, T-세포, 골수(myeloid)-, 플라즈마- 및 비만 세포(mast cell) 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 팔 및 치료제 또는 진단제를 갖는 표적화할 수 있는 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 다른 하나 이상의 팔을 갖는다. 양특이성 융합 단백질의 다양성은 분자공학(molecular engineering)을 사용하여 생성될 수 있다. 하나의 형태로, 양특이성 융합 단백질은 하나의 항원에 단일 결합 부위를 가지는 scFv 및 두번째 항원에 단일 결합 부위를 가지는 Fab 단편으로 이루어진 이가이다. 또 다른 형태로, 양특이성 융합 단백질은 하나의 항원에 대한 결합 부위를 가지는 IgG 및 두번째 항원에 대한 2개의 결합 부위를 가지는 두 개의 scFv로 이루어진 2가이다.

개화된(Caninized) 또는 고양이화된(felinized) 항체들은 단클론 항체(MAb)의 설치류(rodent) 상보성-결정 영역이 설치류(또는 다른 종) 면역글로불린(Immunoglobulin)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터 각각 개 또는 고양이 면역글로불린 가변 도메인으로 전이된 재조합 단백질들이다.

인간이하의 영장목화된 항체들은 단클론 항체의 인간이하의 영장목(예를 들면, 원숭이) 상보성-결정 영역이 설치류(또는 다른 종) 면역글로불린의 가변중쇄 및 가변경쇄로부터 인간이하의 영장목 면역글로불린 가변 도메인으로 전이된 재조합 단백질들이다.

가축(domestic animals)은 반려동물(Companion animal) 뿐만 아니라, 말, 소, 양, 염소, 라마(llamas), 알파카스(alpacas) 및 돼지류와 같은 큰 동물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서 가축은 말이다.

반려동물은 애완동물처럼 길러온 동물을 포함한다. 예로는 기니아피그(guinea pig), 햄스터, 쥐 및 흰담비(ferret)와 같은 작은 설치류동물도 포함되지만, 주로 개 및 고양이이고, 원숭이와 같은 인간이하의 영장목도 포함된다. 바람직한 실시형태에서 반려동물은 개 또는 고양이이다.

용어 "제거제(clearing agent)"는 표적하는 부분의 결합 부위에 결합하는 항체를 말하고, 여기에서 표적하는 부분은 항체, 항원-결합 항체 단편 또는 비-항체 표적 부분이 될 수 있다. 보다 바람직한 방법에서, 상기 제거제는 미국특허출원 제 08/486,166호에 기재된 첫번째 단계에서 사용하는 접합체의 단클론 항체에 대한 항-개체특이형(anti-idiotypic) 단클론 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 제거제는 간에서 아사이알로당단백질(asialoglycoprotein) 수용체에 의한 순환으로부터 빠르게 제거되는 제거제를 허용하는 갈락토오스와 같은 탄수화물의 많은 잔기들로 치환된다.

2. 키메라, 인간화된 및 인간 항체들을 포함하는 단클론 항체들의 제조

단클론 항체(MAb)는 특정 항원에 대한 항체들의 동질 집단(homogeneous population)이고, 상기 항체는 항원 결합 부위의 하나의 유형만을 포함하며 항원 결정에 따른 하나의 에피토프에 결합한다.

특이 항원에 대한 설치류의 단클론 항체는 당업계에 잘 알려진 방법으로 획득할 수 있다. Kohler and Milstein, *Nature* **256**: 495(1975) 및 Coligan *et al.*(eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, 2.5.1-2.6.7 쪽(John Wiley & Sons 1991)[이하 "Coligan"이라 한다] 참조. 간단하게, 단클론 항체는 항원을 포함하는 조성물을 쥐에 주사하는 단계, 혈청 검체를 제거하여 항체 생산의 유무를 확인하는 단계, B-림프구를 얻기 위하여 비장을 제거하는 단계, 하이브리도마를 제조하기 위해 B-림프구와 골수종 세포를 융합하는 단계, 하이브리도마를 클로닝하는 단계, 항원에 대한 항체를 생산하는 양성 클론을 선별하는 단계, 항원에 대한 항체를 생산하는 클론을 배양하는 단계, 및 하이브리도마 배양으로부터 항체를 분리하는 단계를 거쳐 제조할 수 있다.

MAbs는 다양하게 알려진 기술에 의해 하이브리도마 배양으로부터 분리 및 정제할 수 있다. 이러한 분리 기술은 단백질-A 세파로오스(Sepharose)를 이용한 친화성 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 및 이온교환 크로마토그래피를 포함한다. Coligan의 2.7.1-2.7.12쪽 및 2.9.1-2.9.3 쪽 참조. 또한 Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G(IgG)", in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, 79-104 쪽(The Humana Press, Inc. 1992) 참조.

면역원에 대한 항체의 초기 이입 후, 항체들은 재조합 기술에 의해 서열화되고 순차적으로 제조될 수 있다. 무린 항체 및 항체 단편의 인간화 및 키메라화는 당업계에 잘 알려진 통상적인 기술로 수행하였다. 예를 들면, 인간화된 단클론 항체들은 마우스 면역글로불린의 가변중쇄 및 가변경쇄에서 인간 가변 도메인으로 마우스 상보성 결정 영역을 전이시킨 다음, 무린 복사물들의 구조 영역에서 인간 잔기들을 치환하여 제조된다. 인간화된 단클론 항체들로부터 유래된 항체 구성성분의 이용은 무린 특정 영역의 면역원성과 결부되는 잠재적 문제들을 예방한다.

뮤린 면역글로불린 가변 도메인을 클로닝하는 일반적인 기술은 Orlandi *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**: 3833 (1989)에 공개되어 있으며, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 키메라 항체들을 제조하는 기술들은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 보면, Leung *et al.*, *Hybridoma* **13**: 469(1994)에는 LL2 단클론 항체인 항-CD22 항체의 V_K 및 V_H 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 각각 인간의 κ 및 IgG_1 특정 영역 도메인과 조합하여 LL2 키메라를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 또한 이 공개문헌은 각각 LL2 경쇄 및 중쇄 가변 영역인 V_K 및 V_H 의 뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 인간화된 MABs를 제조하기 위한 기술들은 Jones *et al.*, *Nature* **321**:522(1986), Riechmann *et al.*, *Nature* **332**: 323(1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* **239**:1534(1988), Carter *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**: 4285(1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* **12**:437(1992) 및 Singer *et al.*, *J. Immun.* **150**:2844(1993)에 기재되어 있으며, 각각을 본 명세서에 참고자료로 통합하여 수록하였다.

키메라 항체는 설치류 항체와 같이 동물의 한 종에서 유래되는 CDRs를 포함하는 가변 도메인을 함유하는 재조합 단백질이나, 항체 분자의 나머지 부분, 즉 특정 도메인은 인간 항체로부터 유래한다. 따라서, 키메라 단클론 항체는 또한 키메라 MAb의 가변 도메인내 뮤린 FR 서열을 하나 또는 그 이상의 다른 인간 FR과 교체하여 인간화될 수 있다. 특히, 마우스 CDRs는 마우스 면역글로불린의 가변 중쇄 및 가변 경쇄로부터 인간 항체의 대응하는 도메인으로 전이된다. 마우스 CDRs가 인간 FRs로 간단히 전달되어 종종 항체 친화력의 감소 또는 손실이 발생하기 때문에, 뮤린 항체의 근본 친화력을 회복하기 위하여 부가적 변형이 요구된다. FR 영역내 하나 또는 그 이상의 인간 잔기를 그들의 뮤린 대조물과 교체하여 그것의 에피토프에 대한 우수한 결합 친화력을 가지는 항체를 획득할 수 있다. Tempest *et al.*, *Biotechnology* **9**:266(1991) 및 Verhoeyen *et al.*, *Science* **239**:1534 (1988) 참조. 또한 특이적 에피토프에 대한 인간화된, 키메라 및 인간 MAb의 친화력은 CDRs의 돌연변이로 인해 증가될 수 있고, 항체의 낮은 복용량은 돌연변이 이전의 낮은 친화력 MAb의 높은 복용량으로 효과를 나타낼 수 있다. 국제공개특허 제WO0029584 A1호 참조.

본 발명에 의한 항체를 제조하는 또 다른 방법은 형질전환 가축의 모유에서 생성할 수 있다. Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, **63**: 141-147, 1998; 미국특허 제5,827,690호를 참조; 모두 명세서에서 참고자료로 통합 수록하였다. 각각 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 쌍을 인코딩하는 DNA 단편을 가지는 두 개의 DNA 구조물을 제조한다. 상기 DNA 단편은 포유동물 상피 세포에서 선택적으로 발현하는 프로모터 서열을 가지는 발현 벡터로 클론된다. 실시예에서는 토끼, 소 및 양 카제인 유전자 유래의 프로모터, 소의 α -락토글로불린 유전자, 양의 β -락토글로불린 유전자 및 쥐의 유장산 단백질 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 삽입 단편은 포유동물 특이 유전자 유래의 동종 계놈 서열에 의해 3' 측면에 위치한다. 이것은 폴리아데닐화 부위 및 전사 안정화 서열을 제공한다. 상기 발현 카세트는 수정된 포유동물 난자의 전핵(pronuclei)으로 보주조사한 다음, 수령 암컷의 자궁으로 이식한 후 잉태된다. 출생 후 자손은 써던(Southern) 분석에 의해 양쪽 형질전환체 존재하에 스크리닝된다. 항체가 존재하기 위해서는, 중쇄 및 경쇄 유전자가 모두 같은 세포에서 동시에 발현되어야 한다. 형질전환 암컷에서 유래된 모유는 당업계에 알려진 표준 면역학적 방법으로 항체 또는 항체 단편의 존재 및 가능성이 분석된다. 상기 항체는 당업계에 알려진 표준 방법을 이용하여 모유로부터 정제할 수 있다.

본 발명의 온전한 인간 항체, 즉 인간화된, 키메라 또는 인간 항-CD20 항체들을 이용하여 조합 치료를 하기 위한 인간 항-CD20 MABs, 또는 항-CD19, 항-CD22, 항-CD21 또는 항-CD23 MABs와 같은 다른 인간 항체들은 형질전환 비인간 동물에서 얻을 수 있다. Mendez *et al.*, *Nature Genetics*, **15**:146-156 (1997); 미국특허 제5,633,425호 참조; 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 예를 들면, 인간 항체는 인간 면역글로불린 부위를 가지는 형질전환 마우스에서 생성된다. 마우스 체액성 면역 시스템은 내재적 면역글로불린 유전자의 불활성화 및 인간 면역글로불린 부위 도입을 통해 인간화된다. 인간 면역글로불린 부위는 엄청난 복합체이고, 인간 계놈의 거의 0.2%를 차지하는 많은 수의 분리성 단편을 포함한다. 항체의 적절한 레퍼토리를 생성하는 특성이 있는 형질전환 마우스를 확보하기 위하여, 인간 중쇄 및 경쇄 부위의 큰 부분은 마우스 계놈으로 도입되어야 한다. 생식세포주(germline) 내에 인간 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 부위를 가지는 효모 인공 염색체(YACs)의 생성을 시작으로 순차적 과정을 거쳐 수행한다. 각각 약 1Mb 크기로 삽입되기 때문에, YAC 구조물은 면역글로불린 부위의 겹쳐지는 단편의 동종 재조합을 요구한다. 중쇄 부위를 갖는 것과 경쇄 부위를 갖는 두 개의 YACs를 마우스의 배아 줄기 세포와 함께 YAC를 함유하는 효모 등형질체(spheroplast)의 융합을 통해 개별적으로 마우스에 도입한다. 배아 줄기 세포 클론들은 마우스 배반포(blastocyst)로 미세주입된다. 결과적으로 키메라 수컷은 그들의 생식세포주를 통해 YAC를 전이하는 능력에 의해 스크리닝되고, 뮤린 항체 생성에서 마우스 결합을 낳는다. 중쇄 부위를 갖는 것과 경쇄 부위를 갖는 다른 것, 두 개의 형질전환 균주가 생성되어, 면역반응을 하는 인간 항체들을 생산하는 자손을 창출한다.

게다가 최근 양특이성 MAB를 제조하는 방법은 일반적인 면역글로불린 동위원소 보다 더 강한 교차결합을 위하여 부가적 시스템인 잔기를 가지는 재조합 MABs 기술을 포함한다. FitzGerald *et al.*, *Protein Eng.* **10**(10):1221-1225, 1997 참조. 또 다른 접근은 이중 특이성을 필요로 하는 둘 또는 그 이상의 다른 단일 사슬 항체 또는 항체 단편에 결합하는 재조합

융합 단백질 기술이다. Coloma *et al.*, *Nature Biotech.* **15**: 159-163, 1997 참조. 양특이성 융합 단백질의 변이성은 분자 공학을 이용하여 제조될 수 있다. 또 하나의 형태로, 양특이성 융합 단백질은 하나의 항원에 대한 단일 결합 부위를 가지는 scFv 및 두 번째 항원에 대한 단일 결합 부위를 가지는 Fab 단편으로 이루어지는 일가이다. 또 다른 형태로, 양특이성 융합 단백질은 하나의 항원에 대한 두 개의 결합 부위를 가지는 IgG 및 두 번째 항원에 대한 두 개의 결합 부위를 가지는 두 개의 scFv로 이루어진 이가이다.

둘 또는 그 이상의 다른 단일 사슬 항체 또는 항체 단편을 연결하는 양특이성 융합 단백질은 동일한 방법으로 제조된다. 재조합 방법은 융합 단백질 변이체를 만드는데 사용된다. 예를 들면, 인간화된 단클론항체 항-CD20 항체에서 유래된 Fab 단편 및 뮤린 항-diDTPA에서 유래된 scFv를 포함하는 융합 단백질을 제조할 수 있다. GGGs와 같은 유동성 연결기는 scFv를 항-CD20 항체 중쇄의 특정 영역에 연결한다. 선택적으로 scFv는 또 다른 인간화된 항체 경쇄의 특정 영역에 연결될 수 있다. scFv에서 Fd 중쇄의 프레임내 연결을 위하여 필요한 적절한 연결기 서열이 PCR 반응을 통해 VL 및 VK 도메인으로 도입된다. 그런 다음 scFv를 인코딩하는 DNA 단편은 CH1 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 스테이징 벡터(staging vector)로 결합된다. 생성된 scFv-CH1 구조물은 절단된 후 항-CD20 항체의 VH 영역을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 벡터로 결합된다. 생성된 벡터는 양특이성 융합 단백질의 발현을 위하여 포유동물 세포와 같이 적당한 숙주 세포를 형질감염하는데 사용될 수 있다.

이러한 이가 및 양특이성 항체들의 예는 2002년 8월 1일자로 출원된 미국 특허출원 제60/399,707호; 2002년 3월 1일자로 출원된 미국 특허출원 제60/360,229호; 2002년 6월 14일자로 출원된 미국 특허출원 제60/388,314호; 및 2002년 4월 5일자로 출원된 미국 특허출원 제10/116,116호에서 발견할 수 있으며, 본 명세서에서 참고자료로 통합 수록하였다.

3. 항체 단편의 제조

특이적 에피토프를 인지하는 항체 단편들은 알려진 기술에 의해 제조할 수 있다. 항체 단편들은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv와 같이 항원에 결합하는 항체의 일부이다. 다른 항체 단편들은 항체 분자의 펩신 소화로 인해 생성되는 F(ab')₂ 단편들 및 F(ab')₂ 단편들의 이황화물 결합이 환원되어 생성되는 Fab' 단편들을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 선택적으로 Fab' 발현 라이브러리는 요구되는 특이성을 가지는 단클론 Fab' 단편을 빠르고 쉽게 동정하여 제조될 수 있다 (Huse *et al.*, 1989, *Science*, **246**: 1274-1281). 본 발명에서는 항체들 및 항체 단편들을 포함한다.

단일 사슬 Fv 분자(scFv)는 VL 도메인 및 VH 도메인을 포함한다. VL 및 VH 도메인은 표적 결합 부위를 생성하기 위해 결합된다. 이들 두 도메인들은 펩타이드 연결기(L)에 의해 공유결합으로 연결된다. scFv 분자는 VL 도메인이 scFv 분자의 N-말단 부분이면 VL-L-VH로 표시되고, VH 도메인이 scFv 분자의 N-말단 부분이면 VH-L-VL로 표시된다. scFv 분자를 제조하고 적당한 펩타이드 연결기를 제작하는 방법은 미국특허 제4,704,692호 및 제4,946,778호, R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol **9**:73-80(1995) 및 R.E. Bird and B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions", TIBTECH, Vol **9**:132-137(1991)에 기재되어 있으며, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.

항체 단편은 온킬이 항체를 단백질 가수분해하거나 또는 *E. coli* 또는 상기 단편을 코딩하는 DNA의 또 다른 숙주에서 발현하여 제조할 수 있다. 항체 단편은 통상적인 방법에 의해 온킬이 항체를 펩신 또는 파파인 소화하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 항체 단편은 F(ab')₂로 표시되는 5S 단편을 생성하기 위해 펩신과 항체를 효소분해하여 제조할 수 있다. 이 단편은 티올 환원제를 사용하여 더 분해할 수 있으며, 선택적으로 설피드릴(sulfhydryl)기를 위한 차단기가 다이설피이드 결합을 분해하여 3.5S Fab' 일가 단편을 제조한다. 선택적으로 파파인을 사용하는 효소 분해는 두 개의 일가 Fab 단편 및 하나의 Fc 단편을 직접 제조한다. 이러한 방법은 Goldenberg에 의한 미국특허 제4,036,946호 및 제4,331,647호에 기재되어 있으며, 본 발명에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 또한 Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.* **89**: 230(1960); Porter, *Biochem. J.* **73**:119(1959), Edelman *et al.*, in METHODS IN ENZYMOLOGY, Volume 1, p. 422(Academic Press 1967), 및 Coligan 2.8.1-2.8.10쪽 및 2.10.-2.10.4쪽 참조.

항체 단편의 또 다른 형태는 단일 상보성 결정 영역(CDR)을 코딩하는 펩타이드가다. CDR은 항체와 결합하고 가변 영역의 잔여부분 보다 더 많이 가변적인 에피토프에 구조적으로 상보적인 항체 가변 영역의 단편이다. 따라서, CDR을 때때로 고도 가변 영역(hypervariable regions)이라고 일컫는다. 가변 영역은 CDRs를 포함한다. CDR 펩타이드는 대상 항체의 CDR을 인코딩하는 구조 유전자에 의해 제조할 수 있다. 이러한 유전자는 항체 생성 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하는 중합효소연쇄반응을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, Larrick *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **2**: 106(1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in MONOCLONAL

ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter *et al.*(eds.), 166-179쪽 (Cambridge University Press 1995); 및 Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch *et al.*, (eds.), 137-185쪽(Wiley-Liss, Inc. 1995) 참조.

일가 경쇄-중쇄 단편을 생성하기 위하여 중쇄를 분리하는 것과 같이 항체를 분해하는 다른 방법, 더 나아가 단편을 분해 하거나, 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술이 상기 단편을 항체 상호작용에 의하여 인지되는 항원에 장기간 결합 하도록 사용될 수 있다.

4. 다특이성 및 다가 항체

또한 본 발명에 기재된 조합 치료에서 사용하기 위하여 다른 특이성들을 가지는 다른 항체들 뿐만 아니라 다특이성 항체 (CD20 에피토프 또는 항원에 대한 적어도 하나 이상의 결합 부위 및 CD20의 다른 에피토프 또는 또 다른 항원에 대한 적어도 하나 이상의 결합부위를 포함) 및 다가 항체(같은 에피토프 또는 항원에 다수의 결합 부위를 포함)로 제조될 수 있다.

본 발명에서는 표적화된 세포 지표에 특이적으로 결합하는 적어도 하나 이상의 결합 영역 및 표적화할 수 있는 접합체에 특이적으로 결합하는 적어도 하는 이상의 다른 결합 영역을 가지는 양특이성 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 상기 표적 화할 수 있는 접합체는 양특이성 항체 또는 항체 단편의 적어도 하나 이상의 결합 영역에 의해 인지되는 적어도 하나 이상 의 에피토프를 포함하거나 또는 생산하는 담체 부분을 포함한다.

상기에 기재된 양특이성 항체들 및 항체 단편들을 제조하는데 다양한 재조합 방법을 사용할 수 있다.

상기 다가 항체 또한 본 발명의 범주에 속한다. 다가 표적 결합 단백질은 첫 번째 및 두 번째 폴리펩타이드의 결합으로 구 성된다. 첫 번째 폴리펩타이드는 첫 번째 단일 사슬 Fv 분자가 첫 번째 면역글로불린류의 도메인에 공유적으로 연결되는 것을 포함하며, 바람직하게는 면역글로불린 경쇄 가변 영역 도메인에 연결되는 것을 포함한다. 두 번째 폴리펩타이드는 두 번째 단일 사슬 Fv 분자가 두 번째 면역글로불린류의 도메인에 공유적으로 연결되는 것을 포함하며, 바람직하게는 면역글 로불린 중쇄 가변 영역 도메인에 연결되는 것을 포함한다. 첫 번째 및 두 번째 단일 사슬 Fv 분자는 각각 표적 결합 부위를 생성하고, 첫 번째 및 두 번째 면역글로불린류의 도메인은 세 번째 표적 결합 부위를 생성하는데 관여한다.

VL-L-VH 접합을 가지는 단일 사슬 Fv 분자는 VH-L-VL 접합을 가지는 또 다른 단일 사슬 Fv 분자와 결합하여 이가 다이머를 생성한다. 이 경우, 첫 번째 scFv의 VL 도메인 및 두 번째 scFv 분자의 VH 도메인이 결합하여 하나의 표적 결합 부위를 생성하는 반면에, 첫 번째 scFv의 VH 도메인 및 두 번째 scFv 분자의 VL 도메인이 결합하여 다른 표적 결합 부위 를 생성한다.

본 발명의 또 다른 구현에는 두 개가 하나의 표적에 대한 친화력을 가지고 세번째 진단제 및/또는 치료제를 위한 담체를 제조 및 부착할 수 있는 부착소에 대한 친화력을 가지는 세 개의 결합부위를 생성하기 위해 비공유로 결합된 두 개의 이중 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 양특이성, 삼원자 표적화 단백질에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 두 개 의 동일한 항원 결합 부위 및 하나의 다른 항원 결합 부위를 가진다. 양특이성, 삼가 표적화 체제는 두 개의 다른 scFvs를 가지며, 하나의 scFv는 또 다른 항체의 V_L 도메인과 짧은 연결기로 결합되는 하나의 항체에서 유래하는 두 개의 V_H 도메 인(V_H -사슬)을 가지고, 두 번째 scFv는 또 다른 항체의 V_H 도메인과 짧은 연결기로 결합되는 첫 번째 항체에서 유래하는 두 개의 V_L 도메인(V_H -사슬)을 가진다. V_H 및 V_L 도메인에서 유래하는 다가, 다특이성 체제를 생산하는 방법은 다가 및 다특이성 체제가 하나의 V_H 사슬이 하나의 V_L -사슬과 비공유 결합하여 제조될 수 있는 방법에 따라, 숙주 조직의 DNA 플 라스미드에서 합성된 각 사슬이 V_H 도메인(V_H -사슬)의 전체 또는 V_L 도메인(V_L -사슬)의 전체로 이루어지도록 하였다. 예를 들면, 삼가, 삼특이성 체제를 생성하는 V_H -사슬은 각각 다른 특이성을 가지는 항체에서 유래하고, 가변 길이의 펩타 이드 연결기에 의해 결합되는 세 개의 V_H 도메인의 아미노산 서열로 이루어질 것이며, V_L -사슬은 V_H -사슬에 사용되는 것과 동일한 펩타이드 연결기에 의해 결합되는 상보적인 V_L 도메인으로 이루어질 것이다. 항체의 V_H 및 V_L 도메인은 역평 행형(antiparallel fashion)으로 결합하기 때문에, 본 발명에서는 V_L -사슬에서 V_L 도메인이 V_H -사슬에서 V_H 도메인의 역 순으로 배열되는 것이 바람직하다.

5. 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디

또한 본 발명에 의한 항체는 "디아바디"라 불리는 기능적 양특이성 단일 사슬 항체(bscAb)를 제조하여 사용할 수 있으며, 재조합 방법을 이용하여 포유동물 세포에서 제조할 수 있다. Mack *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**:7021-7025, 1995, 참조, 통합수록하였다. 예를 들며, bscAb는 재조합 방법을 이용한 글리신-세린 연결기를 통해 두 개의 단일 사슬 Fv 단편을 결합하여 제조한다. 두 개의 항체들의 V 경쇄(V_L) 및 V 중쇄(V_H) 도메인은 표준 PCR 법으로 분리된다. 각 하이브리도마로부터 얻어지는 V_L 및 V_H cDNA는 두 단계 융합 PCR에서 단일 사슬 단편을 생성하기 위하여 결합된다. 첫 번째 PCR 단계는 $(Gly_4-Ser_1)_3$ 연결기를 도입하고, 두 번째 단계는 V_H 및 V_L 산물을 결합한다. 각 단일 사슬 분자는 세균 발현 벡터에서 클론된다. 증폭에 의하여 단일 사슬 분자 하나는 제거되고, 두 번째 단일 사슬 분자를 함유하는 다른 벡터로 서브클론된다. 생성된 bscAb 단편은 진핵세포 발현 벡터에서 서브클론된다. 기능성 단백질 발현은 벡터를 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO) 세포로 형질감염하여 획득될 수 있다. 양특이성 융합 단백질은 동일한 방법으로 제조한다. 양특이성 단일 사슬 항체 및 양특이성 융합 단백질은 본 발명의 범주에 포함된다.

예를 들면, 인간화된, 키메라 또는 인간 항-CD22 단클론항체는 항원 특이적 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 제조하는데 사용된다. 일특이성 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디는 선택적으로 표적화된 항원에 결합하고, 분자의 결합 부위의 수가 증가하여 표적 세포에 대한 친화력이 증가하고 잔류 시간이 길어져 요구되는 위치에서 관찰된다. 디아바디에서, 5개의 아미노산 잔기 연결기에 의해 인간화된 CD22 MAb의 V_K 폴리펩타이드에 결합되는 인간화된 CD22 MAb의 V_H 폴리펩타이드를 포함하는 두 개의 사슬이 이용된다. 각 사슬은 인간화된 CD22 디아바디의 절반을 형성한다. 트리아바디의 경우는, 연결기 없이 인간화된 CD22 MAb의 V_K 폴리펩타이드에 결합되는 인간화된 CD22 MAb의 V_H 폴리펩타이드를 포함하는 세 개의 사슬이 이용된다. 각 사슬은 인간화된 hCD22 트리아바디의 삼분의 일을 형성한다.

양특이성 디아바디의 궁극적인 용도는 진단제 또는 치료제의 순차적인 특이적 운반을 위하여 CD22 양성 종양을 예비표적화하는 것이다. 이들 디아바디는 표적화된 항체에 선택적으로 결합하고, 친화력을 증가시켜 원하는 위치에서의 잔류 시간을 길게 해준다. 더욱이, 비-항원 결합 디아바디는 인체로부터 빠르게 제거되고, 정상 조직의 노출을 최소화한다. 진단제 및 치료제는 동위원소, 약물, 독소, 사이토카인, 호르몬, 성장인자, 접합체, 방사성핵종 및 금속을 포함한다. 예를 들면, 가돌리늄 금속은 자기공명영상(MRI)에 사용된다. 방사성핵종의 예로는 ^{225}Ac , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{67}Ga , ^{90}Y , ^{86}Y , ^{111}In , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{99m}Tc , ^{94m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br 및 ^{211}At 을 들 수 있다. 또한 다른 방사성핵종, 특히 60-4,000 keV 에너지 범위내의 진단제 및 치료제가 사용가능하다.

보다 최근에는 이중 특이성을 가지는 사가 탄뎀(tandem) 디아바디(탄다브(tandab)라고도 함)가 보고되었다(Cochlovius *et al.*, *Cancer Research*(2000) **60**: 4336-4341). 양특이성 탄타브는 두 개의 동일한 폴리펩타이드 다이머로서, 스스로 결합하여 각각 두 개의 다른 특이성을 위한 두 개의 잠재적 결합부위 생성을 촉진하는 배위에 연결되는 각각 두 개의 다른 항체(V_{H1} , V_{L1} , V_{H2} , V_{L2})의 네 개의 변이 도메인을 함유한다.

6. 접합된 다가 및 다특이성 항체

본 발명의 또 다른 실시예는 접합된 다가 항체에 관한 것이다. 부가적 아미노산 잔기는 첫 번째 또는 두 번째 폴리펩타이드의 N- 또는 C- 말단에 첨가될 수 있다. 부가적 아미노산 잔기는 펩타이드 태그, 단일 펩타이드, 사이토카인, 효소(예를 들면, 프로드럭(prodrug) 활성화 효소), 호르몬, 슈도모나스 외독소와 같은 펩타이드 독소, 펩타이드 약물, 세포독성 단백질 또는 다른 기능성 단백질을 포함한다. 여기에서, 기능성 단백질은 생물학적 기능을 가지는 단백질이다.

하나의 구현예에서, 약물, 독소, 방사성 화합물, 효소, 호르몬, 세포독성 단백질, 킬레이트, 사이토카인 및 다른 기능성 제제는 다가 표적 결합 단백질과 접합되고, 바람직하게는 아민, 카르복실, 페닐, 티올 또는 히드록시 그룹의 다가 표적 결합 단백질의 아미노산 잔기의 측쇄에 공유 부착한다. 본 발명에서는 다양한 통상적인 연결기가 사용되며, 예로 들면, 디이소시아네이트, 디이소티오시아네이트, 비스(히드록시숙신이미드) 에스테르, 카르보다이미드, 말레이미드-히드록시숙신이미드 에스테르, 글루타르알데히드 등이 있다. 다가 단백질에서 접합 제제는 그 표적에 대한 단백질의 결합 특이성 및 친화력에 현저하게 영향을 주지 않는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 사용된 기능적 제제는 생물학적 기능을 가지는 제제이다. 바람직한 기능적 제제는 세포독성 제제이다.

다른 구현예에서, 생체내 표적으로의 치료용 또는 프로드럭 폴리머의 양특이성 항체의 직접 운반은 방사성핵종의 양특이성 항체 운반과 조합될 수 있으며, 조합 화학치료요법 및 방사성면역치료법으로 완성된다. 각 치료는 표적가능한 접합체에 접합될 수 있고, 동시에 투여될 수 있으며, 또는 핵종이 첫 번째 표적가능한 접합체의 일부로 주어지고, 약물이 나중 단계에서 두 번째 표적가능한 접합체의 일부로 주어진다.

또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 폴리머 담체와 접합되고, 상기 폴리머 담체는 순차적으로 다가 표적 결합 단백질과 접합된다. 이러한 방법은 Ryser *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3867-3870, 1978, 미국특허 제4,699,784호 및 제4,046,722호에 기재되어 있으며, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 접합은 다가 결합 단백질의 결합 특이성 또는 친화력에 현저하게 영향을 주지 않는 것이 바람직하다.

7. 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 및 인간 항체의 치료용 및 진단용 용도

본 발명에 의한 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 및 인간 단클론항체인 항-CD20 MAbs 및 다른 MAbs는 치료 및 진단 방법에서 적절하게 사용된다. 따라서, 본 발명에 의한 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 및 인간 항체를 항체 자체로 단독 투여하거나 또는 복용량 섭생에 의해 일시적이긴 하지만 치료제와 접합하지 않는 다원적 치료로 투여하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다. 항-CD20 MAb 자체의 효능은 하나 또는 그 이상의 다른 항체 자체, 즉, 특이 항원에 결합하는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, B7, Ia, HM1.24, 테나신(tenascin), MUC1 또는 HLA-DR와 같이 특이 항원에 대한 MAbs 뿐만 아니라 약물, 독소, 면역조절제, 호르몬, 치료용 방사성핵종 등을 포함하는 치료제와 접합되고 동시에 또는 순차적으로 또는 MAbs와 함께 처방된 복용 섭생에 따라 투여되는 항-CD20 또는 이들 열거된 항원들에 대한 항체의 하나 또는 그 이상의 접합체들을 가지는 혈관신생 항체들(예를 들면, VEGF 및 P1GF 항체들)을 보충해 줌으로써 증가된다. 바람직한 B-세포 항원은 인간 CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD46, CD52, CD74, CD80 및 CD5 항원과 등가인 것들을 포함한다. 바람직한 T-세포 항원은 인간 CD4, CD8 및 CD25(IL-2 수용체) 항원과 등가인 것들을 포함한다. HLA-DR 항원과 등가인 항원들은 B-세포 및 T-세포 질환의 치료에 사용된다. 특히, B-세포 항원은 CD19, CD22, CD21, CD23, CD74, CD80 및 HLA-DR 항원과 등가인 것들이 바람직하다. T-세포 항원은 인간 CD4, CD8 및 CD25 항원과 등가인 것들이 바람직하다. CD46은 상보적 의존 세포용해(CDC)를 차단하는 암세포 표면에 있는 항원이다.

또한 B 세포 림프구 및 다른 질병 또는 질환에서 사용하는 치료용 면역접합체를 투여하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다. 본 발명에 의한 면역접합체는 항체 구성성분 및 치료제를 생성하는 펩타이드를 포함하는 치료제를 포함하는 분자이다. 면역접합체는 항체 구성성분의 면역활성을 유지한다. 예를 들면, 항체 부분은 접합 전보다 접합 후에 동종항원에 결합하는 능력이 같거나 또는 약간 감소된 활성을 가진다.

또한 CD33, CD45, CD66 및 다른 과립구 결합 항원이 표적되는 골수 백혈병에서 치료 용도로 면역접합체를 투여하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다.

폭넓은 다양한 치료제가 본 발명의 항체와 유리하게 접합될 수 있다. 치료제는 상기에 기재된 항체 자체와 분리하여 투여하기 위해 사용되는 제제이다. 치료제로는 빈카 알카로이드, 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 안트라사이클린, 에피도필로톡신, 탁산, 항대사물질, 알킬화제, 항생제, COX-2 억제제, 유사분열억제(antimitotic), 항혈관형성제 및 세포자가사멸 제제, 특히, 독소루비신, 메토티렉세이트, 탁솔, CPT-11, 캄토테칸 및 이들의 다른 형태 및 항암제의 다른 종과 같은 화학요법 약물을 포함한다. 면역접합체 및 항체 융합 단백질의 제조를 위한 다른 유용한 암 화학치료요법 약물로는 질소 겨자(nitrogen mustard), 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosourea), 트리아젠(triazenes), 엽산 유사체, COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 옥살리플라틴(oxaliplatin)을 포함하는 백금 배위 복합체 및 호르몬 등을 들 수 있다. 적절한 화학치료요법 제제는 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed.(Mack Publishing Co. 1995), 및 GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACEUTICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed.(MacMillan Publishing Co. 1985) 및 이들의 개정판에 공개되어 있다. 실험적 약물과 같이 다른 적절한 화학치료요법 제제는 당업계에 잘알려져 있다.

부가적으로 DTPA, DOTA, TETA, 또는 NOTA와 같은 킬레이터 또는 적절한 펩타이드는 형광 분자와 같은 검출용 라벨, 또는 중금속 또는 방사성핵종과 같은 세포독성 제제에 접합될 수 있다. 예를 들면, 치료적으로 유용한 면역접합체는 광활성 제제 또는 염료를 항체 구성성분과 접합하여 획득할 수 있다. 형광크롬과 같은 형광 조성물 및 다른 색원체 또는 가시광에 민감한 포르피린과 같은 염료는 병변에 적절한 빛을 조사하여 병변을 검출 및 치료하는데 사용된다. 치료에서, 광방사성, 광치료 또는 광역학요법(Photodynamic Therapy)(Jori *et al.*(eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Britain* 22: 430 (1986))이라는 용어가 존재

한다. 더욱이 단클론항체는 광치료 완성을 위한 광활성 염료와 커플된다. Mew *et al.*, *J. Immunol.* **130**: 1473 (1983); *idem.*, *Cancer Res.* **45**: 4380 (1985); Oseroff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8744(1986); *idem.*, *Photochem. Photobiol.* **46**: 83(1987); Hasan *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* **288**: 471 (1989); Tatsuta *et al.*, *Lasers Surg. Med.* **9**: 422(1989); Pelegrin *et al.*, *Cancer* **67**: 2529(1991). 그러나, 이러한 초기 연구들은 내시적 치료 적용의 용도를 포함하지 않았으며, 특히 항체 단편 또는 하부 단편의 이용을 포함하지 않았다. 따라서, 본 발명은 광활성 제제 또는 염료를 포함하는 면역접합체의 치료용 용도를 제공하고자 한다.

또한 슈도모나스 외독소와 같은 독소는 본 발명의 항-CD20 항체의 항체 융합 부분의 치료제 부분을 생성하기 위해 복합된다. 다른 독소는 리신, 아브린, 알파 독소, 사포린, 리보뉴클라아제(RNase), DNase I, 스타펠로코커스 내독소-A, 미국 자리공 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 겔로닌(gelonin), 디프테린(diphtherin) 독소, 슈도모나스 외독소(exotoxin) 및 슈도모나스 내독소(endotoxin)를 포함하는 접합체 또는 다른 융합 단백질의 제조에 적절하게 사용된다. 예를 들면, Pastan *et al.*, *Cell* **47**:641 (1986) 및 Goldenberg, *CA-A Cancer Journal for Clinicians* **44**: 43 (1994) 참조. 본 발명에 의한 부가적 독소의 적절한 사용은 당업계에 잘 알려진 기술이며, 미국특허 제6,077,499호에 개시되어 있고, 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.

또한 사이토카인과 같은 면역조절제는 접합되거나, 항체 융합 단백질의 치료제 부분을 생성하거나, 또는 본 발명의 인간화된 항-CD20 항체 또는 다른 림프종 항체들과 함께 투여될 수 있다. 본 발명에 의한 적절한 사이토카인은 아래에 기재된 인터페론 및 인터류킨을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

8. 면역접합체의 제조

본 발명의 항체 또는 항체 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 치료제와 접합될 수 있다. 일반적으로, 하나의 치료제는 각각의 항체 또는 항체 단편에 부착되지만, 하나 이상의 치료제는 동일한 항체 또는 항체 단편에 부착될 수 있다. 본 발명의 항체 융합 단백질은 둘 이상의 항체 또는 그 단편을 포함하며, 이들 융합 단백질로 이루어진 상기 각 항체는 치료제를 함유할 수 있다. 부가적으로, 항체 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 항체들은 부착된 하나 이상의 치료제를 가질 수 있다. 또한 상기 치료제가 동일할 필요는 없으며, 다른 치료제가 될 수도 있다. 예를 들면, 하나가 같은 융합 단백질에서 약물 및 방사성 동위원소에 부착할 수 있다. 특히, IgG는 ¹³¹I로 방사성라벨될 수 있고, 약물에 부착될 수도 있다. ¹³¹I는 IgG의 타이로신에 결합할 수 있고, 약물은 IgG 리신의 엡실론 아미노기에 부착될 수 있다. 또한 치료제는 환원된 SH기 및 탄수화물 측쇄에 부착될 수 있다.

본 발명의 양특이성 항체들은 예비표적화하는 방법에서 사용되고, 환자에게 두 개의 치료제를 운반하는 바람직한 방법을 제공한다. 미국특허출원 제09/382,186호에는 양특이성 항체가 ¹²⁵I로 라벨되고, ^{99m}Tc로 라벨된 이가 펩타이드에 의해 환자에게 운반되는 양특이성 항체를 이용한 예비표적화 방법이 개시되어 있다. 상기 운반은 ¹²⁵I 및 ^{99m}Tc에 대한 우수한 종양/정상 조직 비율에서 나타나고, 따라서, 두 가지 진단용 방사성 동위원소의 사용을 보여준다. 알려진 치료제의 임의의 조합은 항체들 및 항체 융합 단백질들을 라벨하는데 사용될 수 있다. MAb 접합체의 항체 구성성분의 결합 특이성, 치료제의 유효성 및 항체의 Fc 부분의 작동체(effector) 활성은 접합체의 표준시험을 통해 결정될 수 있다.

치료제는 이황화물 결합 생성을 통한 환원된 항체 구성성분의 경첩 부위(hinge region)에 부착될 수 있다. 선택적으로, 이러한 펩타이드는 N-숙시닐 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(N-succinyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP) [Yu *et al.*, *Int. J. Cancer* **56**: 244(1994)] 등의 이중작용기성(heterobifunctional) 교차결합을 이용하여 항체의 구성성분에 부착될 수 있다. 이러한 접합을 위한 일반적인 기술들은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING(CRC Press 1991); Upešlacis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods", in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch *et al.*(eds), 187-230쪽(Wiley-Liss, Inc., 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter *et al.*(eds.), 60-84쪽(Cambridge University Press, 1995) 등이 있다. 선택적으로, 상기 치료제는 항체의 Fc 영역에서 탄수화물 부분을 통해 접합될 수 있다. 상기 탄수화물기는 티올기에 결합하는 동일한 펩타이드의 공급을 증가시키는데 사용할 수 있으며, 또는 상기 탄수화물 부분은 다른 펩타이드를 결합하는데 사용할 수도 있다.

항체 탄수화물 부분을 통하여 항체 구성성분에 펩타이드를 접합하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* **41**: 832(1988); Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* **46**: 1101(1990); 및 Shih *et al.*, 미국특허 제5,057,313호 등이 있으며, 모두 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 상기 일반적인 방법은 산화된 탄수화물 부분을

가지는 항체 구성성분이 적어도 하나 이상의 자유 아민기를 가지고 펩타이드의 다원성(plurality)을 제공하는 담체 폴리머와 반응하는 것과 연관된다. 상기 반응은 최종 접합체를 생성하기 위하여 두 번째 아민을 환원하는 것으로 안정화될 수 있는 초기의 시프염기(Schiff Base)(이민) 결합에서 발생한다.

상기 Fc 영역은 면역접합체의 항체 구성성분으로 이용되는 항체가 항체 단편일 경우에는 존재하지 않는다. 그러나, 상기 Fc 영역은 온길이(full length) 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변 영역에서 탄수화물 부분을 도입할 수 있다. 예를 들면, Leung *et al.*, *J. Immunol.* **154**: 5919(1995); Hansen *et al.*, 미국특허 제5,443,953호(1995) 및 Leung *et al.*, 미국특허 제6,254,868호 등이 있으며, 모두 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다. 상기 제작된 탄수화물 부분은 치료제를 부착하는데 사용될 수 있다.

9. 약제학적으로 허용가능한 운반제

환자에게 운반되는 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 및 인간 방사성라벨된 항체는 단독 MAb, 면역접합체, 융합 단백질로 구성될 수 있고, 또는 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 적절한 운반제, 하나 또는 그 이상의 부가적 성분 또는 이들의 일부 조합을 포함할 수 있다.

본 발명에 의한 면역접합체 항체는 약제학적으로 유용한 조성물을 제조하는 당업계에 알려진 방법으로 제형화할 수 있으며, 그로 인해 접합체 또는 항체 자체가 약제학적으로 적절한 운반제를 가지는 혼합물과 결합된다. 상기 약제학적으로 적절한 운반제의 한 예로 멸균한 인산완충 식염수를 들 수 있다. 다른 적절한 운반제로는 당업계에 알려진 것들을 사용할 수 있다. 예를 들면 Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition(Lea & Febiger 1990) 및 Gennaro(ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition(Mack Publishing Company 1990) 및 이들의 개정판 등이 있다.

본 발명에 의한 면역접합체 또는 항체 자체는 순간 주사(bolus injection) 또는 지속적 주입(continuous infusion) 등을 통한 정맥내 투여와 같은 비경구적 적용을 위하여 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 방부제를 첨가하여 앰플(ampules) 또는 다용량 용기 등의 단일 제제로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 유성의 또는 수성의 운반제 내에서 현탁액, 용액 또는 유화액(emulsion) 형태로 유지될 수 있으며, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제 등의 제형화제를 함유할 수 있다. 선택적으로, 상기 활성성분은 사용 전에 멸균한 초순수 수용액 등의 적절한 운반제와 함께 구성성분을 생성하기 위한 파우더 형태가 될 수 있다.

부가적인 조제방법은 치료용 접합체 또는 항체 자체의 활성의 지속을 조절하기 위하여 이용된다. 조절 유리 제제(control release preparation)는 면역접합체 또는 항체 자체를 복합체 또는 흡착을 위한 폴리머를 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 생체친화성(biocompatible) 고분자들은 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트)의 기질 및 스테아르산 이합체 및 세바신산(Sebacic acid)의 무수물 공중합체의 기질을 포함한다(Sherwood *et al.*, *Bio/Technology* **10**:1446(1992)). 이러한 기질로부터 면역접합체 또는 항체 자체가 유리되는 비율은 상기 면역접합체 또는 항체의 분자량, 기질내 면역접합체 또는 항체의 양 및 분산된 입자의 크기에 의존한다(Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* **55**: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*). 다른 고형의 복용 형태는 Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition(Lea & Febiger 1990) 및 Gennaro(ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition(Mack Publishing Company 1990) 및 이들의 개정판에 기재되어 있다.

또한 면역접합체, 항체 융합 단백질, 또는 항체 자체는 포유동물에 동시에 투여되거나 또는 다른 비경구형 루트를 통해 투여된다. 게다가 투여는 지속적인 주입으로 또는 단일 또는 멀티플 환약으로 이루어진다. 일반적으로, 인간에 대하여 투여된 면역접합체, 융합 단백질 또는 항체 자체의 복용량은 환자의 나이, 몸무게, 키, 성별, 일반적 치유 조건 및 이전의 조절 내력과 같은 인자에 의존하여 변화할 것이다. 전형적으로, 비록 낮거나 또는 높은 복용량이 부수적 지령으로 투여되지만, 1-20mg/kg의 복용량에서 단일 정맥내 주입하는 복용량에서 면역접합체, 융합 단백질 또는 항체 자체의 복용량을 수령인(recipient)에게 제공하는 것이 요구된다. 이 복용량은 필요에 의해 반복되며, 예를 들면, 4-10 주 동안 일주일에 한번, 바람직하게는 8주 동안 일주일에 한번, 보다 바람직하게는 4주 동안 일주일에 한번 반복투여한다. 또한 여러 개월 동안 이주일에 한 번씩과 같이 빈번하지 않게 투여할 수도 있다. 복용량은 복용과 일정의 적절한 조절로 인해 다수의 비경구형 루트를 통해 주입될 수 있다.

치료의 목적을 위해서, 면역접합체, 항체 융합 단백질, 또는 항체 자체는 치료학적으로 유효한 양으로 포유동물에 투여된다. 비인간 동물 환자도 포함이 되기는 하지만, 본 발명에 의한 적절한 환자는 일반적으로 인간이다. 항체 제조는 상기 투여된 양이 생리학적으로 현저할 경우, "치료학적으로 유효한 양"으로 투여된다고 말한다. 이들의 존재가 수령 포유동물의

생리에서 검출가능한 변화로 나타나는 경우, 제제는 생리학적으로 현저한 것이다. 특히, 그 존재가 항종양 반응을 유발하거나 또는 자가면역 질환 상태의 표지 및 징후를 완화하는 경우, 본 발명의 항체 제조는 생리학적으로 현저한 것이다. 또한 생리학적으로 현저한 효과는 수령 포유동물에서 인간 및/또는 세포 면역 반응의 작용이 되는 것이다.

10. 치료 방법

본 발명에서는 B-세포 관련 악성종양, T-세포 악성종양 또는 다른 림프종 유형과 같은 질병을 치료하기 위한 일차 조성물로서 본 발명에 의한 항체들의 용도를 제공한다. 또한 본 발명은 자가면역 질병을 치료하는데 유용하다. 특히, 본 명세서에 기재된 조성물은 다양한 자가면역 질병 뿐만 아니라 B-세포 림프종의 무통 형태(indolent form), B-세포 림프종의 침투 형태, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 왈덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia) 및 다발성 골수종의 치료에 유용하다. 또한 T-세포 백혈병 또는 진균증 사상균병과 같은 T-세포 질병을 치료할 수 있다. 예를 들면, 인간화된 항-CD22 항체 성분들 및 면역접합체들은 비호지킨스 림프종의 무통 및 침투 형태들을 모두 치료하는데 사용될 수 있다. 자가면역 질병은 급성 특발성 혈소판 감소성 자반병(acute idiopathic thrombocytopenic purpura), 만성 특발성 혈소판 감소성 자반병, 피부근염(dermatomyositis), 시덴함 무도병(Sydenham's chorea), 중증근무력증(myasthenia gravis), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 낭창성 신염(lupus nephritis), 류마티스 열(rheumatic fever), 다선 증후군(polyglandular syndromes), 수포성 유천포창(bullous pemphigoid), 당뇨병, 헤노흐-셴라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 연쇄상구균-감염후 신염(post-streptococcal nephritis), 결절홍반(erythema nodosum), 다가야스 동맥염(Takayasu's arteritis), 애디슨병(Addison's disease), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 다발성경화증(multiple sclerosis), 육아종(sarcoidosis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 다형성 홍반(erythema multiforme), IgA 신병증(IgA nephropathy), 다발성 결절성 동맥염(polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 굿파스투어 증후군(Goodpasture's syndrome), 폐쇄성 혈전혈관염(閉鎖性血栓血管炎: thromboangitis obliterans), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 원발성 담즙성 간경변(primary biliary cirrhosis), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 갑상선 중독증(thyrotoxicosis), 경피증(scleroderma), 만성 활동성 간염(chronic active hepatitis), 다발성 근염/피부근염(polymyositis/dermatomyositis), 다발성 연골염(polychondritis), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 웨게너육아종증(Wegener's granulomatosis), 막성 신증(membranous nephropathy), 신경 위축성 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수로(tabes dorsalis), 거대세포동맥염/다발성근육통(giant cell arteritis/polymyalgia), 악성빈혈(pernicious anemia), 급성 진행성 사구체신염(rapidly progressive glomerulonephritis), 건선(psoriasis) 및 섬유성 폐렴(fibrosing alveolitis)로 이루어진 군에서 선택된다.

치료용 조성물은 적어도 하나 이상의 인간화된, 키메라 또는 인간 단클론 항체를 함유하며, 이를 단독으로 또는 다른 인간화된, 키메라, 또는 인간 항체들, 치료제 또는 면역조절제와 조합하여 사용한다. 특히, 온전한 인간 항체를 가지는 조합 치료가 의도되며, 상기와 같은 방법으로 제조된다.

또한 같은 혹은 다른 에피토프 또는 항원에 대한 접합된 항체들은 본 발명의 의한 하나 또는 그 이상의 항체와 조합될 수 있다. 예를 들면, 인간화된, 키메라 또는 인간 접합된 항-CD22 항체는 또 다른 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 또는 인간 접합된 항-CD22 항체와 결합될 수 있고, 영장목화된, 인간화된, 키메라 또는 인간 접합된 항-CD22 항체는 항-CD22 면역접합체와 결합될 수 있다. 택일적으로 다양한 상기 조합들은 상기에 기재된 다른 림프종-결합 항체들을 가질 수 있다. 인간이하의 영장목화된, 인간화된, 키메라 또는 인간 항-CD22 항체의 융합 단백질 및 독소 또는 면역조절제, 또는 적어도 둘 이상의 다른 B-세포 항체들(CD20 또는 CD22 mAb)의 융합 부분이 본 발명에서 사용될 수 있다. 상기에 이미 기재된 B-세포 또는 다른 림프종 또는 자가면역 질환과 결합하는 적어도 둘 이상의 다른 항원을 표적화하는 많은 다른 항체 조합은 치료제 또는 면역조절제와 일부 접합되거나 또는 세포독성 약물 또는 방사선을 가지는 다른 치료제와의 조합으로 구성된다.

여기에서 용어 "면역 조절제"는 사이토카인, 줄기 세포 성장인자, 종양 괴사 인자(TNF)와 같은 림프독소(lymphotoxin) 및 인터류킨(인터류킨-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12 및 IL-18) 등의 조혈인자, 균체 자극 인자(과립구-균체 자극 인자(G-CSF) 및 과립구 대식세포-균체 자극 인자(GM-CSF)), 인터페론(인터페론- α , β 및 γ), "S1 인자"로 제작되는 줄기 세포 성장 인자, 에리트로포이에틴(erythropoietin) 및 트롬보포이에틴(thrombopoietin)을 포함한다. 적절한 면역조절제 부분의 실시예에서는 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 인터페론- γ 및 TNF- α 등을 포함한다. 선택적으로, 환자들은 접합된 항-CD22 항체 자체를 수령할 수 있고, 항체 자체 또는 접합된 항-CD22 항체를 투여하기 전, 투여와 동시에, 또는 투여한 후에 개별적으로 투여된 사이토카인을 수령할 수 있다. 또한 상기에 기재된 바와 같이 항-CD22 항체는 면역조절제와 접합될 수 있다. 면역조절제는 또한 다른 항원에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항체 또는 서브단편들로 이루어진 하이브리드 항체 또는 하이브리드 항체 단편에 접합될 수 있다.

본 발명에 의한 다원적 치료는 용합 단백질의 형태에서 또는 면역접합체로서 항-CD20, 항-CD19, 항-CD21, 항-CD74, 항-CD80, 항-CD23, 항-CD46 또는 HLA-DR(가변 사슬 포함) 항체들을 투여하여 보충되는 접합된 항-CD22 항체 자체를 이용한 면역치료법을 더 포함한다. 이러한 항체들은 적어도 하나 이상의 항원 결정 부위인 에피토프를 인지하는 다클론, 단클론, 인간이하의 영장목화된, 키메라, 인간 또는 인간화된 항체를 포함한다. 항-CD19 및 항-CD22 항체는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, Ghetie *et al.*, *Cancer Res.* 48: 2610 (1988); Hekman *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 32: 364 (1991); Longo, *Curr. Opin. Oncol.* 8:353(1996) 및 미국특허 제5,798,554호 및 제6,187,287호 참조; 본 명세서에서 전체를 참고자료로 통합 수록하였다.

다원적 치료의 또 다른 형태는 환자에게 접합된 항체들 및/또는 면역접합체들을 표준 암 화학치료요법과의 결합으로 제공하는 것이다. 예를 들면, "CVB"(1.5g/m² 사이클로포스파미드, 200-400 mg/m² 에피토프, 및 150-200mg/m² 카르무스틴(Carmustine))는 비호지킨 림프종을 치료하는데 사용되는 방법이다. 예를 들면, Patti *et al.*, *Eur. J. Haematol.* 51:18(1993). 다른 적절한 조합 화학치료요법은 당업계에 잘 알려져 있다. Freedman *et al.*, "Non-Hodgkin's Lymphomas" in CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland *et al.*(eds.), 2028-2068쪽(Lea & Febiger 1933) 참조. 중간 등급의 비호지킨 림프종(NHL) 치료를 위한 첫 번째 일반 화학치료요법은 C-MOPP(사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 프로카르바진 및 프레드니손) 및 CHOP(사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손)을 포함한다. 유용한 두 번째 일반 화학치료요법은 m-BACOD(메토티렉세이트, 블레오마이신, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 텍사메타손 및 류코보린)이고, 반면에 세 번째 일반 화학치료요법은 MACOP-B(메토티렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손, 블레오마이신 및 류코보린)이다. 부가적으로 유용한 약물은 페닐부티레이트 및 브로스타틴-1을 포함한다. 바람직한 다원적 치료에서, 화학치료요법 및 사이토카인은 모두 본 발명에 의한 항체, 면역접합체 또는 용합 단백질과 함께 투여된다. 상기 사이토카인, 화학치료요법 약물 및 항체 또는 면역접합체는 어떠한 주문에 따라 또는 혼용하여 투여될 수 있다.

치료제로서 유용하고 실제로 베타-입자 방출에 의해 붕괴되는 방사성핵종들은 Ac-225, P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212 및 Bi-213를 포함하지만, 여기에 한정되는 것은 아니다. 유용한 베타-입자 방출 핵종의 최대 붕괴 에너지는 20-5,000 keV가 바람직하고, 보다 바람직하게는 100-4,000 keV이며, 가장 바람직하게는 500-2,500 keV 가 적절하다.

치료제로서 유용하고 실제로 오제-방출(Auger-emitting) 입자들로 인해 붕괴되는 방사성핵종들은 Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m 및 Ir-192를 포함하지만, 여기에 한정되는 것은 아니다. 이들 방사성핵종의 최대 붕괴 에너지는 1,000 keV 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 100 keV 이하이며, 가장 바람직하게는 70 keV 이하가 적절하다.

치료제로서 유용하고 실제로 알파-입자들 생성으로 인해 붕괴되는 방사성핵종들은 Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 및 Fm-255를 포함하지만, 여기에 한정되는 것은 아니다. 유용한 알파-입자 방출 방사성핵종들의 최대 붕괴 에너지는 2,000-9,000 keV가 바람직하고, 보다 바람직하게는 3,000-8,000 keV이며, 가장 바람직하게는 4,000-7,000 keV 가 적절하다.

중성자 포획 절차를 기초로 하는 치료요법들에서 이용하는 방사성핵종들은 B-10, Gd-157 및 U-235를 포함하지만, 여기에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 구현예들은 본 발명의 측면을 보여주는 실시예들을 통하여 보다 상세히 설명될 수 있다. 이들 실시예들은 본 발명의 명확한 요소들을 설명하고 있지만 본 발명의 범위를 여기에 한정하여 설명하는 것은 아니다.

실시예

항체들

에프라투주맵은 인간화된 LL2 항체이며 이뮤노메딕스 인코오포레이티드(모리스 플레인스, NJ)에 의해 개발되었다. 인간화 과정은 뮤린 Ig 서열의 95% 이상을 인간 IgG₁ 서열로 교체한다. 에프라투주맵은 세 번째 Ig 도메인(Kehrl, J.H. *B6 CD22 Workshop Panel Report, in Leukocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens.*, S.F. Schlossman(ed.),

Oxford University Press, p. 523-5, 1995)에 대응하는 CD22 항원(Stein, R. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* **37**(5):293-8, 1993)의 B 에피토프에 결합하여 내재화된다. 생체 밖에서의 내재화는 5분 후에 관찰되었고 항원의 50% 정도의 재발현이 5시간 후에 발생한다고 보고되었다(Shih, L.B. *et al.*, *Int J Cancer* **56**(4):538-45, 1994).

인간화된 항-CD20 항체인 hA20은 이뮤노메딕스 인코오포레이티드(모리스 플레인스, NJ)에 의해 개발되었다. 이러한 Mab는 CD20에 결합하고, 키메라 항-CD20 Mab인 리톡시맵과는 대조적으로 키메라 형태 보다는 뮤린 단백질을 적게 가지는 CDR-중합 Mab이다. hA20 Mab는 CD22 인간화된 Mab인 에프라투주맵과 같이 IgG1(카파) 특정 영역 및 동일한 인간 V 구조 영역을 가진다. hA20의 CDR-중합 VH 및 Vk 사슬의 유전자들은 DHFR-기저 증폭가능한 발현 시스템인 pdHL2 플라스미드 벡터로 삽입되고, Sp2/0 골수 세포주로 형질감염되어 hA20 제조 클론들을 생성한다. hA20의 CDRs 이 VH 영역에서 하나의 아미노산이 다른 것을 제외하고 리톡시맵과 동일하다는 분자 특성을 증명하였다. 그러나, 인간 구조체를 더 포함하기 때문에 hA20의 VH 및 Vk 구조 영역에서의 차이가 존재한다. 이러한 hA20 항체는 다양한 림프종 세포들에 대하여 리톡시맵의 결합과 경쟁하고 CD20을 발현하는 인간 림프종 세포주에 대하여 생체 밖에서 및 생체 내에서 동일한 효과를 가질 뿐만 아니라 리톡시맵에 대하여 일정한 유사한 분열을 가진다.

비호지킨스 림프종(NHL)의 치료

IV기 미만성대세포(diffuse-large cell) NHL을 앓고 있는 66세 남자 환자로 2년 전에 3 코스의 화학요법 이후에 재발하였다. 상기 환자에게 매번 각각 30mg 항체 단백질의 총 복용량으로 정맥주사하여 투여된 ⁹⁰Y의 7.5mCi/m²를 가지는 ⁹⁰Y-DOTA-테트라투주맵(Govinden의 방법에 의한 라벨된 것)을 한 주씩 개별적으로 두 번 주입하여 복용하였다. 6주 후, 상기 환자의 경부임파절(cervical lymph nodes) 및 비종대(splenomegaly)가 현저하게 감소되었고 환자는 증상면에서 개선되어 정규 업무에 복귀하였다. 상기 환자가 완전히 회복된 것은 아니기 때문에, 에프라투주맵(360mg/m²) 및 hA20(250mg/m²)의 조합으로 2주에 한 번씩 총 4회 주입하는 지속적인 치료요법을 실시한 다음 12주 후에 결합 항체 치료요법 코스를 반복한다. CD22 및 CD20 항체들 자체의 조합으로 두번째 치료요법 코스를 완료하고 삼개월 후 환자는 방사선학 스캔 또는 골수 생체검사를 통해 질병의 징후가 전혀 발견되지 않았고, 따라서 완전한 반응이 이루어진 것으로 간주된다. 3개월 후의 다음 평가에서 상기 환자는 질병이 아직 완치되지 않았다.

T-세포 백혈병의 치료

진전된 T-세포 백혈병을 앓고 있고 화학치료요법 이전에 골절된 환자에게 20mCi ⁹⁰Y-DOTA로 접합된 항-CD25 인간화된 Mab 50mg을 주입하고 일주일 후 CD25 Mab(항-TAC 인간화된 항체)를 200mg/m²의 복용량으로 주입한다. 4주가 지나고 상기 환자의 혈액 검사(blood count) 및 골수 생체검사에서 환자의 질병이 부분적인 회복을 보였다.

골절 류마티스성 관절염의 치료

많은 관절부, 특히 그의 무릎에 영향을 주는 건지기 힘든 진전되고 치료요법으로 현재 굴절력 있는 류마티스성 관절염을 앓고 있는 환자를 10mCi/m²의 복용량으로 ⁹⁰Y로 라벨된 CD4 및 CD20 인간화된 Mabs의 혼합물을 총 50mg으로 단독 투여하여 치료한다. 2주 후, CD4 항체 100mg 및 CD20 항체 250mg으로 이루어진 인간화된 항체 자체의 복용량을 투여하고, 2주 후에 다시 한번 이를 반복한다. 상기 환자는 4주 후에 자신의 관절염, 특히 무릎에서 고통이 완화되는 것을 느끼고 그의 주치의에 의해 관찰된 관절부 염증이 거의 나타나지 않고 증계들을 보다 잘 그리고 완전히 오를 수 있다. 삼개월 후, 항체들의 방사성라벨된 혼합물을 한 번 주입한 다음 CD4 및 CD20 항체들을 두 번 주입하는 과정을 포함하는 치료요법 코스를 반복하고 나서 상기 환자는 6주 후에 재평가를 받았다. 의사는 환자가 최소의 고통 및 말단부들의 보다 나은 상당한 이동성을 입증하는 현저한 개선을 관찰하였다.

상기에 기재된 바와 같이 특정한 바람직한 구현예를 언급하고 있지만, 이는 본 발명을 이해하기 위한 것으로서 본 발명이 여기에만 한정되는 것은 아니다. 개시된 구현예들로부터 다양한 변형이 이루어질 수 있으며, 이러한 변형들도 다음에 오는 구현예들에 의해 정의된 본 발명의 범주 안에 속하는 것임은 당업자에게 자명할 것이다.

본 명세서에서 인용한 모든 공개자료 및 특허 출원 및 특허들은 본 명세서에서 참고자료로 전체를 통합 수록하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

포유동물에서 질병을 치료하는데 이용하기 위한 약물의 제조에서 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 하나 이상의 접합된 항체 또는 그 단편, 접합된 항체 융합 단백질 또는 그 단편을 포함하는 치료용 조성물의 용도;

여기에서, 비방사성라벨된 항체를 통한 예비-복용이 수행되지 않으며, 상기 치료용 조성물은 상기 포유동물에 동시에 및 순차적으로 투여됨.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 표적 이탈(escape)로부터 종양 또는 자가면역 질병 세포의 증식을 보존하는 유지 치료로서 비접합된 항체 또는 단편 또는 비접합된 항체 융합 단백질 또는 그 단편이 상기 접합된 항체 또는 그 단편, 또는 접합된 항체 융합 단백질 또는 그 단편과 함께 선택적으로 첨가됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 CD3, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, MUC1, 테나신(tenascin), Ia, HMI.24, HLA-DR 및 종양-결합 항원으로 이루어진 군에서 선택된 항원을 표적하는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 종양-결합 항원은 혈관 내피 항원임을 특징으로 하는 용도.

청구항 5.

제 3항에 있어서, 상기 포유동물은 인간 및 가축 또는 반려동물로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 6.

제 3항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 인간, 무린, 키메라, 영장목화 또는 인간화된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 7.

제 3항에 있어서, 상기 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 약물, 독소, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 화합물, 광활성 제제 및 방사성핵종으로 이루어진 군에서 선택된 치료제와 접합된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 8.

제 3항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 하나 이상의 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편을 포함하는 치료용 조성물을 상기 포유동물에 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용도;

여기에서 상기 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 하나 이상의 치료제와 접합됨.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 표적 이탈(escape)로부터 종양 또는 자가면역 질병 세포의 증식을 보존하는 유지 치료로서 비접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편이 상기 접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편과 함께 선택적으로 첨가됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 10.

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 CD3, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, MUC1, 테나신(tenascin), Ia, HMI.24, HLA-DR 및 종양-결합 항원으로 이루어진 군에서 선택된 항원을 표적하는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 상기 종양-결합 항원은 혈관 내피 항원임을 특징으로 하는 용도.

청구항 12.

제 10항에 있어서, 상기 포유동물은 인간 및 가축 또는 반려동물로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 13.

제 10항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 인간, 무린, 키메라, 영장목화 또는 인간화된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 14.

제 10항에 있어서, 상기 항체, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 약물, 독소, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 화합물, 광활성제 및 방사성핵종으로 이루어진 군에서 선택된 치료제와 접합된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 15.

제 1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 둘 이상의 항체들 또는 그 단편을 포함하는 항체 융합 단백질 또는 그 단편을 포함하는 치료용 조성물을 상기 포유동물에 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 표적 이탈(escape)로부터 종양 또는 질병 세포의 증식을 보존하는 유지 치료로서 비접합된 항체가 상기 항체 융합 단백질 또는 그 단편과 함께 선택적으로 첨가됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 17.

제 15항 또는 제 16항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, MUC1, 테나신(tenascin), Ia, HMI.24, HLA-DR 및 종양-결합 항원으로 이루어진 군에서 선택된 항원을 표적하는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 상기 종양-결합 항원은 혈관 내피 항원임을 특징으로 하는 용도.

청구항 19.

제 17항에 있어서, 상기 포유동물은 인간 및 가축 또는 반려동물로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 20.

제 17항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체는 인간, 무린, 키메라, 영장목화 또는 인간화된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 21.

제 17항에 있어서, 상기 항체는 약물, 독소, 면역조절제, 키레이터, 붕소 화합물, 광활성 제제 및 방사성핵종으로 이루어진 군에서 선택된 치료제와 접합된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 22.

제 7항에 있어서, 상기 약물은 유사분열억제제(antimitotic), 알킬화제, 항대사물질, 항혈관형성제, 세포자가사멸 제제, 알카로이드제, 항생제 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 약제학적 특성을 가지는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 23.

제 7항에 있어서, 상기 약물은 질소 겨자(nitrogen mustard), 에틸렌이민 유도체들, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아(nitrosourea), 트리아젠(triazenes), 엽산 유사체, 안트라사이클린, 타산, COX-2 억제제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 항생제, 효소, 에피도필로톡신, 백금 배위 복합체, 빈카 알카로이드, 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 반응 억제제, 길항제, 엔도스타틴(endostatin), 탁솔, 캄토테칸, 독소루비신 및 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 24.

제 7항에 있어서, 상기 약물은 사이클로포스파미드, 에토포사이드, 빈크리스틴, 프로카르바진, 프레드니손, 카르무스틴(carmustine), 독소루비신, 메토티렉세이트, 블레오마이신, 텍사메타손, 페닐 부티레이트, 브리오스타틴-1(bryostatin-1) 및 류코보린으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 25.

제 7항에 있어서, 상기 독소는 리진, 아브린, 알파 독소, 사포린, 리보뉴클라아제(RNase), DNase I, 스타필로코커스 내독소-A, 미국자리공 항바이러스성 단백질(pokeweed antiviral protein), 겔로닌(gelonin), 디프테린(diphtherin) 독소, 슈도모나스 외독소(exotoxin) 및 슈도모나스 내독소(endotoxin)로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 26.

제 7항에 있어서, 상기 면역조절제는 사이토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소, 조혈 성장 인자, 균체 자극 인자(CSF), 인터페론(IFN), 에리트로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 27.

제 7항에 있어서, 상기 면역조절제는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 과립구-균체 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포-균체 자극 인자(GM-CSF), 인터페론- α , $-\beta$ 또는 $-\gamma$, TNF- α 및 "S1 인자"로 이루어진 군에서 본질적으로 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 28.

제 7항에 있어서, 상기 킬레이터는 DTPA, DOTA, TETA, NOTA 및 검출가능한 라벨 또는 세포독성 제제가 접합될 수 있는 적절한 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 29.

제 28항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨은 형광 분자이고, 상기 세포독성 제제는 중금속 또는 방사성핵종을 특징으로 하는 용도.

청구항 30.

제 26항에 있어서, 상기 림프독소는 종양 괴사 인자, 조혈 성장 인자, 균체 자극 인자, 인터페론 및 줄기 세포 성장 인자로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 31.

제 7항에 있어서, 상기 광활성 제제는 색원체 또는 염료임을 특징으로 하는 용도.

청구항 32.

제 7항에 있어서,

(A) 상기 방사성핵종은 베타-입자 방출에 의해 본질적으로 붕괴되고, Ac-225, P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212 및 Bi-213로 이루어진 군에서 선택되며;

(B) 상기 방사성핵종은 오제-입자 방출에 의해 본질적으로 붕괴되고, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m 및 Ir-192로 이루어진 군에서 선택되며; 또는

(C) 상기 방사성핵종은 오제-입자 방출에 의해 본질적으로 붕괴되고, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 및 Fm-255로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 33.

제 7항에 있어서, 상기 치료제는 광역학요법 및 중성자 포획 절차에서 사용됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 34.

제 33항에 있어서, 상기 광역학요법은 금속 복합체를 사용하고, 상기 금속 복합체는 아연, 알루미늄, 갈륨, 루테튬 및 팔라듐으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 35.

제 33항에 있어서, 상기 중성자 포획 절차는 B-10, Gd-157 및 U-235로 이루어진 군에서 선택된 방사성핵종을 사용함을 특징으로 하는 용도.

청구항 36.

제 1항에 있어서, 상기 질병은 B-세포 관련 질병, T-세포 관련 질병 또는 자가면역 질병임을 특징으로 하는 용도.

청구항 37.

제 36항에 있어서, 상기 B-세포 관련 질병은 B-세포 림프종의 무통 형태, B-세포 림프종의 침투 형태, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 왈덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia) 또는 다발성 골수종임을 특징으로 하는 용도.

청구항 38.

제 37항에 있어서, 상기 B-세포 관련 질병은 인간 또는 가축 질병임을 특징으로 하는 용도.

청구항 39.

제 37항에 있어서, 상기 B-세포 관련 질병은 비호지킨스 림프종임을 특징으로 하는 용도.

청구항 40.

제 37항에 있어서, 상기 T-세포 관련 질병은 인간 또는 가축 T-세포 림프종 또는 진균증 사상균병임을 특징으로 하는 용도.

청구항 41.

제 36항에 있어서, 상기 자가면역 질병은 급성 특발성 혈소판 감소성 자반병(acute idiopathic thrombocytopenic purpura), 만성 특발성 혈소판 감소성 자반병, 피부근염(dermatomyositis), 시덴함 무도병(Sydenham's chorea), 중증근 무력증(myasthenia gravis), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus), 낭창성 신염(lupus nephritis), 류마티스 열(rheumatic fever), 다선 증후군(polyglandular syndromes), 수포성 유천포창(bullous pemphigoid), 당뇨병, 헤노흐-셴라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 연쇄상구균-감염후 신염(post-streptococcal nephritis), 결절홍반(erythema nodosum), 다가야스 동맥염(Takayasu's arteritis), 애디슨병(Addison's disease), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 다발성경화증(multiple sclerosis), 육아종(sarcoidosis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 다형성 홍반(erythema multiforme), IgA 신병증(IgA nephropathy), 다발성 결절성 동맥염(polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 굿파스튜어 증후군(Goodpasture's syndrome), 폐쇄성 혈전혈관염(閉鎖性血栓血管炎 : thromboangitis obliterans), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 원발성 담즙성 간경변(primary biliary cirrhosis), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 갑상선 중독증(thyrotoxicosis), 경피증(scleroderma), 만성 활동성 간염(chronic active hepatitis), 다발성 근염/피부근염(polymyositis/dermatomyositis), 다발성 연골염(polychondritis), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 웨게너육아종증(Wegener's granulomatosis), 막성 신증(membranous nephropathy), 신경 위축성 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수로(tabes dorsalis), 거대세포동맥염/다발성근육통(giant cell arteritis/polymyalgia), 악성빈혈(pernicious anemia), 급성 진행성 사구체신염(rapidly progressive glomerulonephritis), 건선(psoriasis) 및 섬유성 폐렴(fibrosing alveolitis)로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 42.

제 1항에 있어서, 상기 질병 조직에서 표적된 항원의 비율이 정상 조직의 1.6:1 이상의 비율을 초과하는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 43.

제 1항에 있어서, 상기 질병 조직에서 표적된 항원의 비율이 정상 조직의 5:1의 비율을 초과하는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 44.

제 1항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체들, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 동일하거나 또는 다른 표적들에 연관됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 45.

제 1항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체들, 항체 융합 단백질 또는 그 단편은 온전한 IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, scFvs, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies)로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 46.

제 1항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체는 항-CD22 단클론 항체임을 특징으로 하는 용도.

청구항 47.

제 1항에 있어서, 상기 접합된 및 비접합된 항체는 인간화된 LL2 단클론 항체임을 특징으로 하는 용도.

청구항 48.

제 47항에 있어서, 상기 인간화된 LL2 항체는 이트륨-90으로 방사성라벨된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 49.

제 46항에 있어서, 상기 항-CD22 단클론 항체는 인간임을 특징으로 하는 용도.

청구항 50.

제 44항에 있어서, 상기 접합된 항체는 복용당 20-600mg 단백질의 복용량으로 비경구 투여됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 51.

제 44항에 있어서, 상기 접합된 항체는 복용당 20-150mg 단백질의 복용량으로 비경구 투여됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 52.

제 44항에 있어서, 상기 접합된 항체는 복용당 20-100mg 단백질의 복용량으로 비경구 투여됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 53.

제 46항에 있어서, 상기 포유동물은 상기 항-CD22 단클론 항체를 복용당 20-150mg 단백질의 비경구적 복용량으로 반복하여 투여받음을 특징으로 하는 용도.

청구항 54.

제 46항에 있어서, 상기 포유동물은 상기 항-CD22 단클론 항체를 복용당 20-100mg 단백질의 비경구적 복용량으로 반복하여 투여받음을 특징으로 하는 용도.

청구항 55.

포유동물에서 질병을 치료하는데 이용하기 위한 약물의 제조에서 약제학적으로 허용가능한 운반제 및 하나 이상의 표적 항원 및 치료제에 결합하는 다특이성 다가 항체, 그 단편 또는 융합 단백질 접합체를 포함하는 치료용 조성물의 용도;

여기에서, 비방사성라벨된 항체를 통한 예비-복용이 수행되지 않으며, 상기 치료용 조성물은 상기 포유동물에 동시에 및 순차적으로 투여됨.

청구항 56.

포유동물에서 질병을 치료하는데 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서,

(A) 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 다특이성 다가 항체, 단편 또는 융합 단백질;

(B) 선택적으로, 혈액순환에서 비-국부적 항체들을 제거하기 위한 조성물을 허용하는 제거제; 및

(C) 상기 다특이성 다가 항체, 단편 또는 융합 단백질에 결합하는 치료 접합체의 약제학적 유효량;

을 포함하는 치료용 조성물의 용도;

여기에서, 비방사성라벨된 항체를 통한 예비복용하는 과정을 수행하지 않고, 상기 치료 조성물은 상기 포유동물에 동시에 및 순차적으로 투여됨.