



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년12월12일  
 (11) 등록번호 10-1092132  
 (24) 등록일자 2011년12월02일

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7013133(분할)  
 (22) 출원일자(국제출원일자) 1999년11월09일  
 심사청구일자 2011년06월08일  
 (85) 번역문제출일자 2011년06월08일  
 (65) 공개번호 10-2011-0075047  
 (43) 공개일자 2011년07월05일  
 (62) 원출원 특허 10-2001-7005716  
 원출원일자(국제출원일자) 1999년11월09일  
 심사청구일자 2004년11월08일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US1999/026308  
 (87) 국제공개번호 WO 2000/27428  
 국제공개일자 2000년05월18일  
 (30) 우선권주장  
 60/107,658 1998년11월09일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Ann Hematol 1998, 77(1-2):89-91\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**바이오젠 아이텍 인크.**  
 미국 02142 매사추세츠 캠프리지 캠프리지 센터 14  
 (72) 발명자  
**그릴로 로페즈 안토니오 제이**  
 미합중국 캘리포니아 92067 란초 산타 페 피.오. 박스 3797  
**화이트 크리스틴 에이.**  
 미합중국 캘리포니아 92067 란초 산타 페 피.오. 박스 9242  
 (74) 대리인  
**양영준, 양영환**

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 임혜준

**(54) 키메라 항-CD20 항체를 이용한 순환성 종양세포와 관련된 혈액학적 악성종양의 치료법**

**(57) 요약**

치료용 키메라 항-CD20 항체를 투여함으로써 높은 수의 순환성 종양세포와 관련된 혈액학적 악성종양을 치료하는 방법이 개시된다. 이러한 악성종양에는 특히 B-프로림프구성 백혈병(B-PLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 및 형질전환된 비호지킨 림프종이 포함된다.

(81) 지칭국

AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA,  
CH, LI, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,  
GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, NO, NZ, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,  
US, UZ, VN, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, AE,  
AG, CR, DM, DZ, MA, TZ, ZA, BZ, MZ, AP(KE, LS,  
MW, SD, SZ, UG, SL, GH, GM, ZW), EA(AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH,  
LI, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, FI, CY), OA(BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG, GW),

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

항-CD20 항체를 포함하는 제약 조성물 및 화학요법제를 포함하며, 여기서 항-CD20 항체는 화학요법제와 동시에 또는 순차적으로 환자에 투여되고, 화학요법제는 플루다라빈 및 시클로포스파미드로 구성된, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 치료용 치료학적 조합물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 항-CD20 항체가 리투시맙인 치료학적 조합물.

**청구항 3**

(1) 치료적 유효량의 항-CD20 항체를 투여함으로써 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 치료하는 제약 조성물, 및 (2) 항-CD20 항체를 500 내지 1500 mg/m<sup>2</sup>의 용량으로 투여함을 지시하는 패키지 삽입물(package insert)을 포함하는 키트.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 패키지 삽입물이 플루다라빈 및 시클로포스파미드로 구성된 화학요법제를 항-CD20 항체와 조합하라는 지시를 추가로 포함하는 것인 키트.

**청구항 5**

제3항 또는 제4항에 있어서, 항-CD20 항체가 리투시맙인 키트.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 B세포 표면항원 Bp35(CD20)에 결합하는 키메라 또는 인간화 항체를 치료학적 유효량으로 투여함으로써 높은 수의 순환성 종양세포와 관련된 혈액학적 악성종양을 치료하는 것에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] B세포 림프종에 대한 진단 및/또는 치료제로서 CD20에 대한 항체를 사용하는 것은 이전부터 보고되어 왔다. CD20은 이 항원이 계속된 증식으로 B세포 림프종을 일으킬 수 있는 B세포인 악성 B-세포의 표면에서 매우 고밀도로 발현되기 때문에 B세포 림프종에 대한 유용한 표지 또는 표적이다.
- [0003] CD20 또는 Bp35는 초기 B-전구세포가 발달하는 동안 발현되어 플라즈마 세포가 분화할 때까지 잔존하는 B-세포 제한 분화항원이다. CD20 분자는 세포주기개시 및 분화에 필요한 B세포 활성화과정 중 한 단계를 조절할 것이라고 생각된다. 또한, 앞에서 말한 바와 같이, CD20은 신생물("종양") B세포에 매우 고수준으로 발현된다.
- [0004] 항-CD20 항체를 포함하는 이전에 보고된 치료법들에는 치료용 항-CD20 항체를 단독으로 또는 제2의 방사선표지 항-CD20 항체 또는 화학요법제와 조합하여 투여하는 것이 포함된다.
- [0005] 사실, 식품의약청은 재발 및 이미 치료된 저급 비호지킨 림프종(NHL)의 치료에 사용하기 위한 치료용 항-CD20 항체인 RITUXAN<sup>®</sup>과 같은 항체의 치료적 사용을 승인하였다. 또한 B세포 림프종을 치료하기 위하여 RITUXAN<sup>®</sup>를 방사선표지 위의 항-CD20 항체와 조합하여 사용하는 것이 제안되어 왔다.
- [0006] 그러나, 항-CD20 항체 및, 특히 RITUXAN<sup>®</sup>이 비호지킨 림프종과 같은 B세포 림프종의 치료에 효과적이라고 보고되어 왔지만, 다른 악성종양에 효과적인 항체치료법이 개발될 수 있다면 유익할 것이다. 보다 구체적으로 항-CD20 항체가 다른 형태의 악성종양의 치료에 사용될 수 있다면 유익할 것이다.

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

- [0007] 이를 위하여, 본 발명자들은 치료학적 유효량의 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는 혈액 내 높은 수의 종양세포로 특징지워지는 혈액학적 악성종양의 신규한 치료법을 개발하여 왔다. 바람직한 실시형태에서, 그러한 항-CD20 항체는 키메라, 인간화 또는 인간의 항-인간 CD20 항체를 포함할 것이다. 그러한 혈액학적 악성종양의 예에는 B-프로-림프구성 백혈병(B-PLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 형질전환된 비호지킨 림프종이 포함된다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 항-CD20 항체의 투여를 포함하는 혈액학적 악성종양에 대한 신규한 치료법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 보다 구체적인 목적은 항-CD20 항체의 투여를 포함하는 B-프로-림프구성 백혈병(B-PLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 형질전환된 비호지킨 림프종에 대한 신규한 치료법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 보다 더 구체적인 목적은 치료학적 유효량의 RITUXAN<sup>®</sup>의 투여를 포함하는 B-프로-림프구성 백혈병(B-PLL) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL)에 대한 치료법이다.
- [0011] 본 발명은 혈액학적 악성종양 및, 특히 혈액 내 높은 수의 종양세포로 특징지워지는 혈액학적 악성종양이 치료용 항-CD20 항체를 투여함으로써 효과적으로 치료될 수 있다는 발견을 포함한다. 이들 악성종양에는 특히, CLL, B-PLL 및 형질전환된 비호지킨 림프종이 포함된다.
- [0012] 이러한 발견은 재발 및 이미 치료된 저급 비호지킨 림프종의 치료법으로 RITUXAN<sup>®</sup>이 크게 성공하였다고 보고되었음에 불구하고 놀랄만하다. 특히, 이 발견은 그러한 환자들에게서 발견되는 매우 높은 수의 종양세포를 생각하고, 예를 들면, CLL세포와 같은 악성세포가 일반적으로 재발 및 이미 치료된 저급 비호지킨 림프종과 같은 일부 B세포 림프종의 특징인 고밀도의 CD20 항원을 발현하지 않는다는 사실을 생각하면 놀랄만하다. 결과적으로, CD20항원이 그러한 악성종양의 치료용 항체치료에 적합한 표적을 구성할 것이라는 것을 합리적으로 예상할 수 없었다.
- [0013] 본 발명에 따른 CLL, B-PLL 및 형질전환된 비호지킨 림프종과 같은 혈액학적 악성종양의 치료법은 치료학적 유효량의 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함할 것이고, 그 투여는 단독으로 또는 예를 들어 화학요법, 방사선요법(예를 들면, 전신 방사선조사 또는 방사선표지된 항체로 치료)과 같은 다른 치료법들과 함께 효과를 나타낼 수 있다. 또한 사이토카인과의 조합치료는 림프종세포의 표면상 CD20을 상향조절하는데 유용할 수 있다.

- [0014] 바람직한 실시형태에서, 항-CD20 항체는 높은 친화력, 즉  $10^{-5}$  내지  $10^{-9}$ M 범위의 친화력으로 CD20과 결합할 것이다. 바람직하게는, 항-CD20 항체는 키메라, 영장류, 영장류화<sup>®</sup>(primatized<sup>®</sup>), 인간 또는 인간화 항체를 포함할 것이다. 또한, 본 발명은 항체단편, 예를 들면, Fab's, Fv's, Fab's, F(ab)<sub>2</sub> 및 그들의 응집체의 사용을 포함한다.
- [0015] 키메라항체는 비인간의 가변영역과 인간의 불변영역, 가장 대표적으로는 설체류의 가변영역과 인간의 불변영역을 가진 항체를 말하는 것으로 한다.
- [0016] 영장류화<sup>®</sup> 항체는 예를 들면 CDR's와 같은 영장류의 가변영역 및 인간의 불변영역을 가진 항체를 말한다. 바람직하게는, 그러한 영장류 가변영역은 구세계 원숭이(Old World monkey)로부터 유래한다.
- [0017] 인간화 항체는 실질적으로 인간의 골격과 불변영역, 및 비인간의 상보성결정영역(complementarity-determining regions, CDRs)를 가진 항체를 말한다. "실질적으로"는 인간화 항체가 적어도 (CDRs가 유래되는 비인간 모항체의) 여러 가지 공여자 골격간기를 일반적으로 보유한다는 사실을 말한다.
- [0018] 키메라, 영장류, 영장류화<sup>®</sup>, 인간화 및 인간항체를 제조하는 방법은 당해 기술분야에서 공지되어 있다. 예를 들면 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 삽입된 퀸(Queen) 등에게 발행된 미국특허 제5,530,101호, 윈터(Winter) 등에게 발행된 미국특허 제5,225,539호, 보스(Boss) 등과 캐빌리(Cabilly) 등에게 각각 발행된 미국특허 제4,816,397호 및 제4,816,567호를 참조.
- [0019] 인간의 불변영역을 선택하는 것은 그 항-CD20 항체의 치료효능에 중요할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항-CD20 항체는 인간의 감마 1, 또는 감마 3 불변영역 및, 보다 바람직하게는 인간의 감마 1 불변영역을 포함할 것이다. 감마 1 항-CD20 항체를 치료제로 사용하는 것은 로빈슨(Robinson) 등에게 발행된 미국특허 제5,500,362호에 개시되어 있다.
- [0020] 인간의 항체를 제조하는 방법도 공지되어 있고, 한 예로서, SCID 마우스에서의 생산, 및 시험관내 면역화가 포함된다.
- [0021] 앞서 말한 바와 같이, 특히 바람직한 키메라 항-CD20 항체는 키메라 감마 1 항-인간 CD20 항체인 RITUXAN<sup>®</sup>이다. 이 항체에 대한 완전한 아미노산 및 대응하는 핵산서열은 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 삽입된 미국특허 제5,736,137호에서 알 수 있다. IDEC 제약회사(IDEC Pharmaceuticals Corporation)가 시판하는 전매 CHO 세포 발현시스템에서 생산된 이 항체는 메릴랜드주 20852 로크빌 파크론 드라이브 12301에 위치한 ATCC(American Type Culture Collection)에 부다페스트조약의 규정에 의해 1992년 11월 4일에 기탁된 CHO세포 트랜스펙토마(transfectoma)에 의해 만들어진다. 이 세포주는 기탁기간동안 생존가능하도록 규정되어 있고 생존이 불가능해지면 대체될 것이다. 이 세포주는 미국특허 제5,736,137호의 발행에 따라 취소할 수 없게 입수가능하게 되었고 ATCC로부터 제한없이 입수할 수 있다. 이 세포주는 이 출원에 근거하여 발행될 수 있는 어떤 특허권의 존속기간동안에도 제한없이 입수가능할 것이다.
- [0022] 항-CD20 항체는 다양한 투여경로, 일반적으로 비경구적으로 투여될 것이다. 이것은 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질, 및 바람직한 정맥주입으로의 투여를 포함하는 것으로 한다.
- [0023] 항-CD20 항체는 멸균식염수, 멸균완충수, 프로필렌글리콜 및 이들의 조합과 같은 약학적으로 허용가능한 완충액을 첨가하는 등의 표준방법에 의해 치료적 용도로 조성될 것이다.
- [0024] 유효한 투여량은 다른 조건들 중에서도 특정 항체, 환자의 조건, 나이, 체중, 또는 다른 치료법에 따라 다를 것이다. 일반적으로 유효한 투여량은 체중 1kg당 약 0.001 내지 약 30mg, 더 바람직하게는 체중 1kg당 약 0.01 내지 약 25mg, 및 가장 바람직하게는 체중 1kg당 약 0.1 내지 약 20mg일 것이다.
- [0025] 그러한 투여는 투여되는 양과 환자반응에 따라, 예를 들면 매주, 매2주, 또는 매월의 다양한 프로토콜에 의해 효과를 얻을 수 있다. 또한 그러한 투여를 방사선치료, 표적화 또는 비표적화 화학요법과 같은 다른 치료법, 및 인터루킨, 인터페론, TNF's, 콜로니자극인자 등과 같은 림포카인 또는 사이토카인 투여와 조합하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0026] 일반적으로, 치료는 약 2 내지 10주 동안, 보다 일반적으로는 약 4주 동안 매주 이루어질 것이다. 특히 바람직한 투여량은 총 4회 주입하는 동안 매주 약 .375mg/kg을 투여하는 것을 포함할 것이다. 또한 계단식 상승 투여

계획이 보다 더 바람직할 수 있다.

- [0027] 치료용 항-CD20 항체와 함께 방사선이 사용된다면, 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 삽입된 미국특허 제 5,736,137호에 개시된 바와 같은 이트림-표지 항-CD20 항체를 이용하는 것이 바람직하다. 이 항체, 2B8-MX-DTPA는 B세포 림프종의 치료에서 효능이 보고되었다. 2B8항체를 생산하는 세포주는 또한 부다페스트조약의 규정에 의해 1993년 6월 22일에 ATCC에 기탁되었고, 어떠한 제한없이 미국특허 제5,736,137호의 발행에 따라 취소불가능하게 이용가능하게 되었다. 따라서 세포주는 이 출원에 근거하여 발행된 어떤 특허권의 존속기간 동안 생존가능하여야 하고, 생존이 불가능하게 되면 유사하게 대체되어야 할 것으로 밝혀졌다.
- [0028] 항체면역치료와 함께 사용될 수 있는 특히 바람직한 화학요법에는 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손을 조합하여 투여하는 것을 포함하는 CHOP 면역치료가 포함된다. 다른 공지의 면역요법에는 메소트렉세이트, 시스플라틴, 토레미펜 및 타목시펜이 포함된다.
- [0029] 하기 실시예들은 본 발명을 제한하지 않는다. 실시예들은 본 발명의 효능을 입증하기 위한 임상적 증거를 제공하기 위한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**실시예 1**

- [0030] 심각한 폐 주입관련독성 및 혈소판감소증과 관련되고, 우리가 혈액중양세포의 급격한 감소를 목격한 두 환자를 연구하였다. 또한 RITUXAN<sup>®</sup> 치료와 관련된 부작용에 관한 의사-제출 보고서에서 2명의 추가환자를 모았다. 이 환자들의 사전치료 특징화에는 B-프로림프구성 백혈병(B-PLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 또는 형질전환된 비호지킨 림프종의 진단을 받은 60세의 중앙연령(26 - 73세 범위)이 포함되었다. 이들 환자는 모두 혈액중양침습, 거대선증 및 장기종대의 결과로 증가된 백혈구수를 나타내었다. 4명의 환자 모두 RITUXAN<sup>®</sup> 치료의 일시적 증지를 필요로 하는 열, 경직, 저산소혈증과 관련된 기관지경련으로 특징지어지는 심각한 주입관련 반응의 독특한 증후군을 나타내었다. 이들 증상과 함께, 순환성 종양세포에서의 급격한 감소는 빠른 중앙용해의 완만한 전해질 징후를 준다(평균 전치료 L당  $98 \times 10^9$ ; 범위 73-132 대 평균 후치료 L당  $11 \times 10^9$ ; 범위 3.7-24.6). RITUXAN<sup>®</sup> 치료와 일반적으로 관련되지 않는 발견인 혈소판감소증은 4명의 환자 모두에서 발견되었고(평균 전치료 L당  $145 \times 10^9$ ; 범위 57-277 대 평균 후치료 L당  $56 \times 10^9$ ; 범위 2-120), 한 경우에는 수혈이 필요하였다. 이 증후군의 증상은 입원을 필요로 하였지만 유지간호로 해결되었다. 연속적인 RITUXAN<sup>®</sup> 치료는 모든 환자들에서 잘 면역관용되었다. CLL에 걸린 2명의 연속환자들은 입증된 효능, 혈소판감소증을 갖지만 최소 주입-관련 독성을 가진 계단식 상승 투여(이들 치료를 선 후 하루에  $100\text{mg}/\text{m}^2$ )를 이용하여 높은 혈액중양수로 치료하였다. 혈액중양세포 침습을 가진 혈액학적 악성종양에 걸린 환자들에게 RITUXAN<sup>®</sup> 을 투여하는 것은 주의깊은 임상관찰을 필요로 하는 고빈도의 심각한 초기 주입관련반응 및 혈소판감소증과 관련될 수 있다. 이들 환자들에서 RITUXAN<sup>®</sup> 의 예비활성을 생각하면, 계단식 상승 투여계획을 이용한 CLL과 PLL에서의 추가연구가 수행되어야 한다.

**실시예 2**

- [0031] 비표지 면역글로불린(Mab)은 그들이 보체(CDC) 또는 효과기 세포(ADCC)로 세포독성을 매개하고; 세포자멸사를 초래하고; 독성이 낮고, 면역원성이 낮으며, 독소- 또는 약품-결합 Mab보다 더 효과적일 가능성이 있고; 방사선 표지 Mab 치료(RIT)에 필요한 복잡한 절차를 필요로 하지 않고, 고투여량 RIT를 나타내는 골수억제를 야기하지 않을 수 있기 때문에 NHL의 치료에 흥미롭다. 최근까지, 혈액학적 악성종양의 치료에 Mab를 사용하는 것은 제한되어 왔다. 그러나, 키메라 항-CD20 Mab인 RITUXAN<sup>®</sup> 은 낮은 독성 및 상당한 임상적 효능을 가져서 지금 개발된 또는 난치성, 저급 또는 소포성(R-LG/F) NHL의 치료에 대해 식품의약청(US FDA 11/97; EU 6/98)의 승인을 받았다. 단일약제 임상시험(PIII)에서, 4회 주입하는 동안 매주  $375\text{mg}/\text{m}^2$ 의 RITUXAN<sup>®</sup> 으로 치료받은 R-LG/F NHL에 걸린 166명의 환자 중(연구 102-05), 총 반응률(ORR)은 48%였다(6% CR 및 42% PR). 반응자들에 대한 진행의 중앙시간은 13.1개월이었고 반응지속시간은 11.2개월이었다. 중앙 순환성 B림프구 수는 제1투여 후 0까지 떨어졌다. CD3, CD4, CD8 및 NK세포 수는 변하지 않고 유지되었다. 말초혈액에서의 B세포 회수는 6-9개월에 시작하여 9-12개월에 완료되었다. 혈청보체수준에서도 상당한 변화는 없었다. CDC, ADCC, 세포자멸사 및/또는 고려되는 다른 것들에 대한 작용메카니즘은 설명되지 않고 있다. 임상적/실험적 상관관계가 없음에도 불구하고,

CDC의 기여는 무시할 수 없다. 우리는 기본선에서 더 높은 절대 NK세포수와 Mab에 대한 반응 사이의 상관관계를 알아 보았다.

표 1

[0032]

세포형태	환자수 (CR+PR)	절대수	환자수 (NR)	절대수	P값
NK	98	180	15	98	0.02
MK+ANC	98	185	15	102	0.02
ANC	101	3.7	15	3.4	0.40
CD3+	98	761	15	576	0.37
혈소판	101	187	15	206	0.32

주 : N = 연구 102-05에서의 166명의 환자 및 102-06에서의 37명 환자. 절대수:  
NK, CD3 = 세포/mm<sup>3</sup>; ANC, Pts = 세포×10e3/mm<sup>3</sup>. 절대수들간 차이에 대한 P값.

[0033]

ADCC는 RITUXAN<sup>®</sup>로 치료된 환자에서 나타나는 임상적 활성에 대한 중요한 메카니즘일 수 있다. 효과기세포수와 활성을 증진시키는 약제는 Mab와 상승작용을 일으킬 수 있다. IL-2, G-CSF, GM-CSF, INF와 같은 사이토카인과 결합한 RITUXAN<sup>®</sup>의 연구가 진행중이다.

실시예 3

[0034]

CLL에서 RITUXAN<sup>®</sup>의 I/II기 연구

[0035]

RITUXAN<sup>®</sup>은 저급 림프종(LGL)의 치료에서 상당한 활성을 가지는 모노클로날 항체 표적화 CD20이다. 매주 375mg/m<sup>2</sup> 투여량으로 주어졌을 때, 재발된 환자(PTS)에서 4회 반응률은 43%였다(McLaughlin et al, (1998) J Clin Oncol 16(8):2825-33). 소림프구성 림프종에 걸린 환자들은 다른 하부형태의 LGL에 걸린 환자들보다 더 낮은 반응률(13%)과 더 낮은 혈청수준의 RITUXAN<sup>®</sup>을 가졌다. SLL에서 감소된 반응은 저밀도의 CD20 항원 및/또는 높은 순환성 B세포수에 관련될 수 있었다. 양 인자들은 CLL에서 나타난 반응에 (부정적으로) 영향을 미칠 것으로 예상될 것이다. CLL에서 활성을 최대화하기 위한 시도로, 우리는 I/II기 연구를 하고 있다. 모든 환자들은 주입-재발 부작용을 최소화하기 위하여 375mg/m<sup>2</sup>의 제1투여량을 받는다. 연속적인 주당 투여량(3)은 동일하게 유지되었지만 증가된 투여수준으로 주어진다. 16명의 환자들은 500-1500mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 치료되었다. 중앙연령은 66세였다(범위, 25-78세). 81%는 III/IV말기 질환을 가졌다. 중앙백혈구수는 40×10<sup>9</sup>/L(범위, 4-200), Hgb는 11.6g/dl(범위, 7.7-14.7), 혈소판은 75×10<sup>9</sup>/L(범위, 16-160), 중앙 β<sub>2</sub> 면역글로불린은 4.5mg/L(범위, 3.1-9.2)였다. 이전 치료의 중앙수는 2.5(범위 1-9)였다. 60%의 환자들은 치료에 반응하지 않았다. 2명의 환자는 제1투여(375mg/m<sup>2</sup>)로 심각한 고혈압을 나타내었으며; 다른 환자는 더 치료를 받았다. 1500mg/m<sup>2</sup> 투여수준에서는 어느 환자도 충분히 평가되지 않았지만 연속적인 상승된 투여에서의 독성은 낮았다. 8명의 환자는 치료를 완료하였다(500mg/m<sup>2</sup>에서 4명, 650mg/m<sup>2</sup>에서 3명, 825mg/m<sup>2</sup>에서 1명). 650mg/m<sup>2</sup>로 치료받은 1명의 환자는 완전히 관해되었다. 1명의 환자는 치료에서 진행성 림프종증가증을 나타내었고, 모든 다른 환자들은 말초혈액 림프구증가증에서 감소를 나타냈지만 림프절에서는 덜 효과적이었다. 투여량증가연구가 진행중이다.

실시예 4

[0036]

CD20의 발현을 상향조절하기 위한 사이토카인의 사용

[0037]

CLL환자에서 반응성을 개선하기 위한 다른 접근방식은 사이토카인을 사용하여 CD20 항원을 상향조절하는 것이다. 시험관 내 연구에서, CLL 환자로부터의 단핵세포는 다양한 사이토카인으로 24시간동안 배양하였다. 유세포분석기 결과는 IL-4, GM-CSF, 및 TNF-알파에 의한 상당한 상향조절을 나타내었다. (Venugopal P, Sivaraman S, Huang X, Chopra H, O'Brein T, Jajeh A, Preisler H. 사이토카인에 대한 시험관 내 노출에 의한 만성 림프구성 백혈병(CLL) 세포에서 CD20 발현의 상향조절, Blood 1998; 10:247a). 사실, 최근의 데이터는 CLL 세포 상에서 관찰되는 CD20의 상향조절이 종양세포에 제한될 수 있다고 제시한다(Venugopal et al. Poster - PanPacific Lymphoma meeting, June 1999. 만성 림프구성 백혈병(CLL)세포에서 CD20 항원발현의 사이토카인-유도 상향조절은 종양세포에 제한될 수 있다). 예비데이터도 인터페론 알파도 500 내지 1000U/ml의 농도로 적용

했을 때 단 24시간 후에 CLL 세포 상의 CD20을 상향조절한다는 것을 제시한다.

[0038] 따라서 RITUXAN<sup>®</sup>을 투여하기 전 또는 투여와 동시에 CLL환자에게 어떤 사이토카인을 투여함으로써, 악성 B세포의 표면 상의 CD20의 발현이 상향조절될 수 있고, 그에 따라 CD19와 같은 다른 세포표면표지뿐 아니라 CD20을 면역치료를 위한 더 흥미로운 표적으로 만들 수 있다.

[0039] 생체 내 CD20 상향조절을 위한 최적 사이토카인 투여에 대하여 시험하기 위하여 공동연구가 시작되었다. 이 연구프로토콜에는 10명의 환자를 250mcg/m<sup>2</sup> SQ QD X 3의 GM-CSF로 처음 치료하고, 10명의 환자를 IL-4 mcg/kg SQ QD X 3로 치료하고, 10명의 환자를 5mcg/kg SQ QD X 3의 G-CSF로 치료하는 단계가 포함된다. CD20의 상향조절이 RITUXAN<sup>®</sup>에 의한 종양세포의 증진된 사멸을 설명하는지 여부를 결정하기 위한 세포자멸사연구를 위하여 피콘 하이파크 원심분리(Ficon Hypaque centrifugation)에 의해 단핵세포를 분리할 것이다.

**실시예 5**

[0040] 항체와 화학요법 프로토콜 조합

[0041] CLL의 항체치료는 CLL의 치료에 유용한 것으로 알려진 다른 종래의 화학요법치료와 결합할 수 있다. CLL에 대해 가장 흔히 사용되는 단일약제는 클로람부실(류케탄)으로, 매일 0.1mg/kg으로 또는 매 4주마다 0.4 내지 1.0mg/kg을 투여한다. 클로람부실은 종종 경구용 프레드니손(30 내지 100mg/m<sup>2</sup>/d)과 조합되는데, 이것은 자가면역 혈구감소증의 처방에서 유용하다. 시클로포스파미드는 클로람부실에 대한 대안으로 일반적인 투여량은 빈크리스틴과 스테로이드와 함께 매 3-4주마다 1-2g/m<sup>2</sup>이다(예를 들면 COP법).

[0042] COP(시클로포스파미드, 옹코빈, 및 프레드니손), 및 CHOP(이들 3가지 약물 + 독소루비신)을 포함하여 다양한 약물조합이 CLL에 사용되고 있다. 플루다라빈은 CLL의 치료에서 효과를 나타내었고, 매 3-4주마다 25-30mg/m<sup>2</sup>/d로 치료된 환자들의 그룹에서 50%의 ORR을 나타내었다. (<http://www.cancernetwork.com>). 비록 일부환자들은 플루다라빈에 반응을 하지 않는 것으로 나타났지만, 플루다라빈에 반응하지 않는 환자들이 종종 2-CDA에도 반응하지 않기 때문에 그러한 환자들은 2-CdA에도 저항성이 있을 수 있다(O'Brien et al. N. Engl. J. Med. 330:319-322(1994)).

[0043] 따라서 항-CD20 항체치료는 화학요법제로 치료한 후 재발되었거나 난치성인 환자들에게 특히 유용할 것이다. RITUXAN<sup>®</sup> 치료는 이들 환자들에서 방사선치료와 결합할 수도 있다. 75 내지 150cGy의 총투여량에 대하여 15cGy의 낮은 분획크기를 가지는 TBI는 환자들 중 약 1/3에서 효과적인 것으로 나타났다.

[0044] II기 임상연구는 현재 CLL환자들에게서 CALGB에 의해 행해지고 있다. RITUXAN<sup>®</sup>와 플루다라빈은 동시에 투여된 후, RITUXAN<sup>®</sup> 경화 대 RITUXAN<sup>®</sup>에 의한 플루다라빈 유도가 일어난다.

[0045] 본 연구의 목표는 (1) 플루다라빈으로 치료된 CLL환자들에서 동시 및 경화성 RITUXAN<sup>®</sup> 치료(Arm I) 및 경화성 RITUXAN<sup>®</sup> 치료(Arm II)의 완전반응(CR)률 및 독성을 확인하는 것; (2) RITUXAN<sup>®</sup>와 플루다라빈으로 동시치료(Arm I의 유도기)를 받은 환자들에서 CR률을 평가하는 것; (3) RITUXAN<sup>®</sup>과 함께 경화성 치료를 받은 CLL환자들에게서 부분반응(PR)의 CR로의 전환빈도 또는 안정한 질환의 PR 또는 CR로의 전환빈도를 평가하는 것; (4) 면역표지인 CD4, CD8, IgG, IgA 및 IgM에 대한 RITUXAN<sup>®</sup>와 플루다라빈으로의 치료의 효과를 추적하는 것; 및 (5) Arm I 및 II에서 비진행성 생존자 및 전체 생존자를 조사하는 것이다.

[0046] 본 발명은 명확성 및 이해를 위하여 실시예에 의해 약간 상세하게 설명되었지만 어떤 변화 및 변형들이 첨부된 특허청구범위의 범위 내에서 이루어질 수 있음은 명백할 것이다.