



(54) 면역 질환을 치료하기 위한 치료제로서의 가용성 림포톡신-베타 수용체, 항림포톡신 수용체 항체 및 항림포톡신 리간드 항체

요약

본 발명은 림포톡신-β 수용체 시그널링을 차단하는 "림포톡신-β 수용체 차단제"를 포함하고 면역성 질병, 특히 항체 매개된 면역 반응을 변형시키는 데 유용한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도

도 7

명세서

기술분야

본 발명은 림포톡신-β수용체의 시그널링을 차단하는 "림포톡신-β 수용체 차단제"를 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 림포톡신-β수용체 차단제는 면역 질환을 치료하는데 유용하고, 보다 구체적으로 항체 매개의 면역 반응을 억제하고, 아드레신 발현과 세포 트래피킹(trafficking)을 조절하며, 소낭 수상돌기 세포의 분화에 영향을 미치는 역할에 유용하다. 본 발명은 림포톡신-β수용체 세포의 도메인의 가용성 형태 및 림포톡신-β수용체 차단제로서 작용하는 표면 림포톡신인 림포톡신-β수용체 또는 이의 리간드에 대하여 유도되는 항체에 관한 것이다.

배경기술

공동의 목표인 항원을 제거하기 위해 공조하며 상이한 효과를 나타내는 면역계의 독특한 참여인자에 의해 매개되는 후천성 면역에는 2가지 부류가 있다. 후천성 면역 반응의 1가지 부류인 체액성 면역은 주로 B 세포와 순환성 항체가 매개한다. 다른 부류인 세포 면역 또는 세포 매개 면역은, 다른 세포에 영향을 주어 시토킨을 합성하고 개질하는 T 세포가 매개한다.

대부분의 항원에 대한 반응으로 B 세포가 활성화하고 분화하기 위해 B 세포는 (1) 항원 특이적 수용체인 막의 Ig을 통해 항원 시그널과 (2) 활성화된 T 세포 유래의 접촉 의존적 시그널과 접촉 독립적 시그널을 수용해야 한다. 접촉 의존적 동시 자극 시그널은 활성화된 T 헬퍼 세포 상에서 발현되는 CD40 리간드에 B 세포 상의 CD40 수용체가 결합되면 나타난다 [Laman et al., Crit.Rev.Immunol., 16, pp.59-108(1996); Van Kooten and Banchereau, Adv.Immunol., 61, pp.1-77 (1996)]. 접촉 독립적 시그널링은 활성화된 T 세포가 합성하여 개질시킨 시토킨이 매개한다. 이와 같은 접촉 의존적 시그널과 접촉 독립적 시그널은 함께 B 세포의 분화를 유도하여 (1) 항원에 2차 노출시 보다 신속한 반응을 매개하도록 유도된 기억 B 세포 또는 (2) 항체 분비성 혈장 세포를 만든다. B 세포의 말단 분화 단계인 혈장 세포는 항체를 합성하고 분비한다.

T 헬퍼 세포("Th")는 면역계에서 여러가지 유의적인 역할을 한다. 면역 공격이 개시될 때 Th 세포에 의해 개질된 시토킨은 후속적으로 활성화되는 면역 작동인자 경로에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 바 있다. 이 세포는 이것의 항원 특이적인 수용체와 항원 증여 세포(APC)와 상호작용으로 활성화되어 그 표면 상에 MHC 제II군 분자에 회합된 가공처리된 이종 항원의 펩티드 단편을 제공한다. 이와 같이 활성화된 Th 세포는 그 다음 적당한 면역 작동인자의 기작을 활성화하는 시토킨(림포킨)을 분비한다.

이 세포는 시토킨 분비 패턴에 따라 3가지 아군인 Th0, Th1 및 Th2로 분류할 수 있다[Fitch et al., Ann.Rev.Immunol., 11, pp. 29-48(1993)]. 마우스에서, 자극되지 않은 "천연" T 헬퍼 세포는 IL-2를 생성한다. Th 세포는 단기간 자극하면, IFN-α, IL-2, IL-4, IL-5 및 IL-10을 비롯한 다양한 시토킨을 생성하는 Th0 전구체 세포가 얻어진다. 만성적으로 자극된 Th0 세포는 Th1 또는 Th2 세포 형태로 분화할 수 있으며, 이 때 시토킨의 발현 패턴이 변화한다. 이 Th1 세포와 Th2 세포는 특정 시토킨, 예컨대 IL-3, GM-CSF 및 TNF를 방출한다. 다른 시토킨들은 단지 1가지 Th 세포 아군에 의해서만 만들어진다[Romagnani et al., Ann.Rev.Immunol., 12, pp. 227-257(1994)]. Th1 세포는 LTaIL-2와 IFN-γ를 생성하고, 이 LTaIL-2와 IFN-γ는 세포내 감염에 대한 내성과 세포 면역과 관련있는 염증 반응과 대식세포를 활성화시킨다.

Th2 세포는 시토킨 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10을 생성하여 호산구와 비만 세포 생성을 증가시키며 B 세포의 완전한 팽창과 성숙을 촉진한다[Howard et al., "T cell-derived cytokines and their receptors", Fundamental Immunology, 3d ed., Raven Press, New York(1993)]. 또한, Th2 세포는 B 세포 기억, 체세포 돌연변이 및 결과적으로 친화성 성숙 유발에 관여하고 다시 면역글로불린 아이소타입 변환을 조절하는데 관여한다. 예컨대, Th2 시토킨 IL-4는 활성화된 B 세포를 IgG1 아이소타입으로 변환시키며, 다른 아이소타입으로의 변환은 억제한다. 또한, IL-4는 I형의 과민 반응에서 IgE의 과잉생성을 자극한다. Th2 시토킨 IL-5는 점막 면역에 중요한 IgA 아이소타입을 유도한다.

2차 림프구양 조직, 예컨대 림프절(LN), 비장 및 점막 림프구양 조직은 이종 물질을 포획하고 농축하는데 매우 효과적이며 T 림프구와 B 림프구의 항원 유도성 활성화 및 분화가 일어나는 주요 부위이다. 이 과정은 상기 조직 중에 존재하는 세포의 다양성과 구조에 따라 다르며, 체액성 면역 반응의 다양한 양태, 예컨대 T/B 세포 상호작용, 중중심(GC) 형성, 친화성 성숙, 면역글로불린 종류 변환 및 세포 트래피킹의 주요 과정을 구성한다[Klein, J., Immunology, John Wiley and Sons, 1982]. 그러나, 말초 림프구양 조직의 발생, 구조 유지 및 기능에 관여하는 분자 기작에 대해서는 충분히 알려져 있지 않다.

2차 림프구양 조직의 전반적인 구조는 크게 다르고 포유류 종간에도 차이가 있지만 그 세부 구조는 일정한 특징, 예컨대 (1) 항원 접근성, (2) 림프구와 항원의 접촉을 지속시키는 구조적 특징, (3) B 세포에 의해 둘러싸인 T 세포 풍부 영역, (4) B 세포 풍부 소낭(follicle), (5) 변연대(marginal zone) 형태의 영역, (6) 특정 내피 세포 및 (7) 항체 생성 부위와 같은 일부 특징을 공유하며, 이에 대해서는 이하에 상세히 설명된다.

2차 림프구양 조직은 반응계 중의 항원에 쉽게 접근한다. 예컨대, 항원은 동양(洞樣)혈관의 혈액 공급을 통해 비장에 접근하고 구심성 림프 혈관을 통해 LN에 접근하여, 특정 상피를 따라 점막 림프구양 조직으로 수송된다.

또한, 다양한 종에 존재하는 2차 림프구양 조직은 일부 구조적 특징, 예컨대 소낭 수상돌기 세포(FDC)와 조합 세포(IDC)를 공유하여 이 조직 중 림프구 풍부 영역에 항원이 지속적으로 존재하게 한다.

다른 공통적인 특징인 B 세포에 의해 둘러싸인 T 세포 풍부 영역의 존재이다. T 세포 풍부 영역으로는 예컨대 비장의 백색 펄프 중에 존재하는 동맥주위 림프구양초와, 다수의 재순환성 T 세포를 포함하는 LN과 결과적으로 T 세포와 B 세포의 부속 세포로서 작용하는 IDC의 부피질 영역을 포함한다.

또한, 림프구양 조직은 일반적으로 비장의 백색 펄프와 LN의 피질 중에 B 세포가 풍부한 1차 소낭과 2차 소낭을 보유한다. 이와 같은 림프구양 조직에 존재하는 2차 소낭은 중중심(GC)이라고도 부르며 항원을 포획하여 보유할 수 있는 치밀한 FDC 망구조를 보유한다.

변연대 형태의 영역으로는 쥐의 비장 중에 존재하는 일정 조직학적 영역과 인간의 제2 림프구양 기관 중에 존재하는 많은 산재성 부위가 알려져 있다. 이 영역들은 주로 변연대 대식세포(MZM), 친금속성 대식세포(MM), 변연대 B 세포 및 망상 세포를 포함하지만 T 세포와 수상돌기 세포도 포함할 수 있다[Kraal, Int.Rev.Cytol. 132, pp. 31-74(1992)]. 변연대 영역 중으로 동맥 혈류가 개방되면 항원은 전술한 세포에 직접 접근할 수 있게 되고, 이 부위에서 항원에 대한 세포 반응을 촉진한다[Kraal, Int.Rev.Cytol. 132, pp.31-74(1992)]. 또한, MZM의 존재는 비장의 백색 펄프 중에서 나타나는 B 세포의 최적 트래피킹에 필요하기도 하다[Kraal et al., 1992; Kraal et al., Immunology, 68, pp.227-232(1989)].

일반적으로, 혈액의 림프구는 변연대 유사 구조 중에 존재하는 비장 혈액 동양혈관의 내피 내막과 LN의 소정맥(고 내피 소정맥-HEV)의 내피 내막과 같은 특정 내피의 교잡을 통해 2차 림프구 조직으로 유입된다. 이 내피는 2차 림프구양 조직으로 세포 트래피킹 작용을 하는 점착 분자와 아드레신(addressin)을 발현한다. 예컨대, 말초 LN 아드레신(PNAd)은 점막 LN 아드레신인 MAdCAM-1과 다른데, 이 점막 LN 아드레신은 점막 림프구양 조직, 예컨대 장간막 LN, 파이어판 및 고유판과 같은 조직의 림프구 트래피킹 과정에 관여한다.

일부 아드레신은 분명하게 밝혀져 있지 않은데, 예컨대 림프구를 비장으로 유도하는 아드레신은 아직 밝혀지지 않았다. 이 아드레신의 생리학적 역할로는 항원 특이적인 림프구의 적당한 군이 면역 반응 중으로 소집되는 과정을 향상시키고, 이어서 신체 전반으로 면역 반응을 분산시키는 역할을 포함한다.

마지막으로, 항체 생산성인 혈장 세포는 항원에 의해 선조 B 세포가 활성화되는 부위와는 다른 위치에서 검출된다. 예컨대, 적비수 중에 존재하는 혈장 세포에 의해 생성되는 항체는 주로 T 세포 영역에 존재하는 B 세포를 활성화시키고, LN의 수질에 존재하는 혈장 세포는 동일한 소절의 T 세포 영역에서 활성화된 B 세포에서 유래된다. 이와 유사하게, 골수 중의

혈장 세포에 의해 생성되는 항체는 비장과 림프절에서 활성화된 B 세포의 유도체이며, 위의 고유관에 존재하는 혈장 세포는 장관막 LN이나 위 관련 림프구양 조직에서 활성화된 B 세포에서 주로 유래되는 것이다. 예컨대, 문헌[ICM MacLennan, "The Structure and Function of Secondary Lymphoid Tissues" in Clinical Aspects of Immunology, 5th edition, eds. P.J.Lachman, Sir D.K.Peters, F.S.Rosen, M.J.Walport, Blackwell Scientific Publications pp 13-30 (1993)]을 참조하라.

일반적으로, T 의존적 항원에 대한 체액성 면역 반응의 기본이 되는 세포 반응/조직 반응은 다음과 같다[Toellner et al., J.Exp.Med., 183, pp.2303-2312(1996)].

유도 단계에서, 천연의 B 세포와 T 세포는 활성화되어 항원이 체내로 유입된 직후의 시기에 면역 반응 중에 보충된다. 예컨대, 비장에서는 2차 반응에 대한 면역화 후 12 시간 내에 기억 B 세포가 변연대 중의 혈액 유래의 항원과 접촉하여 변연대에서 T 세포 영역으로 이동한다. 따라서, B 세포는 24 시간 내에 T 세포 영역에서 검출될 수 있다. 면역글로불린 변환 전사물은 2차 항원에 노출된 후 12 시간내에 검출될 수 있는데, 이것은 T-B 세포의 상호작용이 이미 일어났음을 시사하는 것이다. 그 다음 B 세포는 출구대 적수로 이동하고, 여기에서 B 세포들은 증식하여 B 세포 종중심을 형성하고 혈장 세포로 분화한다. 또한, B 세포는 IDC가 풍부한 T 세포 영역에서 계속 증식한다. 면역화 후 4일 이내에 GC 중에서 증식된 후에는 B 기억 세포의 생성이 개시될 것이다. 1차 반응에서 면역화후 10일 이내에는 증식이 우수한 GC가 뚜렷이 관찰되었고 14일 이내에는 최고 크기의 GC가 관찰되었다.

T 세포 영역에서 T 세포의 증식은 면역화 후 48 내지 72 시간 이내에 뚜렷이 나타나기 시작하였고 7 일째 최고점에 도달하였다. 이와 같은 T 세포의 증식은 T 세포 의존적 B 세포 활성화에 큰 역할을 한다. T 세포 영역에서의 증식 수준은 GC가 형성되면 감소하기 시작한다. 또한, T 세포 증식은 암대(dark zone)에 존재하는 중심세포(B 세포)가 IDC 유래의 항원을 포착하여 항원을 명대 중의 T 세포로 제공하는 GC 중에서 일어난다.

T 세포 의존적 항원은 변연대 B 세포, 새로 생성된 천연의 B 세포 및 2차 림프구양 기관에 아드레신 및 점착 분자에 의해 유인되어 보유된 순환성 림프구를 활성화시킬 수 있다. 천연의 B 세포는 활성화된 B 세포와 마찬가지로 T 세포 영역 등으로 유입되는 동태가 동일한 것으로 나타난다.

### T 세포 의존적 반응의 안정 단계

T 세포 의존적 반응의 안정 단계는 2차 림프구양 기관의 소낭 중에서 기억 B 세포의 지속적인 활성화를 통해 유지된다. 이 단계에는 천연 B 세포가 거의 보충되지 않으며, 이 반응은 주로 FDC 상에 보유되는 항원에 의해 유도된다. GC는 최적의 기억 생성, 아이소타입 변환, 체세포 돌연변이 및 결과적으로 면역글로불린의 친화성 성숙에 필요하다.

이와 같은 림프구 반응에 이르면 다양한 경로를 통해 체내를 순환할 수 있는 항체, 예컨대 혈액을 통해 비장에서 나와 림프수출관을 통해 LN으로 배출되는 항체가 만들어진다. 이 항체는 그 후 침입 병원균과 만나 직접 결합한다. 이와 같은 인식 과정은 병원균에 대한 숙주 예방을 매개하는 보체 캐스케이드 반응 및 세포 반응의 활성화를 비롯한 일련의 면역 작동인자 기작을 일으킨다.

또한, 항체는 과민 반응, 즉 이전에 만났던 항원과 접촉 시 유발되는 부적당하거나 불균형성인 면역 반응과 같은 일부 병리학적 반응에도 관여한다. 알려진 과민증에는 4가지 종류가 있다.

제I형인 "즉시형 과민증"은 알레르겐 유도성 Th2 세포 활성화 및 Th2 시토킨 방출을 포함한다. Th2 시토킨 IL-4는 B 세포가 아이소타입 변환을 일으키도록 자극하여 IgE를 생성하고, 그 결과 비만 세포가 활성화되어 습진, 천식 및 비염을 유도하는 반응과 같은 급성 염증 반응을 일으킨다.

제II형 및 제III형 과민증은 세포 표면 항원이나 특정 조직 항원(제II형) 또는 순환성 면역 복합체를 형성하는 가용성 혈청 항원(제III형)에 대해 유도되는 IgG 항체 및 IgM 항체에 의해 일어난다.

제IV형인 "지연형" 과민증(DTH)은 Th1 세포 매개 반응이고 Th1 세포 전달에 의해 마우스간에 전이되며, 혈청 단독물의 전달시에는 전이되지 않는다. 이와 같은 특징으로 인하여, 제IV형 DTH는 무세포 혈청에 의해 전이될 수 있는 항체가 주로 유발하는 체액성 면역 반응을 필요로 하는 다른 3가지 유형의 과민증과 구별된다[Roitt et al., Immunology, pp.19.1-22.12(Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed.1993)].

병리학적 체액성 면역 반응은 많은 기관 특이적 자가면역 질환 및 전신성 자가면역 질환, 예컨대 전신성 홍반성 낭창, 베게너 육아종증, 결절성다발동맥염(PAN), 급성 진행성 겸상 사구체신염 및 특발성 혈소판감소성 자반병 뿐만 아니라 그레이브스병과 차가스병과 같은 만성 염증 질환 등과 관련이 있다. 또한, 체액성 면역 반응은 이식 조직 및 이식 기관 거부 반응에도 관여한다.

지금까지 이와 같은 다양한 면역 질환을 치료하는 데에는 면역조절제 및 면역억제제가 일반적으로 사용되어 왔다. 현재 사용되는 3가지 일반적인 면역억제제는 스테로이드, 시클로포스파미드 및 아자티오프린이다.

스테로이드는 활성화된 대식세포를 억제하고 T 세포의 다양한 병리적 작용을 반전시키는 방식으로 항원 증여 세포의 활성을 억제하는 다상유전성 소염제이다. 알킬화제인 시클로포스파미드는 DNA의 복제와 수복을 억제하여 세포의 사멸을 매개한다. 아자티오프린은 DNA 합성을 억제하는 증식억제제이다. 이와 같은 비특이적인 면역억제제는 일반적으로 다량이 필요하여 독성(예컨대, 신독성 및 간독성)을 증가시키고 부작용을 일으킨다. 따라서, 장기 치료법에는 적합하지 않다.

결과적으로, 종래 치료법에서 유발되는 문제점을 극복하는 첨가제와 치료법이 어울리지 않게 요구된다.

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 개요

본 발명은 림포톡신-β수용체 차단제를 사용하여 림포톡신-β수용체(LT-β-R) 시그널링을 억제함으로써 면역 질환을 치료하는 약학 조성물 및 그 치료 방법을 제공하여 전술한 문제점을 해결하는 것에 관한 것이다. 구체적으로, LT-β-R 차단제를 포함하는 조성물 및 방법은 항체 매개의 면역 반응을 억제하고, 아드레신 발현율과 세포 트래피킹을 조절하며, 소낭 수상돌기 세포의 분화에 영향을 미치고, 전신성 홍반성 낭창과 특발성 혈소판감소성 자반병과 같은 병리학적 질환을 일으키는 2차 림프구양 조직과 유사 림프구양 구조의 구조적 기구를 변화시키는데 유용하다. 또한, 일부 구체예에서 본 발명은 면역 복합체와 B 세포 간의 결합을 변화시키는데 유용하다. 보다 구체적으로, 본 발명의 방법은 세포 상에 항원이 침착되거나 증여되는 것을 예방하거나, 또는 세포 상에 이미 존재하는 항원을 실질적으로 용해하거나 제거할 수 있다.

다른 양태로서, LT-β-R 차단제는 가용성 림포톡신-β-R, LT-β-R에 대해 유도되는 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도되는 항체로 구성된 군 중에서 선택된다.

또 다른 양태로서, 림포톡신-β-수용체는 LT-β-R 차단제로서 작용하는 그 수용체의 세포외 도메인의 가용성 형태로 제공되기도 한다. 이 양태의 바람직한 조성물과 방법에는 LT-β-R 세포외 리간드 결합 도메인이 면역글로불린 불변부 중쇄 도메인에 융합되어 있는 재조합 림포톡신-β-수용체 융합 단백질을 포함한다. LT-β-R 리간드 결합 도메인은 인간의 IgG Fc 도메인에 융합된 것이 보다 바람직하다.

본 발명의 또 다른 양태로, LT-β-R 차단제로서 작용하는 항체가 제공된다. 이 양태에 바람직한 조성물과 방법은 림포톡신-β-수용체에 대해 유도되는 1종 이상의 항체를 포함한다. 이 항체는 단일클론 항체인 것이 보다 바람직하다. 이 양태에 바람직한 또 다른 조성물과 방법은 표면 림포톡신에 대해 유도되는 1종 이상의 항체를 포함한다. 이 항체는 림포톡신-β에 대해 유도되는 단일클론 항체인 것이 보다 바람직하다. 바람직한 항체로는 항인간 BT-β-R mAb BDA8 및 항인간 LT-βmAb B9를 포함한다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 LT-β-R 차단제를 치료적 유효량으로 포함하는 약학 조성물을 투여하여 동물의 체액성 면역 반응을 변화시키는 방법을 제공한다. 일부 다른 양태로서, 상기 약학 조성물은 약 1일 내지 약 14일 동안 LT-β-R 양성 세포를 도포하기에 충분한 양으로 투여한다. 이 약학 조성물은 일부 다른 양태에서 약학적 허용성 담체 또는 보조제를 포함하기도 한다.

다른 양태로서, 본 발명의 방법은 TNF-R 시그널링을 억제함이 없이, 전술한 LT-β-R 차단제를 사용하여 LT-β-R 시그널링을 억제하는 것이다. 또한, 본 발명에 따른 포유 동물 중에 존재하는 인간 면역결핍 바이러스의 치료, 예방 또는 제거 방법은 LT-β-R 차단제 단독물 또는 LT-β-R 차단제와 약학적 담체, 보조제 또는 당해 기술 분야에 HIV 또는 AIDS 증상을 치료 또는 경감시키는데 유용한 것으로 알려진 기타 약물과의 혼합물을 투여하는 것을 포함한다.

또한, 본 발명은 이식 분야, 즉 이식 거부 반응을 치료하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 일부 양태는 CD40 경로의 차단제와 LT 경로의 차단제를 동시투여하는 방법에 관한 것이다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 리간드 결합 도메인을 암호하는 인간 LTβ수용체 중 세포의 부분의 서열을 도시한 것이다.

도 2는 마우스에게 LTβ-R-Ig 또는 LFA-3-Ig 융합 단백질과 항원을 수회 주사한 후 나타나는 비장의 면역조직화학적 분석 결과를 도시한 것이다.

도 3은 LTβ-R-Ig 처리된 마우스와 MR-1(항CD40 리간드 항체) 처리된 마우스의 비장에 종중심이 존재하지 않으며, LTβ-R-Ig이 아닌 MR-1로 처리된 마우스의 비장에 소낭 수상돌기 세포가 존재함을 나타내는 면역조직화학적 분석 결과를 도시한 것이다. 융합 단백질과 SRBC 항원은 도 2에 기재된 바와 같이 투여하였다.

도 4는 LTβ-R-Ig을 자궁에 처치하고 출산후에도 계속 처치한 마우스의 LN에서 아드레신 발현이 변형되었음을 나타내는 면역조직화학적 분석 결과를 도시한 것이다.

도 5는 LTβ-R-Ig를 자궁에 처치하고 출생후에도 계속 처치한 마우스의 장간막 LN에서 나타나는 림프구 위치화 대식세포 마커의 발현에 대해 면역 조직학적 분석한 결과를 도시한 것이다.

도 6은 마우스의 LTβ-R-Ig 처치가 SRBC에 대한 항체 반응을 억제함을 보여주는 면역조직화학적 분석 결과를 도시한 것이다.

도 7은 FDC에 포획된 면역복합체를 도시한 것이다.

## 상세한 설명

본 명세서에 기재된 본 발명을 충분히 이해할 수 있도록 이하 상세한 설명을 통해 구체적으로 기재하겠다.

본 명세서에 사용된 "면역글로블린 반응" 또는 "체액성 반응"은 이종 항원에 대한 동물의 면역 반응을 의미하는 것으로, 그 결과 동물은 이종 항원에 대한 항체를 생성한다. T 헬퍼 세포의 Th2류는 친화성이 높은 항체의 효과적인 생성에 중요한 것이다.

본 명세서에 사용된 "종중심"이란 용어는 항원으로 면역화한 후 형성되는 2차 B 세포 소낭을 의미하는 것이다. 이 조직 부위의 출현은 최적의 기억 발생, 아이소타입 변화, 체세포 과돌연변이 및 항체 반응의 친화성 성숙과 관련이 있다.

"변연대" 또는 "변연대형 영역"은, 주로 변연대 대식세포(MZM), 금속친화성 대식세포(MM), 변연대 B 세포 및 망상 세포를 포함하고 T 세포와 수상돌기 세포를 포함하기도 하는 2차 림프구양 조직의 조직학적 영역을 의미하는 것이다. 동맥 혈류는 변연동으로 흘러, 항원이 이 세포들에 직접 접촉하게 되며 이 부위에서 항원에 대한 세포 반응이 자극된다.

본 명세서에 사용된 "아드레신"이란 용어는 2차 림프구양 기관으로 림프구의 유입과 관련된 분자에 관한 것이다. 이 분자는 내피 세포, 특히 림프절 중의 고내피 소정맥에서 발현된다. 비장의 아드레신에 대해서는 밝혀진 바 없다. MAdCAM-1은 점막 아드레신이고, PNA<sub>d</sub>는 말초 아드레신이다.

"T 헬퍼 (Th) 세포"는 세포 독성 T 세포를 형성하도록 보조하고, 항체 생성을 자극하도록 B 세포와 함께 작용하는 T 세포의 기능적 서브클래스를 의미한다. 헬퍼 T 세포는 클래스 II MHC 분자에 회합된 항원을 인식하고 작동인자 세포에 접촉 의존적 시그널과 접촉 독립적(시토킨) 시그널을 제공한다.

본 명세서에 사용된 "시토킨"이란 용어는 세포간 시그널링을 매개하는 분자를 의미한다. "림포킨"은 림프구에 의해 방출되는 시토킨이다.

"Th1"은 LT-α, 인터페론-γ 및 IL-2(및 기타 시토킨)을 생성하고, 항원 투여에 반응하는 세포(즉, 비면역글로블린) 반응과 관련된 염증 반응을 유도하는 T 헬퍼 세포의 서브클래스를 의미한다.

"Th2"는 면역 항원 투여에 대한 면역글로블린(체액성) 반응과 관련된 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10과 같은 시토킨을 생성하는 T 헬퍼 세포의 서브클래스를 의미한다.

항체의 "Fc 도메인"은 힌지(hinge), CH2 및 CH3 도메인을 포함하나 항원 결합 부위가 결실된 분자의 일부분을 의미한다. 이 용어는 또한 IgM 또는 기타 항체 아아이소타입의 등가 영역을 포함하는 것을 의미한다.

"항LT-β 수용체 항체"는 LT-β 수용체의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 임의의 항체를 의미한다.

"항LT 항체"는 LT-α, LT-β 또는 LT-α/β 복합체의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 임의의 항체를 의미한다.

"LTβ-R 시그널링"은 LTβ-R 경로와 관련된 분자 반응 및 이로부터 생성되는 후속적인 분자 반응을 의미한다.

"LT-β-R 차단제"는 LTβ-R에 대한 리간드 결합, 세포 표면 LTβ-R 균형성 또는 LTβ-R 시그널링을 감소시킬 수 있거나, 또는 LTβ-R 시그널이 세포내에서 관독되는 방식에 영향을 줄 수 있는 제제를 의미한다.

리간드 수용체 결합의 단계에서 작용하는 LTβ-R 차단제는 LTβ-R에 대한 LT 리간드 결합을 20% 이상 억제할 수 있다. LTβ-R 차단제의 예로는 가용성 LTβ-R-Fc 분자, 및 항LTα, 항LTβ, 항LTα/β 및 항LT-β-R Ab를 포함한다. 항체는 LTα의 분비된 형태와 교차 반응하지 않는 것이 바람직하다.

"LTβ-R 생물학적 활성"은 1) 가용성 또는 표면 LT 리간드 결합을 위해 가용성 또는 표면 LTβ-R 분자와 경쟁하는 LT-β-R 분자 또는 유도체의 능력; 또는 2) 면역 조절 반응 또는 세포 독성 활성을 자극하는 천연의 LTβ활성을 의미한다.

"LT 리간드"는 LTβ 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 LT α/β 이종체 복합체 또는 이의 유도체를 의미한다.

"LTβ-R 리간드 결합 도메인"은 LT 리간드의 특이적 인식 및 LT 리간드와의 상호 작용에 관여하는 LTβ-R의 부분(들)을 의미한다.

"표면 LT" 및 "표면 LT 복합체"는 하나 이상의 서브유닛의 변이, 변형 및 키메라 형태를 비롯하여, 세포 표면에 나타나는 LT-α 및 막결합성 LTβ 서브유닛을 포함하는 복합체를 의미한다. "표면 LT 리간드"는 LT-β 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 표면 LT 복합체 또는 이의 유도체를 의미한다.

"검체"는 동물, 또는 동물에서 유래된 하나 이상의 세포를 의미한다. 동물은 포유동물인 것이 바람직하다. 세포는 조직에 보유된 세포; 세포 클러스터; 무한 증식된, 형질감염된 또는 형질전환된 세포; 및 물리적으로 변형되거나 표현형이 변형된 동물에서 유래된 세포를 비롯한 임의의 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

### 림포톡신β: TNF계의 구성원

중양 괴사 인자(TNF) 관련된 시토킨은 숙주 방어 및 면역 조절의 다면발현 조절 인자의 거대 계로서 나타난다. 상기 계의 구성원은 세포-세포 접촉을 통하여 국부적으로 작용하는 막-결합 형태로, 또는 거리가 있는 표적에 작용할 수 있는 분비된 단백질로서 존재한다. TNF 관련된 수용체의 상사한 계는 이들 시토킨과 반응하며, 세포 사멸, 세포 증식, 조직 분화 및 염증전 반응을 비롯한 각종 경로를 촉발시킨다.

TNF, 림포톡신-α(LT-α, 또는 TNF-β라고 칭함) 및 림포톡신-β(LT-β)는 리간드의 TNF계의 구성원이며, Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 및 4-1BB 수용체에 대한 리간드를 포함한다(Smith et al., Cell, 76, p959-62 (1994)). TNF, LT-α, LT-β 및 Fas를 비롯한 TNF계의 몇가지 구성원에 의한 시그널링은 괴사 또는 고사에 의해 중양 세포 사멸을 유발할 수 있다(계획된 세포 사멸). 비중양원 세포에서, TNF 및 다수의 TNF계 리간드-수용체 상호 작용은 면역 시스템 진전에 영향을 주며 각종 면역 항원 투여에 반응한다.

대부분의 막-연관 LT-α/β 복합체("표면 LT")는 LT-α1/β2 화학량론을 갖는다(Browning et al., Cell, 72, p847-56 (1993); Browning et al., J. Immunol., 154, p.33-46 (1995)). 표면 LT 리간드는 고 친화도로서 TNF-R과 결합하지 않으며, TNF-R 시그널링을 활성화시키지 않는다. LT-β 수용체(LT-β-R)는 고 친화도로서 이들 표면 림포톡신 복합체에 결합한다(Crowe et al., Science, 264, p707-10(1994)).

TNF-R 시그널링과 같은 LT-β-R 시그널링은 항 증식 효과를 갖으며, 종양 세포에 대해 세포독성이 될 수 있다. 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 08/378,968에서는 LT-β-R 활성화제를 사용하여 LT-β-R을 선택적으로 자극하는 조성물 및 방법을 개시하고 있다. LT-β-R 활성화제는 TNF-R-유도된 염증전 또는 면역 조절 경로를 동시 활성화시키지 않고 종양 세포 증식을 억제하는데 유용하다.

최근의 유전자 표적화 연구는 2차 림프구양 기관의 발생에 영향을 미치는 LTα/β의 작용을 시사한다[Banks et al., J.Immunol., 155, pp.1685-1693(1995); De Togni et al., Science, 264, pp. 703-706(1994)]. 실제로, LTα-결손 마우스는 림프절(LN)과 파이어판(PP)을 갖고 있지 않다. 더욱이, 이 마우스의 비장은 구조가 붕괴되어 있고, 비장의 변연대 세포에서 나타나는 기능적 마커의 발현은 변형되어 나타났다[Banks et al., 1995; De Togni et al., Science, 264, pp.703-706(1994), Matsumoto et al., Science, 271, pp.1289-1291(1996)]. 이와 같은 특징들은 TNF 수용체 무력화 마우스에서 나타나는 것으로 개시된 바가 전혀 없다[Erickson et al., Nature, 372, pp.560-563(1994); Pfeiffer et al., Cell, 73, pp. 457-467(1993); Rothe et al., Nature, 364, pp. 798-802(1993)]. 본 출원인들은 최근 인간의 IgG1 Fc 부분(LTβ-R-Ig)과 융합시킨 마우스의 LTβ-R의 가용성 형태를 임신 중에 주사한 마우스의 후대가 대부분의 림프절을 갖고 있지 않고 비장 구조가 파손되어 있음을 밝혀 2차 림프구양 기관 발생에 막 LTα/β 복합체가 나타내는 역할을 규명하였다 [Rennert et al., 1996, "Surface Lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs" J.Exp.Med., 184:1999-2006]. 다른 연구에서는, 출생 후 3일째부터 발현되기 시작하는 유사한 LTβ-R-Ig 작제물이 돌연변이성인 마우스는 LN을 보유한다는 것을 밝힌 바 있다. 하지만, 이들의 비장 구조는 파손되어 있었고 비장의 변연대 세포를 나타내는 여러 마커들도 발현하지 않았다[Ettinger et al., "Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble LTβ-R/IgG1 fusion protein", Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 93:13102-7]. 이와 함께 상기 자료는 비장 구조에 미치는 효과가 아니라 2차 림프구양 기관의 발생에 미치는 효과를 매개하는데 막의 LT 기능이 일시적으로 필요하다는 것을 시사한다.

또한, TNF 계는 비장의 발생에 작용할 수 있다. TNF 결손형 마우스의 비장 변연대 세포는 대식세포 마커 또는 MAdCAM-1을 발현하지 않는다[Alexopoulou et al., 60th Int.TNF Congress, Eur.Cytokine Network, pp. 228(1996); Paspaparakis et al., 60th Int.TNF Congress, Eur.Cytokine Network, pp.239(1996)]. 또한, TNF-R55-결손형 마우스는 비장의 변연대에서 염색되는 MAdCAM-1(MOMA-1 제외)이 결실된 것으로 나타난다[Neumann et al., J.Exp.Med., 184, pp.259-264(1996), Matsumoto et al., Science, 271, pp. 1289-1291(1996)]. TNF-R75-결손형 마우스의 비장에서 관찰되는 상기 마커의 발현은 정상적인 것으로 나타난다[Matsumoto et al., Science, 271, pp.1289-1291(1996)].

림프구양 유사 조직은 발생 과정의 일부분으로 생성될 뿐만 아니라 최근 신림프기관발생으로 불리는 과정인 만성 염증과 같은 일부 병리적 환경에서 나타나기도 한다[Picker and Butcher, Annu.Rev.Immunol., 10, pp. 561-591(1992), Kratz, et al., J.Exp.Med., 183, pp.1461-1471(1996)]. 이 과정은 TNF계의 성분들에 분명하게 영향을 미친다. 래트 인슐린 프로모터(RIP-LT)에 의해 유도되는 LTα유전자가 돌연변이성인 마우스는 조직화된 림프구양 조직의 특징을 나타내는 LT 유도성 만성 염증 병소를 발생시켰다[Kratz et al., J.Exp.Med., 183, pp. 1461-1471(1996); Picarella et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 89, pp.10036-10040(1992)].

LTα 결손형 마우스를 이용하여 T 세포 의존적 면역 반응 중의 LT 기능을 평가한 결과, GC 형성, 아마도 조직화된 소낭 수 상돌기 세포(FDC) 구조의 유지 및 체액성 반응에 LT가 필요한 것으로 나타났다[Banks et al., J.Immunol., 155, pp.1685-1693(1995); Matsumoto et al., Science, 271, pp.1289-1291(1996); Matsumoto et al., Nature, 382, pp. 462-466(1996)]. 또한, TNF-R55 결손형 마우스는 FDC가 결실되어 있고, GC를 형성시키지 못하며, 양의 적혈구 세포(SRBC)에 대해 최적의 항체 반응을 발생시키지 못한다. 이것은 이들 반응 대부분에서 TNF-R55가 가용성 LT 또는 TNF 시그널에 의해 자극된다는 것을 시사한다[Le Hir et al., J.Exp.Med., 183, pp.2367-2372(1996), Alexopoulou et al., 60th Int.TNF Congress, Eur.Cytokine Network, pp.228(1996); Paspaparakis et al., 60th Int.TNF Congress, Eur.Cytokine Network, pp. 239(1996)]. 지금까지 체액성 면역 반응에서 표면 LT/LTβ-R 경로의 기능적 역할에 대해 규명된 바는 없다.

TNF계 수용체의 일원인 LTβ수용체는 표면 LT 리간드에 특이적으로 결합한다. LTβ-R은 LT 헤테로머성 복합체(주로 LTα1/β2 및 LTα2/β1)에 결합하나 TNF 또는 LTα에는 결합하지 않는다[Crowe et al., Science, 264, pp.707-710(1994)]. LTβ-R mRNA는 인간의 비장, 흉선 및 일반적으로 면역계와 관련있는 기관에서 발견된다. LTβ-R 발현에 대한 연구는 아직 초기 단계에 있지만 LTβ-R 발현 패턴은 LTβ-R이 말초 혈액 T 세포와 B 세포 및 T 세포주와 B 세포주에는 결여되어 있다는 점을 제외하고는 TNF-R55의 발현 패턴으로 보고된 것과 유사한 것으로 나타난다.

세포 표면 림포톡신(LT) 복합체에 대해서는 LT를 고농도로 발현하는 CD4<sup>+</sup> T 세포 하이브리도마 세포(II-23.D7)에서 특성규명되었다[Browning et al., *J.Immunol.* 147, pp.1230-37(1991); Androlewicz et al., *J.Biol.Chem.*, 267, pp. 2542-47(1992), 이 두 문헌은 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된 것이다]. LTβ-R, LT 서브유닛 및 표면 LT 복합체의 발현과 생물학적 역할에 대해서는 문헌[C.F.Ware et al., "The ligands and receptors of the lymphotoxin system", in *Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol.Immunol.*, Springer-Verlag, pp. 175-218(1995), 본 명세서에 참고 문헌으로 인용됨]에서 검토된 바 있다.

LTα발현은 유도성이며 LTα는 주로 활성화된 T 림프구와 B 림프구 및 천연 킬러(NK) 세포에 의해 분비된다. T 헬퍼 세포 중에서 LTα는 Th2 세포가 아닌 Th1에 의해 생성되는 것으로 나타난다. 또한, LTα는 멜라닌세포에서 검출되었다. 다발성 동맥경화증 환자의 병소에 존재하는 T 세포와 소신경교세포 역시 항LTα항혈청에 의해 염색될 수 있다[Selmaj et al., *J.Clin.Invest.*, 87, pp.949-954(1991)].

림포톡신 β(또한 p33이라고도 불림)는 인간의 T 림프구와 마우스의 T 림프구, T 세포주, B 세포주 및 림포킨 활성화된 킬러(LAK) 세포의 표면에서 발현된다. LTβ는 본 출원인이 함께 출원 중인 국제 출원 PCT/US91/04588(WO 92/00329로 1992. 1. 9. 공개) 및 PCT/US93/11669(WO94/13808로 1994.6.23 공개)[모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용됨]의 요지이다.

표면 LT 복합체는 주로 활성화된 T 림프구(헬퍼, Th1 및 킬러 세포)와 B 림프구 및 천연 킬러(NK) 세포에 의해 발현되며, 이는 항LTα 항체 또는 가용성 LTβ-R-Ig 융합 단백질을 사용하는 FACS 분석이나 면역조직학을 통해 확인할 수 있다. 본 출원인은 동시 계류 중인 미국 출원 일련 번호 08/505,606(1995. 7. 21. 출원)에서 가용성 LTβ수용체 및 항LTβ수용체를 사용하는 조성물과 방법 및 Th1 세포에 의해 매개되는 면역 질환을 치료하기 위한 치료제로서 리간드 특이적인 항체에 대하여 개시하고 있다. 또한, 표면 LT는 인간의 세포독성 T 림프구(CTL) 클론, 활성화된 말초 단핵 림프구(PML), IL-2-활성화된 말초 혈액 림프구(LAK 세포), 아메리카자리공 마이토젠 활성화 말초 B 림프구(PBL) 또는 항CD40 활성화된 말초 B 림프구(PBL) 및 T 세포 계통과 B 세포 계통의 다양한 림프구양 종양과 관련하여 기재된 바 있다. 동종항원 보유 표적 세포를 도입하면 CD8<sup>+</sup> CTL 클론 및 CD4<sup>+</sup> CTL 클론에 의한 표면 LT의 발현이 특이적으로 유도된다.

본 출원인은 본 명세서를 통해 표면 LT의 여러가지 면역학적 기능에 대하여 설명하면서 면역글로불린 반응의 생성 및 특성, 종중심 형성과 소낭 수상돌기 세포의 분화 상태에 미치는 효과를 비롯한 2차 림프구양 조직의 세포 기구의 유지 및 세포 트래피킹에 영향을 미치는 아드레신 발현율에 대한 LTα/β결합 시약의 효과를 규명하였다. 즉, 본 출원인은 표면 LTα/β 및 LTβ수용체 결합제의 치료적 용도에 관하여 제안하였다.

또한, 지금까지는 체액성 반응이나 면역원성 반응에 미치는 LTβ-R 시그널링의 영향에 대하여 충분히 규명된 바 없다. 즉, 본 발명자들은 최초로 LT 경로, 즉 LTβ 또는 LTβ-R을 차단하면 동물의 체액성 면역 반응이 변화될 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 포괄적 양태로서 LT 경로의 차단제, 특히 바람직하게는 LTβ-R 차단제의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 동물의 체액성 면역 반응을 변화시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에는 어떠한 차단제도 사용할 수 있으며, 당업자라면 LTβ-R을 차단하는 제제를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 예컨대, 이 차단제로는 수용체의 소분자 억제제, 가용성 림포톡신-β-수용체, LTβ-R에 대해 유도되는 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도되는 항체를 포함할 수 있다. 바람직한 양태로서, 차단제로는 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 가진 가용성 LTβ-R을 포함하며, 특히 가용성 LTβ-R은 인간의 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것이 바람직하다.

다른 양태로서, 바람직한 차단제로는 LTβ-R에 대해 유도되는 단일클론 항체, 예컨대 항인간 LTβ-R mAb BDA8 및 항인간 LTβmAb B9가 바람직하다. 보다 바람직한 항체로는 A1.D5.18, A0.D12.10 및 BB-F6을 포함한다. 특정 경우, 쥐의 표면 LT 리간드에 대해 유도되는 단일클론 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

FDC에 의한 장기간 나타나는 항원은, 내인성 항원이나 자가항원에 의한 면역계의 지속적인 활성화가 질병을 영속시키는 자가면역 질환에 중요할 것으로 생각된다. FDC에 포획된 면역 복합체는 도 7에 도시하였다. 따라서, 이와 같은 면역복합체를 FDC로부터 제거하는 작용을 통해 면역 활성화 양을 감소시키고 질병을 약하게 하거나 심지어 질병의 진행을 정지시킬 수도 있다. 다른 보다 "고전적" T 세포 매개의 자가면역 질환에는 알려지지 않은 체액 성분이 있을지라도 비정상적인 항체 반응을 포함하는 자가면역 질환에 있어 LT 경로의 억제제가 표적임은 명백한 것이며, 따라서 유리한 영향을 미칠 수 있다.

이와 마찬가지로, 이식 분야에서, 이식 거부, 즉 숙주대 이식편 질환 및 이식편대 숙주 질환은 항원의 영속적인 존재를 필요로 한다. 본 명세서에서 FDC의 조작에 대해 설명된 기작은 비자기, 즉 이식의 인식과 관련된 문제에 적용할 수 있다.

또한, 항원의 지속적 존재나 항원 기억의 유지는 분자 모조물에 의해 유발되는 자가면역 질환에 큰 역할을 할 수 있다. 예컨대, 라임병 감염 인자인 보렐리아 벅돌페리(*Borrelia burgdorferi*)에 대한 면역 반응은 관절염 유사 질환을 유도하는데, 그 이유는 이 박테리아 상의 동일 항원성 에피토프가 정상 관절 성분과 유사하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서, FDC를 보유한 라임 박테리아 항원을 제거하면 라임병에서 유도된 관절염을 경감시킬 수 있다. 이와 같은 치료법은 감염성 인자와 회합되어 있는 다른 모조물과도 관련이 있을 수도 있다.

본 출원인은 LT- $\beta$ -R의 차단제를 투여하면 소낭 수상돌기 세포에 항원이 침착 및/또는 제공되는 것을 차단할 수 있다는 놀라운 사실을 발견하였다. 일반적으로, B 세포는 항원을 소낭 수상돌기 세포의 표면에 결합된 면역 복합체로 인식한다. 소낭 수상돌기 세포는 불특정 시간 동안 항원을 보유할 수 있다. 따라서, FDC상에 보유되는 항원과 주기적 접촉될 때 B 세포는 기억 보유가 가능해진다. 즉, 본 발명의 방법은 수상돌기 세포 상에 항원의 존재에 의존적인 다양한 질병 상태에 대한 것이다. 본 발명에 따른 차단제는 동물에 항원이 도입되기 전에 투여될 수 있는데, 이 경우 차단제는 소낭 수상돌기 세포에 항원이 전혀 또는 일부 침착되지 못하도록 하여, 예상되는 면역원성 반응을 방지하거나 감소시킨다. 대안적으로, 본 발명의 차단제는 소낭 수상돌기 세포에 항원이 결합된 후에 동물에 투여될 수도 있다. 본 발명의 방법은 이와 같은 결합을 파괴시킬 수 있어, 예상되는 면역원 반응이 감소되거나 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명의 치료 방법은 B 세포 소낭에 이미 포획된 면역 복합체를 완전 또는 일부 제거하거나 또는 B 세포 소낭 상의 면역 복합체의 포획을 완전 또는 일부 예방하는 것이다.

이와 같은 항원 제공성 소낭 수상돌기 세포와 면역 복합체간 결합을 파괴하는 작용은 LT- $\beta$ 경로에서만 나타나는 고유의 작용인 것으로 보인다. 예컨대, 항CD40L(MR-1)은 TNF계의 다른 성분으로, 소낭 수상돌기 세포에서 발현된다. LT- $\beta$ -R/Ig과 마찬가지로, MR-1은 중형성을 저해하는 것으로 밝혀진 바 있으나, FDC 마커의 발현에는 영향을 미치지 않는다. LT- $\beta$ -R과 달리 항CD40L은 소낭 수상돌기 세포 상에 면역복합체가 포획되지 못하게 저해하거나, 소낭 수상돌기 세포상에 이미 포획된 면역 복합체를 제거할 수는 없다. 또한, 본 출원인은 항CD40L이 이미 생성된 기억 B 세포의 생존/유지에 영향을 미치지 않는다는 것을 발견하였다.

항CD40L과 LT- $\beta$ -R 차단제의 효과 간 차이에 대한 정확한 원인은 알 수 없지만, CD40은 B 세포에 생존 시그널을 제공하는 것으로 추정된다. 하지만, LT계는 중중심 반응과 기억 B 세포 생성 및 유지에 필수적인 것으로 보이는 상태인 완전 분화된 기능적 상태로 소낭 수상돌기 세포를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 따라서, CD40/CD40L 경로를 차단하면 기억 B 세포의 생성을 저해할 수는 있으나 이미 형성된 기억 B 세포 풀에는 영향을 미치지 않을 것이다. 한편, LT 경로를 차단하면 기억 B 세포의 생성 및 유지를 저해할 뿐만 아니라 이미 생성된 기억 B 세포의 유지에도 영향을 미친다.

LT 경로 억제를 이용하는 또 다른 용도로는 소낭 수상돌기 세포(FDC) 구획에 저장소를 형성하는 바이러스의 치료 용도가 있다. 이와 같은 용도의 좋은 예로 HIV 바이러스가 있다. 바이러스 감염 후 2차 림프구양 기관의 B 세포 소낭 중의 FDC에는 다량의 감염성 바이러스가 존재한다[Heathe et al., 1995, "Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity.", *Nature* 377: 740-4]. 바이러스는 보체나 면역글로불린과 복합체를 형성하여 Fc 수용체나 보체 수용체 또는 이 둘다에 결합하는 것으로 추정된다. 따라서, 바이러스는 면역계의 정상 기작을 이용하여 장기간 동안 항원 기억을 보유하게 된다. 이 질환이 진행되는 과정에서 림프구의 능동 감염은 주로 이 부위에서 일어난다. 감염시 무증상 단계 동안 이 구획 중에 존재하는 바이러스 풀은 T 세포와 단핵구에 포함된 양보다 10배 이상 더 많은 것으로 계산되었다[Cavert et al., 1997, "Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection", *Science* 276:960-4]. 통상의 HIV 치료 방식에서는 바이러스 가중량을 감소시키고 내성 변이주도 처리될 수 있도록 복수의 항바이러스제를 혼합하여 사용한다. 이 치료법의 가능한 단점으로는 상기 치료법과의 부조화가 있고, 치료의 휴지 기간 동안 잔류 바이러스가 돌연변이되어 내성 변이될 수 있고, 결과적으로 치료 과정을 피할 수 있다는 점이다. FDC 구획 중의 바이러스 가중량은 복수 약물 치료법으로 상당한 영향을 받지만, 약물 자체는 FDC 표면 상의 비복제성 바이러스가 아닌 바이러스 복제 기작에 주로 영향을 미친다. 따라서, FDC 상의 바이러스 수용체는 약물 치료가 중지된 이후 재접종물로서 작용할 수 있다. 더욱이, FDC는 중성화된 바이러스를 감염성 형태로 변환시킬 수 있어, HIV 병인론에 대한 상기 세포의 중요성이 더욱 강조된다.

LT 경로의 억제 작용은 FDC의 세포 표면으로부터 면역 복합체를 해리시킬 수 있기 때문에 면역 복합체 형태의 HIV 역시 해리될 수 있다. 이 구획에 존재하는 HIV 가중물 전부는 복수 치료 타입의 섭생을 개시하기 직전에 해리되는 것이 바람직한데, 그 이유는 해리된 바이러스가 프로세싱되어 체외로 제거되거나 감염시 제거되어야 약물 치료법에 민감할 수 있기 때문이다. 이와 같은 조합 처리는 잔류 바이러스 가중물을 매우 낮은 농도로 감소시켜 치료에 큰 효과를 미칠 수 있을 것이

다. 이와 같은 경우, 리간드 또는 수용체에 대한 차단 항체나  $LT\beta$ -R/Ig이 유용할 것이다. 가능한 치료 프로토콜에는 약물 치료를 개시하는 단계 및 수일 내에 LT 경로 억제제에 의한 1회 또는 수회 치료로 결합된 바이러스를 모두 방출시키는 단계를 포함한다. 일단 바이러스 가중량이 감소되면 LT 유도성 제제를 이용한 처리는 더이상 필요하지 않다.

HIV는 특히 상당한 연구가 이루어진 예이지만, 다른 다량의 항원 가중물을 유도하고, 그 결과 FDC로부터 결합된 바이러스의 방출 및 바이러스 재출현을 나타내는 면역 장애와 같은 일부 상태를 기다리는 휴지기 상태의 기타 다른 바이러스가 FDC 상에 존재하거나 숨어있을 수도 있다. 따라서, 본 발명은 FDC 결합 바이러스의 합병증을 예방하기 위한 LT 경로 억제제의 임의의 수단에 관한 것이다. 이와 같은 발견은 수상돌기 세포 상에 항원의 증여 및 기억 B 세포에 의해 발생하는 반응에 의존적인 많은 질환과 유의적인 관계를 암시한다.  $LT\alpha 1/\beta 2$ 는 효과적인 시그널링 작용을 하고 치료적으로 유용한 항  $LT\beta$  차단성 단일클론의 일례이다. 또한, AOD12로 불리는 항인간  $LT\alpha$ 지향성 단일클론 항체는 대부분의 항인간 LT 알파 단일클론 항체와는 달리  $LT\alpha 1/\beta 2$  시그널링을 우수하게 차단할 수 있었고,  $LT\alpha$ 단독물에 대해서는 효과적이지 못하였다. 이와 같은 단일클론 항체는 독특한 특이성을 가진 단일클론 항체를 찾아낼 수 있는 가용성  $LT\alpha 1/\beta 2$  리간드로 마우스를 면역화하여 얻을 수 있다. 또한,  $LT\alpha 1/\beta 2$  복합체에 대하여 우선적으로 유도되는 특이성을 보유한 항 $LT\alpha$ 단일클론 항체는 이와 같은 면역화 형태로 처리한 후에만 발견되고 LT 알파 단독물을 이용한 면역화를 통해서만 발견되지 않았는데, 즉 독특한 항 $LT\alpha$  항체류를 포함한다는 것을 알 수 있었다.

## 실시에

### 실시에

#### 재료 및 방법

##### 마우스

적기의 임신한 Balb/c 마우스를 잭슨 래보러터리(메인주 바 하버)로부터 구입하고, 통상적인 칸막이로 보호된 우리안에서 사육시키고, 협회 지침에 따라 취급하였다. 수용체-Ig 단백질 또는 mAb를 임신한 마우스의 꼬리 정맥내로 주사하였다(i.v.). 이들 마우스의 자손과 5주령 암컷 Balb/c 마우스(메인주 바 하버에 소재하는 잭슨 래보러터리즈로부터 구입)에게 복강내(ip) 경로를 통해 융합 단백질을 주사하였다.

##### 융합 단백질 및 항체

융합 단백질은 힌지(hinge)에 융합된 쥐  $LT\beta$ -R, 인간의 TNF-R55 또는 인간의 LFA-3(쥐 CD2에 결합되지 않음)의 세포 외 도메인으로 구성되어 있고, 인간의 IgG1의  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$  도메인은 문헌[Force et al., J. Immunol., 155, p5280-5288 (1995); Miller et al., J. Exp. Med., 178, p211-222(1993)]에 개시된 바와 같이 제조하였다. 대조군으로서 사용된 정제된 인간의 IgG1는 프로토스 이뮤노리서치(미국 캘리포니아주 샌프란시스코에 소재)로부터 구입하였다. 항마우스 CD40 리간드 항체인 MR1은 파미젠(미국 캘리포니아주 샌프란시스코)에서 입수하였다.

마우스 금속친화성 대식세포(MM)에 의해 발현된 마커에 특이적이거나, 마우스 세망 섬유아세포(ER-TR-7)에 특이적인 항체(MOMA-1, ED3)(ED3은 시알로아드헤진을 인식)을 세로테크(영국 옥손에 소재)에서 구입하였다. 마우스 B220, CD4 및 MadCAM-1에 특이적인 항체(MECA 367)를 파미젠(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재)으로부터 구입하였다. 마우스 변연대 대식세포에 의해 발현되는 마커에 특이적인 항체(ER-TR-9)는 레이나 레비우스 박사(암스테르담 Vrije 대학 교수)로부터 입수하였다. 마우스 소낭 수상돌기 세포(FDC)에 특이적인 항체(FDC-M1 및 FDC-M2)는 문헌[Maeda et al., J. Immunol., 148, p2340-2347(1992)]에 이미 설명되어 있다. 항마우스 CR1 항체(FDC도 착색시킴)는 란돌프 제이. 노엘레 박사(다트마우스 메디칼 스쿨)로부터 입수하였다. 항체 MECA79(미국 매릴랜드주 록빌에 소재하는 미국 모식균 배양 수집소로부터 구입한 세포에서 유도된 세포 배양 상청액)을 이용하여 주변 림프절 아드레신(PNAd)을 검출하였다.

##### 항원 및 면역화

100  $\mu$ l의 10SRBC 현탁액(콜로라도 세륨 컴파니로부터 입수)을 복강내 투여하여 마우스를 면역화시켰다. 이는 면역화처리 1회당  $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  SRBC에 해당한다.

##### 면역조직화학

OCT 매립 배지(미국 인디애나주 엘크하트에 소재하는 마일즈)에서 비장 및 림프절을 냉동시키고, 저온유지 절편화 장치에 두었다. 7~10 mm 두께의 절편을 건조하고 아세톤으로 고정시켰다. 절편은 트리스 완충 염수 완충액 A(TBS-A, 0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.05 트윈-20(v/v), 0.25소혈청 알부민(BSA) 중에 희석시킨 후에 접합 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 항온처리하고, TBS-S(0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.05트윈-20)에서 세정한 후, 효소 반응을 개시하기 전에 메탄올 중에서 1분동안 고정시켰다. 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP) 및 알카린 포스파타제(AP) 활성은 DAB 타블렛 서브스트레이트 키트(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마)와 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트/니트로 블루 테트라졸리움(BCIP/NBT, 시그마)을 각각 이용하여 형성시켰다. 조직 절편을 메탄올 중에 5분 동안 고정시키고 김사(스위스 부흐스에 소재하는 플루카에서 입수)로 대응부를 염색하였다.

### 형광 영상 분석

면역형광 염색을 위해, 냉동된 절편을 아세톤 고정하고, 공기 건조한 후 0.25BSA, 0.05트윈-20 및 10열에 의해 응집된 토끼 혈청이 있는 트리스 완충 염수중에 5 $\mu$ g/ml 항CD16/CD32 Fc 블록(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 파미젠)으로 예비차단하였다. 다음과 같은 mAb와 검출 시약을 사용하여 동일한 완충액에서 절편을 염색하였다: 10  $\mu$ g/ml의 비오틴화된 항B220 mAb(파미젠), 20 $\mu$ g/ml 스트렙타비딘-FITC(미국 알라바마주 버밍햄에 소재하는 서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠)를 차례로 처리; 10  $\mu$ g/ml의 MECA 367, 10  $\mu$ g/ml의 PE-염소 F(ab')<sub>2</sub> 항래트 IgG(서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠)를 차례로 처리; MECA79의 배양 상청액, 20  $\mu$ g/ml의 FITC-마우스 항래트 IgM(파미젠)를 차례로 처리; 20  $\mu$ g/ml 항시알로아헤신 mAb, 10  $\mu$ g/ml의 PE-염소 F(ab')<sub>2</sub> 항래트 IgG(서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠)를 차례로 처리; 50  $\mu$ g/ml의 비오틴화된 PNA(미국 캘리포니아주 버링게임에 소재하는 벡터 래보러터리츠), 10  $\mu$ g/ml 스트렙타비딘-PE(서던 바이오테크놀로지 어소시에이츠)를 차례로 처리; mAb MOMA-1 세포 배양 상청액의 1:5 희석액, 20  $\mu$ g/ml의 FITC-마우스 항래트 IgM(파미젠)를 차례로 처리. 일부 절편은 여러개의 mAb로 동시에 염색하여 영상 중복 분석을 수행하였다. 모든 절편은 50X 광학하에서 검사하고 액타크롬 P1600(미국 뉴욕주 로체스터에 소재하는 코닥)을 사용하여 사진촬영하거나 또는 문헌[Rennert et al., J. Exp. Med.(1996년 11월, 프레스)]에 개시된 바와 같이 별도의 적색 및 녹색 영상으로서 포착하였다.

### 혈구 응집 반응 분석

96웰 미량역가 평판(미국 매사추세츠주 캠프리지에 소재하는 코스타)에서 PBS/1글루코스 중 혈청 계열 희석을 수행하였다. SRBC-특이적 IgM 역가는 각 웰에서 10SRBC 현탁액 25  $\mu$ l를 첨가하고 습기가 있는 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 동안 평판배양하여 측정하였다. SRBC-특이적 IgG의 경우, 혈청은 12-머캅토에탄올(v/v)(미국 캘리포니아주 리치몬드 소재하는 바이오-라드)의 20  $\mu$ l/웰과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 항온처리하여 IgM 5량체를 제거하였다. 이어서, 혈구 응집 반응의 가교제로서 10SRBC 현탁액을 웰당 25  $\mu$ l 첨가한 후 염소 항마우스 IgG(미국 알라바마주 버밍햄에 소재하는 서던 바이오테크놀로지)의 10 mg/ml 용액을 웰당 25  $\mu$ g 첨가하였다. 혈구 응집 반응이 선명하게 나타나는 최종 혈청 희석액의 역수로서 역가를 결정하였다.

### ELISA

혈장 중 수용체-Ig에 대한 분석은 포집을 위해 96웰 미량역가 평판에 직접 고정된(10  $\mu$ g/ml) 쥐 LT $\beta$ -R(Browning et al., 제조 원고), LFA-3(Miller et al., J. Exp. Med., 178, p211-222(1993)) 또는 인간 IgG<sub>1</sub>의 CH3 도메인(CDG5, 바이오젠에서 제조됨)에 특이적인 mAb와, 검출을 위해 당나귀 항인간 IgG<sub>1</sub> 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 사용하였다(미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브에 소재하는 잭슨 이뮤노리서치).

### 가용성 LT $\beta$ -R 분자의 생성

본 발명의 일양태에서 LT $\beta$ -R 차단제는 가용성 LT $\beta$  수용체 분자를 포함한다. 도 1은 인간 LT $\beta$ -R의 세포외 부분의 서열을 나타내며, 이 서열은 리간드 결합 도메인을 암호화한다. 도 1에 제시된 서열 정보와 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여, LT $\beta$ -R 리간드 결합 도메인을 암호하는 기능있는 단편을 벡터내로 클로닝하여 적절한 숙주 세포에서 발현하게 하므로써 가용성 LT $\beta$ -R 분자를 생성할 수 있다. 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련번호 제08/505,606호(1995년 7월 21에 출원)에 개시된 분석법에 따라 LT 리간드 결합에 대한 천연 LT $\beta$  수용체와 경쟁할 수 있는 가용성 LT $\beta$ -R 분자가 LT $\beta$ -R 차단제로서 선택된다.

도 1에 도시된 서열에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 가용성 LTβ수용체는 1종 이상의 이중 단백질 도메인("융합 도메인")에 결합되어 수용체 융합 단백질의 생체내 안정성을 증가시키거나 이 단백질의 활성 또는 위치를 변형시킬 수 있다.

통상 순환시 20시간 이상의 반감기를 가지는 안정한 혈장 단백질을 사용하여 수용체 융합 단백질을 작제하는 것이 바람직하다. 이러한 혈장 단백질로는 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 특정 세포나 조직 유형에 가용성 LTβ-R 분자를 표적화할 수 있는 서열을 LTβ-R 리간드 결합 도메인에 연결하여 특이적으로 정위된 가용성 LTβ-R 융합 단백질을 형성할 수도 있다.

LTβ-R 리간드 결합 도메인을 포함하는 LTβ-R 세포의 영역(도 1)의 모든 또는 기능이 있는 부분은 인간의 IgG1 중쇄의 Fc 도메인과 같은 면역글로불린 불변부에 융합될 수 있다(Browning et al., *J. Immunol.*, 154, p33-46 (1995)). 가용성 수용체-Ig 융합 단백질이 좋으며, 일반적인 면역학적 시약이고, 이 단백질의 작제법은 당해 분야에 공지되어 있다(예컨대, 본원에서 참고로 인용한 미국 특허 제5,225,538호 참고).

기능있는 LTβ-R 리간드 결합 도메인은 IgG1 외의 면역글로불린 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 면역글로불린(Ig) Fc 도메인에 융합될 수 있다. 상이한 Ig 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 Fc 도메인은 다양한 2차 작동인자 기능을 활성화시킬 수 있다. Fc 도메인이 동일 기원의 Fc 수용체에 의해 결합되는 경우 활성화된다. 2차 작동인자 기능은 보체계를 활성화시키는 능력, 태반을 통과하는 능력, 및 각종 미생물 단백질을 결합시키는 능력을 포함한다. 면역글로불린의 상이한 클래스 및 서브클래스의 특성은 Roitt 등의 문헌[Roitt et al., *Immunology*, p4.8(모스비-이어 북 유럽 리미티드, 3판, 1993)에 개시되어 있다.

보체계가 활성화되면 염증을 매개하는 다단계 효소 반응이 개시된다. 보체계 생성물은 박테리아 결합, 세포내이입, 식작용, 세포독성, 자유라디칼 생성 및 면역 복합체의 가용화를 비롯한 각종 기능을 가진다.

보체 효소 다단계는 항원 결합 IgG1, IgG3 및 IgM 항체의 Fc 도메인에 의해 활성화될 수 있다. IgG2의 Fc 도메인은 덜 효과적인 것으로 보이며, IgG4, IgA, IgD 및 IgE의 Fc 도메인은 보체의 활성화에 효과가 없다. 따라서, Fc 도메인은 연합된 2차 작동인자 기능이 LTβ-R-Ig 융합 단백질로 치료되는 특정 면역 반응 또는 질병에 바람직한지 여부에 따라 Fc 도메인을 선택할 수 있다.

LT 리간드 보유 표적 세포에 해를 주거나 이 세포를 죽이는 것이 유리한 경우, 특히 활성 Fc 도메인(IgG1)을 선별하여 LTβ-R-Ig 융합 단백질을 제조할 수 있다. 또한, 보체계를 촉발하지 않고 세포에 LTβ-R-Fc 융합을 표적화시키는 것이 바람직한 경우, 불활성 IgG4 Fc 영역을 선택할 수 있다.

Fc 수용체에 결합 및 보체 활성을 감소 또는 제거시키는 Fc 영역에서의 변이가 개시되어 있다[S. Morrison, *Annu. Rev. Immunol.*, 10, p239-65 (1992)]. LTβ-R-Ig 융합 단백질을 작제하는데 사용되는 Fc 영역의 활성을 최적화시키기 위해서 단독 또는 조합하여 이들 변이 또는 기타 변이를 이용할 수 있다.

인간 면역 글로불린 Fc 영역(hLTβ-R-Ig)에 융합된 리간드 결합 서열을 포함하는 가용성 인간 LTβ-R 융합 단백질의 제조는 실시예 1에 개시되어 있다. hLTβ-R Fc를 분비하는 실시예 1에 따라 제조된 하나의 CHO주를 "hLTβ-R:hG1 CHO#14"라고 명명한다. 이 샘플의 주는 부다페스트 조약에 따라서 미국 모식균 배양소(ATCC)(매릴랜드, 록빌)에 1995년 7월 21에 기탁된 것이며, ATCC 수탁 번호 CRL11965로 지정되었다.

가용성 쥐 LTβ-R 융합 분자(LTβ-R-Ig)의 제조는 실시예 2에 개시되어 있다. LTβ-R-Ig를 분비하는 실시예 2에 따라 제조된 CHO주는 "mLTβ-R:hG1 CHO#1.3. BB"로 명명한다. 이 샘플 주는 부다페스트 조약에 따라 미국 모식균 배양소(ATCC)(매릴랜드, 록빌)에 1995년 7월 21에 기탁되었으며, 수탁 번호 CRL11964로 지정되었다.

상기 ATCC 기탁물의 대중의 이용에 대한 제한은 본 출원에 대한 특허가 승인되면 확실히 소멸된다.

수용체-Ig 융합 단백질의 접합점을 형성하는 상이한 아미노산 잔기는 가용성 LTβ 수용체 융합 단백질의 구조, 안정성 및 궁극적인 생물학적 활성을 변화시킬 수 있다. 하나 이상의 아미노산을 선택된 LTβ-R 단편의 C-말단에 첨가하면 선택된 융합 도메인의 접합점을 변형시킬 수 있다.

LTβ-R 융합 단백질의 N-말단은 재조합 발현 벡터내로 삽입하기 위해 선택된 LTβ-R DNA 단편이 5' 말단에서 분열되는 위치를 변경하므로써 다양하게 할 수 있다. 본원에 개시된 LTβ-R 차단제를 선택하기 위한 분석 및 일반적인 실험을 사용하여 각 LTβ-R 융합 단백질의 안정성 및 활성을 시험 및 최적화하였다.

도 1에 나타난 세포의 영역내에 있는 LTβ-R 리간드 결합 도메인 서열을 사용하여, LT 리간드에 대한 LTβ 수용체 또는 융합 단백질의 친화도를 변형시키기 위해서 아미노산 서열 변형체를 작제할 수 있다. 본 발명의 가용성 LTβ-R 분자는 표면 LT 리간드 결합에 대해 내인성 세포 표면 LTβ 수용체와 경쟁할 수 있다. LT 리간드 결합을 위해 세포 표면 LTβ 수용체와 경쟁할 수 있는 LTβ-R 리간드 결합 도메인을 포함하는 임의의 가용성 분자는 본 발명의 범주에 속하는 LTβ-R 차단제라는 것에 주목하였다.

### 항인간 LTβ-R 항체의 공급원

본 발명의 또 다른 일양태에서, 인간 LTβ 수용체에 대해 유도된 항체(항LTβ-R Abs)는 LTβ-R 차단제로서 작용한다. 본 발명의 항LTβ-R Abs는 폴리클론 또는 단일클론(mAbs)일 수 있으며, LTβ-R 시그널링을 차단하는 능력, 생체내 생이용도, 안정성, 또는 원하는 특징을 최적화시키기 위해서 변형할 수 있다.

인간 LTβ 수용체에 대해 유도되는 폴리클론 항체 혈청은 염소, 토끼, 래트, 햄스터 또는 마우스와 같은 동물에게 완전 프로인트 보조액내의 인간 LTβ 수용체-Ig 융합 단백질(실시예 1)을 피하주사한 후, 불완전 프로인트 보조액내의 이 단백질을 복강내 또는 피하 주사로 추가자극시키는 종래 기술을 사용하여 제조할 수 있다. LTβ 수용체에 대해 유도된 원하는 항체를 포함하는 폴리클론 항혈청은 통상적인 면역 과정에 의해 검색된다.

인간 LTβ 수용체-Ig 융합 단백질에 대해 유도되는 마우스 단일클론 항체(mAbs)는 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 제08/505,606호(1995년 7월 21일 출원)에 개시된 바와 같이 제조한다. 마우스 항인간 LTβ-R mAb BDA8을 생성하는 하이브리도마 세포주(BD.A8.AB9)는 부다페스트 조약에 따라서 미국 모식균 배양소(ATCC)(매릴랜드, 록빌)에 1995년 1월 12일에 기탁된 것이며, ATCC 수탁 번호 HB11798로 지정되었다. 상기 ATCC 기탁물의 대중의 이용에 대한 제한은 본 출원에 대한 특허가 승인되면 확실히 제거된다.

각종 형태의 항LTβ-R 항체도 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다[Winter and Milstein, Nature, 349, p 293-99 (1991)]. 예를 들어, "키메라" 항체는 동물 항체로부터의 항원 결합 도메인이 인간 불변 영역에 결합되도록 작제할 수 있다(예, Cabilly et al., 미국 4,816,567 호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, p 6851-55 (1984)). 키메라 항체는 인간 임상적 치료에 사용되는 경우, 동물 항체에 의해 유도되는 관찰된 면역원성 반응을 감소시킨다.

또한, LTβ-R를 인식하는 재조합 "인간화된 항체"를 합성할 수 있다. 인간화된 항체는 특이 항원-결합에 관여하는 영역이 삽입된 인간 IgG 서열을 주로 포함하는 키메라이다(예, WO 94/04679). 원하는 항원으로 동물을 면역화하고, 해당 항원을 분리한 후 특이 항원 결합에 관여하는 가변부 서열의 일부분을 제거한다. 이어서, 동물-유도된 항원 결합부를 항원 결합부가 결실된 인간 항체 유전자의 적당한 위치로 클론시킨다. 인간화된 항체는 인간 항체에서 이종(중간) 서열의 사용을 최소화하고, 처리한 검체에서 면역 반응의 유도가 감소된다.

상이한 클래스의 면역글로불린으로부터 분리한 항LTβ-R 가변 도메인 및 인간 불변 도메인(CH1, CH2, CH3)를 포함하는 키메라 또는 인간화된 항체를 제조하므로써 재조합 항LTβ-R 항체의 상이한 클래스를 작제할 수 있다. 예를 들어, 증가된 항원 결합 부위 결합가를 갖는 항LTβ-R IgM 항체는 인간의 μ쇄 불변부를 운반하는 벡터내로 항원 결합 부위를 클로닝하므로써 재조합적으로 생성된다[Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177, p 1439-50 (1993); Lane et al., Ear. J. Immunol., 22, p 2573-78 (1993); Trauneker et al., Nature, 339, p 68-70 (1989)].

또한, 표준 재조합 DNA 기술은 항원 결합 부위의 부근에서 아미노산 잔기를 변경하므로써 항원에 대한 재조합 항체의 결합 친화력을 변경하는데 사용할 수 있다. 인간화된 항체의 항원 결합 친화도는 분자 모델링을 근거로 한 변이유발에 의해서 증가된다(Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, p 10029-33 (1989); WO 94/04679).

표적화된 조직 형태 또는 특정 치료 계획에 따라 LTβ-R에 대한 항LTβ-R Abs의 친화도를 증가 또는 감소시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, 예방적인 치료를 위한 LTβ 경로를 통해 신호하는 능력을 감소시킨 항LTβ-R Abs의 일정 농도로 환자를 치료하는 것이 유리하다. 유사하게, LTβ-R에 대해 증가된 친화도를 갖는 억제적 항LTβ-R Abs는 단기간의 치료에 유리할 수 있다.

**항표면 LT 리간드 항체의 공급원**

본 발명의 또 다른 바람직한 일양태는  $LT\beta$ -R 차단제로 작용하는 LT 리간드에 대해 유도된 항체를 포함하는 조성물 및 방법이다. 항 $LT\beta$ -R Abs에 대해 전술한 바와 같이,  $LT\beta$ -R 차단제로 작용하는 항LT 리간드 항체는 폴리클론 또는 단일클론일 수 있으며, 항원 결합 특성 및 이의 면역원성을 조정하는 일반적인 과정에 따라 변형시킬 수 있다.

본 발명의 항LT 항체는 LT 서브유닛의 가용성, 변이, 변형 및 키메라 형태를 비롯한 각각 2개의 LT 서브유닛 중 하나에 대해 증가될 수 있다. LT 서브유닛이 항원으로 사용되는 경우, 이는  $LT\beta$  서브유닛인 것이 바람직하다.  $LT\alpha$  서브유닛이 사용되는 경우, 생성 항 $LT\alpha$  항체는 표면 LT 리간드에 결합하고, 분비된  $LT\alpha$ 와 교차 반응할 수 없거나, 또는 TNF-R 활성을 조절할 수 있다(본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 제08/505,606호(1995년 7월 21일 출원)에 개시된 분석법에 따름).

또한, 하나 이상의 LT 서브유닛을 포함하는 동종( $LT\beta$ ) 또는 이종( $LT\alpha/\beta$ ) 복합체에 대해 유도되는 항체가 증가되고  $LT\beta$ -R 차단제로서의 활성에 대해 검색한다.  $LT\alpha1/\beta2$  복합체는 항원으로 사용되는 것이 바람직하다. 전술한 바와 같이, 생성 항 $LT\alpha1/\beta2$  항체는 분비된  $LT\alpha$ 에 결합되지 않고 TNF-R 활성에 영향을 주지 않으면서 표면 LT 리간드에 결합하는 것이 바람직하다.

폴리클론 항인간  $LT\alpha$  항체의 제조는 출원인이 동시계류중인 출원(WO 94/13808)에 개시되어 있다. 단일클론 항 $LT\alpha$  및 항 $LT\beta$  항체가 또한 개시되어 있다[Browning et al., *J. Immunol.*, 154, p 33-46 (1995)].

마우스 항인간  $LT\beta$  mAbs는 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 제08/505,606호(1995년 7월 21일 출원)에 개시된 방법으로 제조하였다. 마우스 항인간  $LT\beta$ -R mAb B9를 생성하는 하이브리도마 세포주(B9. C9. 1)는 부다페스트 조약에 따라 미국 모식균 배양소(ATCC)(매릴랜드, 록빌)에 1995년 7월 21에 기탁되었으며, 수탁 번호 HB11962로 지정되었다.

단일클론 햄스터 항마우스  $LT-\alpha/\beta$  항체는 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 제08/505,606호(1995년 7월 21일 출원)에 개시된 방법으로 제조하였다. 햄스터 항마우스  $LT-\alpha/\beta$  mAb BB.F6을 생성하는 하이브리도마 세포주(BB. F6.1)는 부다페스트 조약에 따라 미국 모식균 배양소(ATCC)(매릴랜드, 록빌)에 1995년 7월 21에 기탁되었으며, 수탁 번호 HB11963으로 지정되었다.

상기 ATCC 기탁물의 대중의 이용에 대한 제한은 본 출원에 대한 특허가 승인되면 확실히 제거된다.

**표면 LT 복합체의 면역학적 작용을 억제하는 가용성  $LT\beta$ -R-Ig의 용도**

표면 LT 결합 시약, 쥐  $LT\beta$ -R의 세포의 도메인과 인간의 IgG1( $LT\beta$ -R-Ig)의 힌지, CH2 및 CH3 도메인으로 구성된 융합 단백질의 면역글로불린 반응의 생성 및 특성에 대한 효과, 소낭 수상돌기 세포 및 중중심 형성의 분화 상태에 대한 영향을 비롯한 2차 림프구 조직의 세포 조직화의 유지에 대한 효과, 및 세포 트래픽킹(trafficking)에 영향을 주는 아드레신 발현량에 대한 효과를 조사하였다.

**$LT\beta$ -R-Ig를 마우스에게 수회 투여하여 비장 변연대 세포에 의해 기능있는 마커의 발현과 비장 림프구의 조직화를 변경한다.**

비장 구조상에서 표면 LT 폐쇄시의 효과는  $LT\beta$ -R-Ig를 연속하여 6주 동안 마우스에게 주사하여 검사하였다. 이어서, SRBC로 마우스를 면역시키고 4일 후에  $LT\beta$ -R-Ig를 추가 주사하였다. SRBC를 주사한 지 10일 후에 마우스를 죽였다. 냉동된 비장 절편의 면역조직화학 염색으로 몇가지 조직 변화를 밝혀내었다. 정상 마우스에서 비장 B 세포 구획을 포함하는 소낭은  $LT\beta$ -R-Ig 처리 후에 더 이상 분리되어 있지 않다. 대신 B 세포는 T 세포 영역(도 2B) 주변의 확산 밴드에 조직화되어 있고, T 세포 영역 및 B 세포 영역의 경계가 없어진다(도 2B). 대조적으로, 대조 LFA-3-Ig 처리된 마우스에서, 비장 B 세포 소낭은 분리되어 있고 T 세포 영역과 B 세포 영역 사이의 선명한 경계가 있다(도 2A).

단일클론 항체 ER-TR-9 및 MOMA-1에 의해 인식되는 세포 표면 마커의 발현은  $LT\beta$ -R-Ig 처리된 마우스의 비장 변연 세포에 내재된 2개의 특징적인 대식세포군이 없다. ER-TR-9는 MZM의 마커를 염색하고[Dijkstra et al., *Immunol.*, 55, 23-30 (1985)] MOMA-1는 금속친화성 대식세포상의 마커를 염색하는 것으로 알려져 있다[Kraal and Janse, *Immunol.*,

58, 665-669, (1986)](각각 도 2D 및 도 2F). 이들 마커는 대조(LFA-3-Ig) 처리 마우스(도 2C, 2E)의 세포상에서 발현된다. 쥐 비장 변연 구간에서 MOMA-1+ 대식세포의 또 다른 마커인 시알로아드헤진의 발현도 LTβ-R-Ig 처리 마우스에는 존재하지 않는다(자료는 도시되지 않음).

항체 MECA-367은 유착 분자 및 접착 아드레신 MAdCAM-1을 결합시키는 데, 이는 본래 파이어판, 장간막 림프절, 장점막 및 고유판의 내피 세포에서 나타난다[Briskin et al., *Nature*, 363, p461-464(1993); Nakache et al., *Nature*, 337, p179-181 (1989)]. MAdCAM-1 발현은 비장 변연대와(변연동상으로 개방되어 있는 작은 말단 소동맥의 내피 세포상에서 발현하는 것으로 추정됨) 종종심내의 세망 그물상에 나타난다[Kraal et al., *Am. J. Pathol.*, 147, p763-771 (1995)](도 2G). LTβ-R-Ig 처리 마우스로부터 얻은 MECA367 염색은 비장에서는 MAdCAM-1이 발현되지 않는다는 것을 보여준다(도 2H).

유사하게, 변연대에서 세망 섬유아세포 군을 나타내는 ER-TR-7 항체에 의한 염색[Van Vliet et al., *Cytochem.*, 34, p 883-890 (1986)]은 비정상적으로 분포되며 LFA-3-Ig 처리 동물에서보다 LTβ-R-Ig의 백색 펄프 처리한 동물에서 더 심하다(도 2J). LTβ-R-Ig 처리 마우스에서 관찰된 변화는 항원 노출과 무관한 데, 그 이유는 염색 패턴이 LTβ-R-Ig 처리 비면역화된 마우스에서와 동일하기 때문이다(자료는 도시되지 않음).

### LTβ-R-Ig 처리된 마우스의 비장에서는 종종심 형성이 제거되고 소낭 수상돌기 세포가 검출되지 않는다.

LTβ-R-Ig를 마우스에 수회 주사하면 SRBC에 대한 면역 반응에 영향을 미치는지 여부를 조직학적 측면에서 결정하기 위해서, 초회 항원 자극에 반응하는 종종심(GC) 형성 및 소낭 수상돌기 세포(FDC) 분포 분석을 수행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이 LTβ-R-Ig 또는 LFA-3-Ig로 수회 예비처리한 마우스에서 얻은 냉동된 비장 절편을 피넛 응집소(PNA)로 염색하여 GC를 나타내었고, FDC-MI 항체로 염색하여 GC 형성에 필요한 세포 성분인 FDC를 검출하였다[Schriever and Nadler, *Adv. Immunol.*, 51, p243-284 (1992); Tew et al., *Immunol.Rev.*, 117, p185-211(1990)]. CD40-CD40 리간드 상호작용은 GC 형성에 중요한 것으로 관찰되었다[Foy et al., *J. Exp. Med.*, 180, p157-163 (1994)]. 따라서 비교를 위해, GC 형성을 억제하는 것으로 이미 관찰되었던 주사 프로토콜에 따라 마우스의 한 그룹을 항마우스 CD40 리간드 항체인 MR1으로 처리하였다[Han et al., *J. Immunol.*, 155, p556-567 (1995)]. SRBC 항원투여한 지 10일 후에, 대조군 LFA-3-Ig 단백질로 처리한 마우스는 비장에서 다수의 PNA 선명한 GC가 형성되었다(도 3A). GC는 LTβ-R-Ig 또는 MR1 처리된 마우스의 비장에서는 검출되지 않았다(각각 도 3B, 3C). 그러나, MR1 및 LTβ-R-Ig의 효과는 2가지 추가 관찰에 의해 구별할 수 있다. GC내의 FDC(FDC-M1)에 대한 염색(도 3D)은 LTβ-R-Ig 처리 마우스의 비장에서는 존재하지 않으나(도 3E) MR1 처리한 마우스의 비장에서는 여전히 존재한다(도 3F). FDC-M2 항체를 사용하여 FDC를 염색하면 유사한 결과가 관찰된다(자료는 도시되지 않음). 따라서, LTβ-R-Ig로 처리하면 비장에서 FDC의 표현형이 변경되고 GC를 형성하지 못한다.

GC 염색 외에, PNA는 정상 마우스의 비장에서 변연대도 염색한다. 이 염색법은 LFA-3-Ig 처리된 마우스(도 3A) 및 MR1 처리된 마우스(도 3C)에서도 나타나지만, LTβ-R-Ig 처리된 마우스의 비장에서는 나타나지 않는다(도 3B).

MR1 처리한 마우스의 비장에서의 시알로아드헤진, MOMA-1, ER-TR-9, ER-TR-7 및 MAdCAM-1의 발현도 정상적인 것으로 나타났으며(자료는 도시되지 않음), 또한 CD40 및 LTβ-R 시그널을 저해하는 분자의 효과가 뚜렷하다.

### 비장 림프구 조직화 및 변연대 세포 마커 발현의 LTβ-R-Ig에 의해 유도된 변경의 역할

비장에서 변연대 세포 마커의 발현과 림프구 조직화에 영향을 주는데 필요한 LTβ-R-Ig를 수회 주사하여 분석하였다. 표 1에 제시된 바와 같이 1회 또는 수회 LTβ-R-Ig를 마우스의 복강내 주사하였다. 이어서, 일부 마우스를 최종 LTβ-R-Ig 주사한 날 SRBC로 면역시켰다. 각각 B 및 T 세포상에서의 B220 및 CD4 발현과 PNA(GC에 대해) 및 MECA367 (MAdCAM-1에 대해)를 이용한 MOMA-1, ER-TR-9 및 FDC-M1의 염색은 처리 마우스의 냉동 비장 절편에서 분석하였다. 금속 친화성 대식 세포, 변연대 대식 세포, MAdCAM-1, GC 및 FDC의 염색에 대한 소실 역학은 구별되는 것으로 보인다.

LTβ-R-Ig를 1회 주사하면 1주 후에 MAdCAM-1 염색을 제거하는 데 충분하다. 3주 동안 매주 LTβ-R-Ig 주사 후에, GC 및 FDC에 대한 염색은 검출되지 않고 T/B 림프구 구획은 파괴된다. 금속 친화성 대식세포에 대한 염색을 제거하는 데는 최소 4회 LTβ-R-Ig 주사가 필요하다. 6회 LTβ-R-Ig 주사로는 ER-TR-9 항체를 이용한 변연대 대식세포의 염색을 완전히 제거하지 못한다(도 2D에 예시되어 있음).

LTβ-R-Ig를 1회 주사한 후 MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1, FDC-M2 및 CR1 염색의 급속한 억제에 대한 더욱 정확한 분석은 항원의 부재하에 수행하였다(표 2).

**[표 1]**

**성인 마우스에서 SRBC에 반응하는 비장 조직화 및 종중심 형성에 대한 LTβ-R-Ig의 효과**

LTβ-R-Ig 주사 횟수	T/B 세포 조직화	금속친화성 대식세포*	변연대 대식세포*	MAdCAM-1 발현*	종중심 <sup>§</sup>	FDC*
0	정상	+++	+++	+++	+++	+++
1	정상	++	+++	-	+	+
2	약간 비정상	+	+++	-	+	+/-
3‡	파괴	+	++	-	ND	ND
4‡	파괴	+/-	++	-	ND	ND
5‡	파괴	-	+	-	ND	ND
6	파괴	-	+/-	-	-	-

1 내지 5주 동안 매주 LTβ-R-Ig 100 μg을 마우스에게 복강내 투여한 후 마우스를 죽였다. 특별한 언급이 없으면 SRBC를 복강내 주사(100 μl의 10현탁액)하기 전에 LTβ-R-Ig를 투여하였고, 최종 LTβ-R-Ig 주사는 항원과 같은 날 공급하였다. SRBC 주사한지 10일 후에 동물을 죽였다. 냉동된 비장 절편을 비오틴화된 래트 항마우스 B220 및 래트 항마우스 CD4와 스트렙타비딘-알카리 포스파타제 및 마우스 항래트 Ig 퍼옥시다제로 각각 차례로 이중 염색하였다. 비장은 다음과 같은 항마우스 항체로 염색하였다: 래트 항변연대 대식 세포(ER-TR-9), 래트 항금속친화성 대식세포(MOMA-1), 래트 항MAdCAM-1(MECA 367) 및 래트 항FDC(FDC-M1) 염색 후 마우스 항래트 Ig 퍼옥시다제 염색. 냉동 절편의 추가 세트를 비오틴화된 피넛 응집소(PNA-비오틴)로 염색한 후 스트렙타비딘 퍼옥시다제로 염색하여 종중심을 검출하였다. 그룹당 3 이상의 동물로부터 절편을 얻어 관찰하였다.

\* 염색 강도는 육안으로 검사하였다: 정상 염색: +++, 감소된 염색: ++, 약한 염색: +, 염색되지 않음: -. 처리되지 않은 동물과 LFA-3-Ig로 처리한 동물에서 얻은 절편의 염색 강도는 정상 염색을 기준으로 하였다.

§ 비장 절편당 종중심의 수는 다음과 같이 기록한다: >10: +++; 5~10: ++, 1~5: +, 없음: -.

‡ 이들 그룹에서 얻은 동물은 SRBC가 수용하지 않았다.

ND: 수행하지 않음.

**[표 2]**

**MOMA-1, MAdCAM-1, CR1, FDC-M1 및 FDC-M2 염색에 대한 LTβ-R-Ig 효과의 정확한 타이밍**

	LTβ-R-Ig의 단일 주사후 일수							
	0	1	3	5	7	10	14	
MOMA-1*	+++	+++	+++	+++		++	++	+
MAdCAM-1*	+++	+/-	-	-	-	-	-	-
CR1*	+++	+++	++	++	++	++	+	
FDC-M1*	+++	+/-	-	-	-	-	-	-
FDC-M2*	+++	+/-	-	-	-	-	-	-

LTβ-R-Ig 또는 인간의 Ig 100 μg을 5~6주령의 Balb/c 마우스에 1회 투여하였다. 각 그룹의 마우스를 0, 1, 3, 5, 7, 10 및 14일에 죽였다. 냉동된 비장 절편을 다음 항체로 염색하였다: 래트 항마우스 금속친화성 대식세포(MOMA-1), 래트 항마우스 MAdCAM-1(MECA 367), 래트 항마우스 FDC(FDC-M1), 래트 항마우스 FDC(FDC-M2) 및 비오틴 표지된 래트 항마우스 CR1 염색 후 마우스 항래트 Ig 퍼옥시다제(MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1 및 FDC-M2) 또는 퍼옥시다제 표지된 스트렙타비딘(CR1)으로 염색.

\* 염색 강도는 육안으로 평가하였다: 정상 염색: +++, 감소된 염색: ++, 약한 염색: +, 염색되지 않음: -. 처리되지 않은 동물과 인간의 Ig로 처리한 동물에서 얻은 절편의 염색 강도는 정상 염색을 기준으로 하였다. 그룹당 2 마리 이상의 동물로부터 절편을 얻어 분석하였다.

LTβ-R-Ig를 복강내 단일 주사한 Balb/c 마우스를 주사 후 14일 동안 매일 죽이고, 비장을 분리하여 냉동시켰다. 냉동된 비장 절편을 MOMA-1, 항MAdCAM-1(MECA-367) 및 FDC 특이 시약: FDC-M1, FDC-M2 및 항CR1 항체로 염색하였

다. LT $\beta$ -R-Ig 주사 1일 후에, 항MAdCAM-1, FDC-M1 및 FDC-M2 시약을 이용한 염색이 상당히 감소되었다(표 2). 표 1에 개시된 결과와 비교하여 이 실험에서 FDC-M1 염색의 신속한 억제에는 면역화된 동물에서 더 강하게 나타나는 FDC-M1 강도에 기인하는 것일 수 있다. CR1에 대한 염색은 14일에도 여전히 검출되는 데, 이는 FDC가 LT $\beta$ -R-Ig로 처리한 지 3일 후에는 여전히 존재하지만 FDC-M1 및 FDC-M2를 이용하여 검출되는 마커의 발현은 소멸된다는 것을 의미한다. 따라서, LT $\beta$ -R-Ig 처리는 FDC 표현형을 변화시켰다. 마지막으로 MOMA-1 염색은 감소되었지만 14일에도 여전히 검출되었다.

#### 수회 LT $\beta$ -R-Ig 처리로 LN에서 아드레신 발현을 억제한다.

본 발명자들은 수용체-Ig 단백질 200  $\mu$ g을 임신 14일 및 14주에 정맥 주사한 적기의 임신한 Balb/c 마우스 자손의 LN에서 아드레신의 발현을 검사하였다. 자손이 출생한 후 100  $\mu$ g의 LT $\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig, 또는 LFA-3-Ig를 매주 1회 복강내 주사하거나 또는 처리하지 않았다. 용합 단백질량은 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 일생을 통해 10  $\mu$ g/ml 또는 그 이상으로 존재하였다(자료는 제시하지 않음). MECA367 및 MECA79를 이용한 면역조직화학 염색 결과 MAdCAM-1 및 주변 LN 아드레신이 LT $\beta$ -R-Ig로 처리한 마우스의 일생동안 장간막 LN에서 전혀 존재하지 않았다는 것이 밝혀졌다(도 4A 및 4B). 이들 마우스의 천골 LN도 모든 아드레신의 발현이 결핍되어 있으며 경부 및 장골 LN은 주변 림프절(PNAd) 염색이 나타내지 않았다(자료는 제시되지 않음). 아드레신 발현의 하향조절은 가역적인데, 그 이유는 발현이 자궁내에서만 처리한 동물에서 정상량으로 회복되기 때문이다(도 4G 및 4H). 일주일에 LN중 TNF-R55-Ig 또는 LFA-3-Ig 100  $\mu$ g을 일생동안 처리한 마우스에서 아드레신 발현은 미처리 마우스에서와 비교할 만하다(도 4C, 4D, 4E, 4F).

#### B 림프구 위치 결정 및 대식세포 마커 발현은 LT $\beta$ -R-Ig 처리 마우스의 LN에서 변형된다.

LN 서브캡슐동(비장 변연대와 유사)내 대식세포군의 마커에 결합하는 항체를 사용하여 상기 도 4에 제시된 바와 같이 LT $\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig 또는 LFA-3-Ig로 임신 기간동안 그리고 계속하여 출생후에 처리한 마우스로부터 취한 LN을 면역조직화학 분석하였다. 시알로아드헤진 발현은 가용성 LT $\beta$ -R-Ig로 처리한 마우스의 LN에서는 감소하나(도 5B), TNF-R55-Ig 또는 LFA-3-Ig 마우스의 LN에서는 감소하지 않은 것으로 관찰되었다(도 5E, 5H). 서브캡슐동내 대식세포상의 MOMA-1 발현은 LT $\beta$ -R-Ig로 처리된 마우스의 LN에서 여전히 검출되었다(도 5C).

LN에서 림프구 조직화에 대한 연속적인 LT $\beta$ -R-Ig 처리의 영향을 평가하였다. LN 절편은 B 세포 마커 B220 및 T 세포 마커 CD4에 특이적인 mAbs로 염색하였다. 영상 분석은 T 세포 영역과 B 세포 영역이 중복되는 영역을 확인하는 데 사용하였다. LT $\beta$ -R-Ig 처리는 B 세포 소낭의 용해를 유발하여 B 세포가 T 세포 영역의 외부 변연상의 확산 밴드에 존재하도록 한다(도 5A). 소낭 구조의 용해에도 불구하고, B 세포는 LN의 T 세포 영역내에 존재하지 않으며, 대신 림프구가 정상적으로 차지하고 있지 않은 영역에 나타났다. T 세포 및 B 세포 염색의 매우 유사한 패턴이 1주일에 100  $\mu$ g의 TNF-R55-Ig로 일생동안 처리한 마우스에서는 관찰되었으나, LFA-3-Ig로 처리한 마우스에서는 관찰되지 않았다(도 5D). 다시 B 세포 소낭이 파괴되고 B 세포는 일부 림프구에서 일반적으로 발견되지 않은 LN 영역에 존재하였다. B 세포와 T 세포의 중복은 관찰되지 않았다.

#### 마우스의 LT $\beta$ -R-Ig 처리는 IgM 및 IgG 항체 반응을 억제한다.

LT $\beta$ -R-Ig로 수회 처리한 마우스의 SRBC 초회자극후에 비장 GC를 형성하는 데 실패하였다는 것은(도 3에 도시되어 있음) 이들 마우스에서 체액성 면역 반응의 변화를 제시하는 것이다. 이를 검사하기 위해서, 성체 마우스에게 LT $\beta$ -R-Ig 또는 LFA-3-Ig를 매주 1회씩 6회 주사를 놓은 후 SRBC로 초회자극하였다. 면역화후 7일 및 14일에 마우스를 방혈시키고 혈청중 SRBC 특이적 IgM 및 IgG의 존재를 혈구응집 반응 분석을 사용하여 분석하였다. SRBC 면역화 후 7일 동안 IgM 역가는 정상이었으나, IgG 반응은 인간의 Ig 또는 PBS로 처리한 마우스와 비교하여 LT $\beta$ -R-Ig 처리된 마우스에서 상당히 감소하였다(도 6A). 면역화후 14일에, SRBC 특이적 IgG는 LT $\beta$ -R-Ig 처리 마우스의 혈청에서는 여전히 검출되지 않았으며, 이들 마우스중 SRBC 특이적 IgM의 역가는 인간의 Ig 또는 PBS 처리 마우스와 비교하여 1/2 이상으로 감소되었다(도 6A).

SRBC 초회자극 10 후에, GC는 LT $\beta$ -R-Ig로 1회 또는 2회 처리한 마우스의 비장에서 검출되나, GC의 수는 대조군의 것과 비교하여 상당히 감소된다(표 1). LT $\beta$ -R-Ig를 마우스에게 2회 주사하는 경우, 제1 주사는 SRBC 초회자극 일주일 전에, 제2 주사는 SRBC 주사와 동일한 날에 수행하며, 7일과 14일 제에 SRBC에 대한 IgM 및 IgG 반응의 억제(도 6B)는 수회 LT $\beta$ -R-Ig 주사를 맞은 마우스에서 검출되는 것(도 6B)과 유사하다. 면역화 30일 후에, SRBC 특이적 IgG는 검출되지 않으며 IgM량은 대조군과 비교하여 80이상 감소된다(도 6B). 따라서, 이들 LT $\beta$ -R-Ig 처리 프로토콜은 IgG 반응을 완전히 억제하며, 대조군에 비하여 IgM 반응을 단축/감소시킨다.

SRBC 초회자극과 동일한 날에 LTβ-R-Ig를 1회 주사한 마우스의 경우, SRBC에 대한 IgG 및 IgM 반응 정도는 대조군의 것과 비견할 만하다(도 6C). 그러나, 면역화 24일 후에, IgM 및 IgG 역가는 모두 30% 감소된다. SRBC 초회자극 34일 후에, SRBC 특이적 IgM의 역가는 대조군의 것과 비교하여 50% 감소되며 SRBC 특이적 IgG는 검출되지 않는다(도 6C). 이들 자료는 LTβ-R-Ig 처리 프로토콜이 진행중인 IgM 반응 정도와 IgG 반응 정도가 모두 현저하게 단축/감소시킴을 보여 준다. 즉 LTβ-R-Ig 처리는 이미 개시된 체액성 반응을 억제할 수 있다.

### 항체에 의해 매개된 질병

다수의 기관-특이적이고 다중계 자가면역 질환은 병리학적 항체 반응에 연루되어 있다. 이러한 질환으로는 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 샤가스병, 그레이브스병, 특발성 혈소판감소증 자반(ITP), 전신성 홍반성 낭창(SLE), 베그너 육아종증, 결절성 다발성 관절염 및 급성 진행성 겸상 사구체신염이 있다[Benjamini et al., Immunology, A Short Course, (Wiley-Liss, New York 3판. (1996)].

SLE의 원인론이 밝혀지지는 않았지만, 관찰된 병의 상태와 관련이 있는 면역 메카니즘에 대해서는 꽤 많은 부분이 알려졌다. 원인은 알려지지 않았지만 SLE를 앓고 있는 환자는 신체의 핵 성분에 대한 항체(천연 2본쇄 DNA에 대해 현저하게 형성되는 항핵 항체(ANA))를 생성한다. 이들 항체의 존재는 임상적으로 SLE와 관련된 신장의 질병상태와 상호관련되어 있다. DNA와 이들 항체의 복합체는 정상적인 조직의 파괴로 유도되는 것이 명백하며, 임의의 면역 응집 질병에서와 같이 소동맥 벽 및 활막성 관절 공간에서 복합체는 사구체의 기저막에 대해 포획된 침착물을 형성한다. 이들 복합체는 보체 다단계를 활성화시키고 과립구를 유도한다. 연속되는 염증 반응은 사구체신염이 되며, 그 결과 신장이 손상되어 단백뇨 및 혈뇨가 생긴다.

루푸스 신염은 수십년간 쥐 모델에서 연구되어 왔다. 최근, 쥐 CD40 리간드에 특이적인 시약의 치료 효과가 이 모델에서 평가되었다[Mohan et al., J. Immunol., 154, p 1470-1480 (1995)]. 생체내에서 병원성 항체의 생성을 유도하는 세포의 전달에 의한 루푸스 가속화는 CD40/CD40 리간드 상호작용을 차단하는 단일클론 항체를 투여하여 억제되는 것으로 보인다. 더구나, 항CD40 리간드 항체로 루푸스 마우스를 간단히 처리하면 항체가 이들 계에서 제거된 후에도 오랫동안 자발적인 질병에 유리한 효과를 지속하게 된다. 실험 결과 병원성 B 세포가 치료 후에 9달 동안 항체를 생성하지 않은 것으로 나타났다. 이는 자가면역 기억 B 세포의 팽창이 지연되어 장기간 치료 효과를 제공한다는 것을 의미한다. 생체내에서 LTα/β/LTβ-R 상호작용을 차단하는 시약이 항체 반응의 생성을 억제하며 FDC의 표현형과 B 세포 기억의 최종 생성과 관련된 중중심 형성을 변화시키기 때문에, 본 발명의 LTα/β/LTβ-R 차단 시약은 SLE를 치료 또는 예방하는 데 유용하다.

일부 병원성 감염체에 반응하는 정상적인 면역이 과도해져서 의학적 문제를 과다한 자가항체 반응을 유발할 수도 있다. 그 하나의 예가 샤가스 질병인 데, 이 질병은 만성 트리파노소마 크루지 감염이 있는 인간 및 실험 동물에게서 발생하는 염증성 심근증이다. 인간의 샤가스 심근증의 병인론과 관련된 가능한 메카니즘중에서, 최근에는 심장 특이적 자가면역 반응의 유도 기작이 실질적으로 실험적 지지를 받고 있는 이론이다. 최근 연구결과[Tibbetts et al., J. Immunol., 152, p 1493-1499 (1994)] 심장 항원 특이적 항체가 티.크루즈(*T. Cruzi*)에 감염된 심장 질병이 있는 C57B1/6 마우스에서 생성되는 것으로 나타났다. 티.크루즈의 브라질 균주로 감염시 C57B1/6 마우스는 만성적으로 감염된 인간에서 관찰되는 것과 조직학적으로 유사한 심근증을 나타낸다. 이들 마우스에서 얻은 항혈청은 3가지 심장 항원과 반응하지만 심근증을 나타내지 않는 티.크루즈의 구아이야스 균주로 감염된 C57B1/6 마우스는 항체를 생성하지 않는다. 이 자료는 이들 항체가 심근증의 특이 마커임을 나타내는 것이다. 따라서, LTβ-R 차단제가 자가항체에 의해 매개되는 손상을 억제하는 능력을 설치류 모델에서 평가할 수 있다.

특정 감염성 질병이나 알려지지 않은 기타 원인의 결과로서 생성되는 자가항체에 의해 세포가 파괴되는 또 다른 예는 특발성 혈소판감소증 자반(ITP)이다. 이 질병에서 혈소판에 대해 유도된 항체는 출혈을 유도할 수 있는 혈소판 파괴(Fc 또는 C3b 수용체와 식세포 또는 보체에 의함)가 생긴다. 본 발명의 LTβ-R 차단제와 같이 생체내에서 항체 매개 자가면역 반응을 억제하는 치료제(항체 생성 억제)는 또한 이들 자가면역 질병을 치료 또는 예방하는 데 유용하다.

일부 병원성 감염체에 대한 정상적인 반응이 과도해져서 그 자체가 의학 문제가 될 수 있는 과민성 반응을 유발할 수도 있다. I형 과민성의 가장 흔한 예는 알러지 반응이다. 이 과민성 반응은 과민증을 매개하는 약리적 활성제의 방출을 촉발하도록 호염구 및 마스트 세포에서 수용체에 Fc 부분을 통해 결합하는 IgE 항체에 의해 매개된다. ITP 및 굿파스처 증후군은 IgM 또는 IgG 항체가 보체 다단계를 활성화시키고 세포 표면에서 항원에 결합하는 경우 발생하는 II형 반응으로 간주되기도 한다. 과립구는 활성 부위에 이끌리고 과립에서 용해 효소가 방출됨으로 인한 손상으로 세포가 파괴된다. 류마티스 관절염은 정상 IgG의 Fc 부분에 결합하는 항원의 면역 복합체(이 경우 류마티스 인자, IgM 자가 항체)에 의해 매개되는 III형

과민반응으로부터 생긴다. 이들 면역 복합체는 관절의 염증과 이들 질병의 특징적인 손상을 유발하는 데 관여한다. 병의 원인은 항체에 의해 일부 매개되기 때문에, 본 발명의 LTβ-R 차단제와 같은 항체 생성을 억제하는 치료제는 또한 이들 질병의 예방 및 치료에 유용하다.

### LTβ-R 차단제를 이용한 치료

본 발명의 조성물은 언급한 특정 임상 질환을 치료하기 위한 효과적인 양으로 투여된다. 소정의 적용을 위해 바람직한 약학 제제의 결정 및 치료학적으로 효과적인 투여 방법은 당업자에게는 공지된 사항으로 예를 들어, 환자의 상태와 체중, 바람직한 치료 정도 및 치료에 대한 환자의 용인 등을 고려한다.

치료 양을 최적화하기에 적합한 최초 투여량은 가용성 LTβ-R 약 1 mg/kg으로 생각된다.

또한, 치료학적 유효 투여량의 측정은 1 내지 14일 동안 표적 세포(차단제에 따라 LTβ-R 또는 LT 리간드-양성 세포)를 코팅하는데 필요한 LTβ-R 차단제의 농도를 측정하는 시험관내 실험에 의해 평가할 수 있다. 본 출원인의 동시계류중인 미국 출원 일련 번호 제08/505,606호(1995년 7월 21일 출원)에 기술한 수용체-리간드 결합 분석을 이용하여 세포 코팅 반응을 조사할 수 있다. LTβ-R 또는 LT 리간드-양성 세포는 FACS를 이용하는 활성화된 림프구 군집으로부터 분리할 수 있다. 이들 시험관내 결합 분석 결과에 기초하여, 일정 범위의 적합한 LTβ-R 차단제 농도를 선택하여 동물에서 테스트할 수 있다.

본 발명의 가용성 LTβ-R 분자, 항LT 리간드 및 항LTβ-R Abs의 단독 투여 또는 항체 또는 복합체의 분리 및 정제된 형태, 그들의 염 또는 이의 약학적으로 허용가능한 유도체는 면역억제 활성을 나타내는 제제의 통상적으로 허용되는 임의의 투여 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

또한, 이들 치료법에 사용된 약학 조성물은 여러 가지 형태일 수 있다. 예를 들어, 이들은 고체, 반고체 및 액체 투여 형태, 예를 들어 정제, 알약, 산제, 액체 용액 또는 현탁액, 좌약 및 주사와 주입가능한 용액을 들 수 있다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 경로 및 치료학적 적용에 따라 달라진다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 정맥내, 병소내 또는 국소 투여를 들 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 가용성 LTβ-R 분자, 항LT 리간드 및 항LTβ-R Abs는 흡수 또는 안정성을 촉진하는 보조인자와 함께 또는 단독으로 멸균 등장 제제 내에 위치시킬 수 있다. 상기 제제는 액체가 바람직하나, 동결건조된 분말일 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 가용성 LTβ-R 분자, 항LT 리간드 및 항LTβ-R Abs는 시트르산 일수화물 5.0 mg/ml, 시트르산 삼나트륨 2.7 mg/ml, 만니톨 41 mg/ml, 글리신 1 mg/ml 및 1 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하는 제제 완충액으로 희석할 수 있다. 상기 용액은 동결건조할 수 있으며, 냉장 저장할 수 있으며, 멸균 주사용수(USP)를 이용하여 투여전에 재구성할 수 있다.

또한, 상기 조성물은 당업계에 널리 알려진 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것이 바람직하다(맥 출판사에서 1980년에 출판한 레밍톤 약학 (16판)). 이러한 약학적으로 허용가능한 담체는 인간 혈청 알부민 또는 혈장 제제와 같은 기타 약제, 담체, 유전 담체, 보조제, 부형제 등을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 단위 투여 형태가 바람직하며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

또한, 본 발명의 약학 조성물은 미소구, 리포솜, 기타 미립자 전달 시스템 또는 서방형 제제로 투여할 수 있는데, 영향받은 조직 또는 혈류와 소통할 수 있는 위치 또는 그 위치의 근처에 투여한다. 서방형 담체의 적합한 예로는 좌약 또는 마이크로캡슐과 같은 성형된 제품 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 들 수 있다. 이식가능한 또는 마이크로캡슐 서방형 매트릭스로는 폴리락티드(미국 특허 3,773,319; 유럽 특허 58,481), L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트(Sidman et al., *Biopolymers*, 22, pp. 547-56 (1985)); 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, pp. 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12, pp. 98-105 (1982))를 들 수 있다.

본 발명의 가용성 LTβ-R 분자, 항LT 리간드 및 항LTβ-R Abs를 단독 또는 함께 함유하는 리포솜은 널리 공지된 방법으로 제조할 수 있다[참조: 예를 들어, DE 3,218,121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, pp. 3688-92 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, pp. 4030-34 (1980); 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545]. 보편적으로 리포솜은 작은(약 200~800 Å) 단층형이며, 이의 지방 함량은 약 30 몰% 이상의 콜레스테롤이다. 콜레스테롤의 분율을 적절히 선택하므로써 가용성 LTβ-R 분자, 항LT 리간드 및 항LTβ-R Abs 방출의 최적 속도를 조절한다.

또한, 본 발명의 가용성  $LT\beta$ -R 분자, 항LT 리간드 및 항 $LT\beta$ -R Abs는 기타  $LT\beta$ -R 차단제, 면역억제제 또는 시토킨을 함유하는 리포솜에 부착하여  $LT\beta$ -R 차단 활성을 조절할 수 있다. 리포솜에 대한 가용성  $LT\beta$ -R 분자, 항LT 리간드 및 항  $LT\beta$ -R Abs의 부착은 표적화된 전달을 위해 항체에 독소 또는 화학치료제를 커플링하기 위해 널리 사용되는 이중작용성 가교결합제와 같은 임의의 공지된 가교결합제를 이용하여 수행할 수 있다. 또한, 리포솜에 대한 접합은 탄수화물-유도된 가교 시약 4-(4-말레이미도페닐)부티르산 하이드라이드(MPBH)를 이용하여 수행할 수 있다(Duzgunes et al., *J. Cell. Biochem.* Abst. Suppl. 16E 77 (1992)).

### LT $\beta$ -R 차단제를 포함하는 치료 조성물의 잇점

본 발명의  $LT\beta$ -R 차단제는 면역 작동인자 메커니즘을 선택적으로 억제할 수 있다. 항체 매개된 면역성의 억제는 FDC 작용에 영향을 주므로써 GC 생성의 조절 단계를 포함하는 다중 메커니즘에 의해 억제된다. 항체 매개 면역과 세포 매개 면역은 모두 아드레신의 발현을 조절하고 따라서 림프구 트래피킹에 영향을 주어 부분적으로 억제된다. 따라서,  $LT\beta$ -R 차단제는 항체의 활성화에 의해 악화되는 증상 또는 아드레신의 이상 발현을 치료하는 데 유용하다. 면역 매개 반응을 선택적으로 억제할 수 있는 능력은 각종 자가면역 및 만성 염증성 증상을 비롯한 비정상성을 치료하는 데 유용하다. 전술한 바와 같이, 병인론 면역 매개 증상의 치료는 일반적으로 각종 세포 유형과 면역학적 반응에 다면발현성 효과를 가지는 면역 억제제 및 면역조절제를 사용한다. 이들 비특이성 면역 억제제는 일반적으로 유해한 부작용을 야기시키는 높은 투여량 및 종종 세포독성 투여량을 필요로 한다.

마우스 루푸스 신염의 최근 연구에서 병인론 면역학적 반응을 경감시키는 항체 반응을 억제하는 시약의 능력이 지지되었다. 나중 연구에서, CD40/CD40 경로를 차단하는 항체를 투여하면 생체내에서 병원성 항체의 생성을 유도하는 세포의 전달시 생성되는 루푸스 신염의 가속화를 억제하며, 항체가 계로부터 제거된 후에도 오랫동안 자발적인 질병에 지속적으로 이로운 효과를 주는 것이 관찰되었다. 이들 자료는 본 발명의  $LT\beta$ -R 차단제가 항체 반응 생성을 유도하는 과정을 억제하므로써 조직 이식 및 기관 이식의 세포 거부반응을 억제하는 데 유용하다.

본 발명의 조성물과 방법의  $LT\beta$ -R 차단제는 치료하려는 질환, 장애 또는 질병에 따라  $LT\beta$ -R 시그널링의 바람직한 수준을 얻을 수 있도록 변형할 수 있다.  $LT\beta$ -R 시그널링의 절대 수준은 그들 각각의 분자 표적을 위한  $LT\beta$ -R 차단제의 농도 및 친화성을 조작하므로써 미세 조절하도록 강구할 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 일양태에서, 가용성  $LT\beta$ -R 분자를 포함하는 조성물이 검체에 투여한다. 상기 가용성  $LT\beta$  수용체는 표면 LT 리간드를 결합하기 위해 세포 표면  $LT\beta$  수용체와 효과적으로 경쟁한다. 표면 LT 리간드와 경쟁할 수 있는 능력은 가용성  $LT\beta$ -R 분자와 세포 표면  $LT\beta$ -R 분자의 상대적인 농도 및 그들의 리간드 결합에 대한 친화성에 따라 달라진다.

변종 가용성  $LT\beta$ -R의 표면 LT 리간드와의 결합 친화성을 증가 또는 감소시키는 돌연변이를 보유하는 가용성  $LT\beta$ -R 분자는 당업자에게 공지된 표준 재조합 DNA 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 위치 지시된 또는 무작위 돌연변이를 보유하는 다수의 분자는 본 명세서에 기술한 통상적인 실험 및 기법을 이용하여  $LT\beta$ -R 차단제로서 작용하는 그들의 능력에 대해 테스트할 수 있다.

유사하게, 본 발명의 다른 일양태에서,  $LT\beta$  수용체 또는 하나 이상의 LT 리간드 서브유닛에 대해 유도된 항체는  $LT\beta$ -R 차단제로서 작용한다.  $LT\beta$  수용체 시그널링을 차단할 수 있는 이들 항체의 능력은 돌연변이, 화학적 변경 또는 검체에 전달된 항체의 유효 농도 또는 활성을 변화시킬 수 있는 기타 방법에 의해 변경시킬 수 있다.

$LT\beta$ -R 시그널링을 완전히 억제하지 않고  $LT\beta$ -R 시그널링을 감소시킬 수 있는 능력은 악화되거나 비정상적인 항체 또는 세포 매개된 반응을 억제하면서 정상적인 면역 기능을 지지하는  $LT\beta$ -R 시그널링의 감소된 수준을 확립 또는 유지하기 위해 중요할 수 있다.

마우스 내에서  $LT\alpha$  유전자의 파괴는 비정상적인 주변 림프성 기관 발육을 유도한다(De Togni et al., *Science*, 264, pp. 703-707 (1994)). 이러한 마우스는 림프절이 결핍되어 있고, 그들의 비장은 소낭 내에서 T 세포 및 B 세포가 풍부한 영역 사이의 통상적으로 투명한 분획이 결핍되어 있다. 본 발명자들은 이러한 표현형이 표면 LT-유도된  $LT\beta$ -R 시그널링의 상실과 관련이 있는 것으로 생각하였는데, 그 이유는 유사한 표현형이 TNF-R 활성을 조절하므로써 관찰되지 않기 때문이다. 따라서, 선택적으로 또는 부분적으로  $LT\beta$ -R 경로를 차단할 수 있는 능력은  $LT\beta$ -R 경로에 의한 시그널링의 오발현 또는 과발현과 관련된 만성 염증으로부터 생긴 비정상적인 림프성 구조 형성을 치료하는데 유용할 수 있다.

항체는 병인제에 대한 면역 반응의 중요한 매개체이다. 따라서, 항체 반응의 절대적인 억제자가 특정 사항에서 바람직하지 않을 수 있다. 예를 들어, 항체는 뉴모코코스 및 헤모필러스와 같은 세포의 박테리아에 의한 감염에 대한 내성을 매개할 필요가 있다.

LTβ-R 시그널링을 차단하므로써 생성되는 항체량에 영향을 미칠 수 있는 능력은 본 발명의 LTβ-R 차단제를 이용하는 치료에 의해 획득될 수 있는 이로온 결과를 최대화하는데 중요할 수 있다.

본 발명의 치료 방법은 LT-β 경로에 전체적으로 또는 일부 의존하는 억제 반응을 선택적으로 포함한다. 본 발명에 의해 청구되는 특정 치료 용도는 당업자에게 자명한 바와 같이 억제하고자 하는 과정 또는 촉진하고자 하는 의학적으로 바람직한 과정의 관련된 병인 메카니즘에 의존한다. 따라서, 본 발명의 방법은 각종 양태에서 LT-β-R 또는 LT-β의 차단제를 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 이들 방법에 사용된 단백질은 전질이 단백질, 이 단백질의 단편 또는 용합 단편일 수 있다. 다른 양태에서, 가용성 림프독소-β 수용체와 같은 가용성 단편을 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 바람직한 양태에서, 청구한 발명은 LT-β-R 또는 LT-β에 대한 항체의 투여에 관한 것이다. 본 발명의 차단제는 의학적으로 바람직한 효과를 높이는 제2 화합물의 치료학적 유효량과 동시에 투여될 수 있다.

예를 들어, AIDS 및/또는 HIV의 치료에 대한 특정 방법에서, 당해 분야에 공지된 추가의 항바이러스제를 동시투여하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, AZT 또는 프로테아제 억제제가 있다. AIDS "칵테일" 치료와 병행하여 본 발명의 차단제, 더욱 바람직하게는 LT-β-R/IgG 용합 단백질을 투여하는 것이 특히 좋다. 이들 약물 "칵테일"은 여러 약물을 환자에게 투여하여 환자의 계에서 바이러스 양을 감소시킨다.

본 발명의 조성물은 담체 부형제에서 제조되는 방법과 같이 표준 방법으로 제형화할 수 있다. 약학적 허용 담체는 1종 이상의 유기 또는 무기 성분, 천연 또는 합성 성분일 수 있으며, 환자에게 본 발명의 차단제를 투여하기 용이하게 하는 성분을 의미한다. 적절한 담체는 당업자에게 알려져 있다.

본 발명의 조성물은 의학적으로 허용가능한 임의의 방법으로 투여될 수 있다. 이는 비경구 경로, 예컨대 정맥내, 혈관내, 동맥내, 피하, 근육내, 종양내, 복강내, 엔트리쿨라레내(intraentriculare), 경막내 등 뿐 아니라 경구, 비강, 안구, 직장 또는 국소 주사를 포함한다. 서방형 투여도 본 발명에 특별히 포함되며, b는 데포우 주사 또는 삽입물과 같은 것을 의미한다. 특정한 위치에 전달하는 것이 좋다. 투여 방식은 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

본 발명에 유용한 LT 경로의 차단제는 본원에서 청구하는 항체인 가용성 LT-β-R의 작용성 유도체를 포함한다. 작용성 유도체는 분자의 단편, 변형체, 유사체 또는 화학적 변형체를 포함한다. 본 발명의 임의의 항원과 같은 분자의 단편은 분자의 폴리펩티드 서브세트를 의미한다. 이러한 분자의 변형체는 전체 분자 또는 이의 단편과 거의 유사한 자연 발생적인 분자를 의미한다. 분자의 유사체는 전체 분자 또는 이의 단편과 거의 유사한 비자연 분자를 의미한다.

본 발명의 차단제의 변형체는 아미노산 서열에서의 자연생적인 제제와 다르거나 또는 서열을 포함하지 않은 방식이 다르거나, 또는 둘 모두에 차이가 있다. 아미노산 서열의 변형체는 자연발생적인 분자내의 하나 이상의 아미노산이 다른 천연 아미노산, 아미노산 유도체 또는 비천연 아미노산으로 치환되는 경우 생성된다. 특히 좋은 변형체는 자연 발생적인 단백질 또는 이 단백질의 생물학적 활성 단편을 포함하며, 이 변형체의 서열은 하나 이상의 보존 아미노산 치환으로 야생형 서열과는 다르다. 치환은 당해 분야에 알려져 있으며, 차단제의 2차 구조와 소수성 특성에 최소한의 영향을 준다.

다른 양태에서, 보존성이 적은 아미노산 치환을 한 변형체는 예컨대 전하, 구조 및 다른 생물학적 특성의 변화를 유발하여 바람직한 유도체를 야기할 수 있다. 이러한 치환은, 예컨대 친수성 잔기를 소수성 잔기로 치환, 시스테인 또는 프롤린을 다른 잔기로 치환, 작은 측쇄를 가진 잔기를 큰 측쇄를 가진 잔기로 치환 또는 총 양전하를 가진 잔기를 총 음전하를 가진 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 소정의 치환 결과를 확실하게 예측할 수 없는 경우, 본원에 개시된 방법으로 쉽게 유도체를 분석하여 원하는 특성의 존재 또는 부재를 결정할 수 있다.

본 발명에 속하는 변형체는 본 발명의 차단제와 80이상 상동성을 보유한 아미노산 서열을 가지는 단백질 및 펩티드를 포함한다. 서열 상동성이 90이상, 또는 95이상인 것이 더욱 바람직하다. 상동성을 결정하기 위해서, 비교 서열의 길이는 대개 8개 아미노산 잔기 이상, 일반적으로 20개 아미노산 잔기 이상이다. 본 발명에 속하는 변형체는 또한 1) 본 발명의 차단제의 서열에 40이상의 상동성이 있는 아미노산 서열을 가지는 차단제와, 2) 본 발명의 차단제 서열과 최적 정렬로 배치한 후에, 본 발명의 차단제의 시스테인과 정렬된 시스테인 잔기의 80이상을 보유하는 차단제를 포함한다.

또한 본 발명은 리간드 및 항체를 비롯하여 본 발명의 차단제에 특이적으로 결합하는 제제도 포함한다.

이하, 본 발명의 가용성 LTβ 수용체, 항LT 리간드 및 항LTβ-R 항체와 이들을 특성화하는데 사용되는 방법을 예시하는 실시예를 기술한다. 이들 실시예는 단지 예시만을 목적으로 하는 비제한적인 것이며, 본 발명은 첨부하는 특허 청구의 범위에 의해서만 한정된다.

### 실시예 1

#### 면역글로블린 Fc 융합 단백질로서 가용성 인간 LT-β 수용체의 제조

체세포 하이브리드(Baens et al., Genomics, 16, pp. 214-18 (1993))로부터 유도한 인간 12p 전사된 서열의 라이브러리에서 분리된 인간 cDNA 클론의 서열은 진뱅크 내로 도입한 후, 인간 LTβ-R을 암호화하는 서열로 동정하였다. 이 전길인 인간 LTβ-R cDNA 클론의 서열은 1992년 이래 진뱅크 엔트리 L04270으로 사용하여 왔다.

경막 영역까지의 LTβ-R의 세포외 도메인(도 1)은 5' 및 3' 단부 각각에 NotI 및 SalI 제한 효소 위치를 도입한 프라이머를 이용하여 cDNA 클론으로부터 PCR로 증폭하였다[Browning et al., J. Immunol., 154, pp. 33-46 (1995)]. 상기 증폭된 생성물은 NotI 및 SalI로 절단하고, 정제하고, 인간 IgG1의 Fc 영역을 암호화하는 SalI-NotI 단편과 함께 NotI-선형화된 벡터 pMDR901내로 연결하였다. 생성된 벡터는 별도의 프로모터로부터 유도된 디히드로폴레이트 리덕타제 유전자 및 LTβ-R-Ig 융합 단백질을 함유하였다.

상기 벡터는 전기침투법으로 CHO dhfr<sup>-</sup> 세포내로 도입하고, 메토티렉세이트-내성 클론을 표준 방법에 따라 분리하였다. 상기 LTβ-R-Ig는 배지 내로 분비되었으며, ELISA 분석법을 이용하여 대량의 수용체 융합 단백질을 생성하는 세포주를 선택하였다. 고생산 세포주는 다수로 증식하였으며, 조정 배지는 수거하였다. 순수한 LTβ 수용체 융합 단백질은 단백질 A 세파로즈 패스트 플로우 친화성 크로마토그래피(파마시아)를 이용하여 분리하였다.

### 실시예 2

#### 면역글로블린 Fc 융합 단백질로서 가용성 쥐 LTβ 수용체의 제조

쥐 LTβ-R의 완전한 cDNA 클론은 2개의 부분 cDNA 분리체로부터 취한 5' NotI/ApaLI 및 3' ApaLI/NotI 단편을 pCDNA3(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 인비트로젠)의 NotI 위치내로 결찰하므로써 제조하였다. 상기 cDNA 클론의 서열은 진뱅크 엔트리 U29173으로 접근가능하다. 진뱅크 엔트리 L38423에서 확인된 쥐 LTβ-R에 대한 다른 서열 엔트리와 비교시, 암호 서열 차이점은 발견할 수 없었다.

가용성 쥐 LT-β-R/인간 IgG1 융합 단백질은 주형으로 전길인 mLT-β-R cDNA 클론을 이용하고, 프라이머로서 5'AACTGCAGCGGCCGCCATGCGCCTGCCCC3' 및 5'GACTTTGTGTCGACCATTGCTCCTGGCTCTGGGGG3' 을 이용하는 PCR 증폭으로 제조하였다. 증폭된 생성물은 정제하고, NotI 및 SalI로 절단하고, SalI/NotI 인간 IgG1 Fc 단편과 함께 NotI-선형화되고 포스파타제-처리된 SAB132 내로 결찰하여 JLB 122 를 형성하였다. 안정한 발현을 위해, 쥐 LTβ-R-Ig 단편을 함유하는 NotI 카세트는 PSH001을 형성하는 pMDR901의 NotI 위치내로 전달하고, 상기 벡터는 문헌 [Browning et al., et al., Immunol., 154, pp. 33-46 (1995)]에 개시된 바와 같이 CHO 세포내로 형질감염하였다. 쥐 LTβ-R-Ig를 분비하는 세포 클론은 ELISA 분석법으로 동정하였다. 정제된 수용체 융합 단백질은 단백질 A 세파로즈 패스트 플로우 크로마토그래피(파마시아)를 이용하여 CHO 세포 상청액으로부터 분리하고 하기 실시예에 사용한다.

### 실시예 3

#### LTβ-R-Ig를 마우스에게 수회 주사한 후 비장의 면역조직화학적 분석

4~5주령의 마우스에게 1주일에 1회 LTβ-R-Ig 또는 LFA-3-Ig(100 μg ip)를 6회 주사하고 6번째 융합 단백질을 주사한 날에 SRBC로 면역시켰다. 이어서, SRBC로 항원투여 4일 후에 마우스에게 LTβ-R-Ig 또는 LFA-3-Ig를 추가로 주사하였다. SRBC로 항원투여 10일 후에 동물을 죽이고 기관을 수거하여 구조를 분석하였다. 도 2의 왼쪽 줄은 LFA-3-Ig로 처리한 동물에서 얻은 비장 절편이고(A, C, E, G, I), 오른쪽 줄은 LTβ-R-Ig로 처리한 동물에게서 얻은 비장 절편이다(B, D, F, H, J). 아세톤으로 고정한 냉동 비장 절편은 비오틴화된 항마우스 B220 표지된 항체와 항마우스 CD4 항체(A 및 B)로 이중 염색한 후에 알카리 포스파타제 표지된 스트렙타비딘(청자색, 어두운 염색)과 호스래디쉬 퍼옥시다제 표지된 마우스 항래트 Ig(밝은 갈색 염색)로 각각 해당 제2 염색을 수행하였다. 냉동 절편의 또 다른 세트는 ER-TR-9(MZM, C 및 D를

검출), MOMA-1(금속친화성 대식세포, E 및 F 검출), MECA-367(MAdCAM-1, G 및 H에 대해 특이적) 및 ER-TR-7(망막 섬유아세포, I 및 J 염색) 항체로 염색한 후 호스래디쉬 퍼옥시다제 표지된 마우스 항래트 Ig(갈색 염색)로 제2 염색하였다. 이들 사진은 최소한 6마리의 동물로부터 얻은 절편의 표본 염색이다. 10X 확대 사진.

#### 실시예 4

##### GC 형성 및 FDC 염색에 대한 $LT\beta$ -R-Ig 및 항CD40 리간드의 효과

실시예 3에 개시된 바와 같이  $LT\beta$ -R-Ig 또는 LFA-3-Ig로 동물을 처리하였다. 동물의 또 다른 그룹은 -1, 1 및 3일에 MR1(항마우스 CD40 리간드, 1회 주사당 250  $\mu$ g, 복강내 투여)으로 처리하고, 0일 째에 SRBC를 주사하며 10일 째에 동물을 죽였다. LFA-3-Ig(도 3의 왼쪽 줄, A 및 D) 또는  $LT\beta$ -R-Ig(도 3의 중간 줄, B 및 E), 또는 MR1(도 3의 오른쪽 줄, C 및 F)로 처리한 동물의 아세트 고정된 비장 절편을 비오틴 표지된 피넛 응집소(PNA, 윗줄, A, B, C) 또는 FDC-M1(아랫줄, D, E 및 F)로 염색한 후 호스래디쉬 퍼옥시다제 표지된 스트렙타비딘과 호스래디쉬 퍼옥시다제 표지된 마우스 항래트 Ig로 각각 2차 염색하였다(갈색 염색). 변연대의 PNA 염색은 A 및 C에 화살표로 나타나있다. GC 형성은 A의 백색 별로 나타내었다. FDC는 D 및 F에 검은 화살표로 나타내었다. 이들 사진은 4 마리 이상의 동물로부터 얻은 절편의 표본 염색이다. 10X 확대.

#### 실시예 5

##### 자궁내에서 그리고 출생후에 계속해서 $LT\beta$ -R-Ig로 처리한 마우스의 LN에서의 아드레신 발현

이 실험에서는 200  $\mu$ g의 수용체 Ig 단백질을 임신 14일과 17일에 정맥 주사한 임신 적기의 Balb/c의 자손을 사용하였다. 자손이 출생한 후,  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig 또는 LFA-3-Ig 100 $\mu$ g을 1주일에 1회 복강내 주사하였다. 융합 단백질량은 ELISA(자료는 제시하지 않음)에 의해 측정되는 바와 같이 일생을 통해 약 10  $\mu$ g/ml 또는 그 이상으로 유지되었다. 도 4: 패널 A, B, G, H는  $LT\beta$ -R-Ig로 처리한 마우스에서 얻은 림프절 염색. 패널 C, D는 LFA-3-Ig로 처리한 마우스에서 얻은 림프절의 염색. 패널 E, F는 TNF-R55-Ig로 처리한 마우스에서 얻은 림프절의 염색. 패널 A, C, E, G는 점막 아드레신, MadCAM-1을 검출하기 위해 항체 MECA317로 염색한 장간막 림프절이다. 패널 B, D, F, H는 주변 LN 아드레신(PANDs)에 특이적인 항체 MECA79로 염색한 주변(팔) 림프절이다. 패널 G, H는 자궁내에서만  $LT\beta$ -R-Ig에 노출된 6주령 마우스의 림프절이다. 모든 영상은 50X 확대한 것이다.

#### 실시예 6

##### 자궁내에서 그리고 출생 후에 계속해서 $LT\beta$ -R-Ig로 처리한 마우스의 LN에서 대식세포 마커의 발현 및 림프구 정위

실시예 5에 개시된 바와 같이 자궁내에서 그리고 출생 후에 계속해서  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig 또는 LFA-3-Ig로 마우스를 처리하였다. 이어서, LN 절편을 대식세포에 의해 발현되는 마커에 특이적인 항체로 염색하거나 또는 B 세포 마커 B220 및 T 세포 마커 CD4에 특이적인 mAb로 염색하였다. 영상 분석은 T 세포 영역과 B 세포 영역의 중복 영역을 확인하기 위해서 사용하였다. 도 5: 패널 A, D, G는 각각  $LT\beta$ -R-Ig, LFA-3-Ig 및 TNF-R55-Ig 처리 마우스에서 얻은 LN의 B220/CD4 염색이다. 형광 영상은 영상 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 패널 B, E, H는 시알로아드헤진에 대해 염색한 것이고 패널 C, F, I는 MOMA-1에 대해 염색한 것이다.

#### 실시예 7

##### SRBC에 대한 항체 반응에서 $LT\beta$ -R-Ig 처리의 효과

Balb/c 마우스에게 다음과 같은  $LT\beta$ -R-Ig, 인간의 Ig 또는 PBS를 주사하였다: 도 6A: 마우스는 실시예 3의 도 2에 개시된 바와 같이 6회 주사를 맞았다. SRBC 면역화 7일(검은 막대)후 및 14일(빛금친 막대)후에 동물을 방혈시켰다. 6B: 동물은 -7일과 0일째에 융합 단백질을 받았다. SRBC는 0일째에 제공하고 동물은 7일째(검은 막대), 14일째(빛금친 막대) 및 30일째(흰색 막대)에 방혈시켰다. 6C: 동물은 SRBC 면역화와 동시에 0일째에 1회 융합 단백질을 받았다. 혈액은 7일째(검은 막대), 14일째(빛금친 막대) 및 30일째(흰색 막대)에 수거하였다.

SRBC 특이적 IgM 및 IgG의 역가는 혈구 응집 분석에서 혈청을 분석하여 측정하였다. 역가는 혈구 응집 반응이 검출되고 로그 베이스 스케일이 2(1=혈청의 1/15 희석액)로 나타나는 최종 혈청 희석액의 역수로서 나타내고 역가를 결정하였다. 결과는 각 그룹당 4가지 상이한 동물의 평균으로서 표준 편차와 함께 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

동물의 체액성 면역 반응을 억제하기 위한, LT- $\beta$ -R 차단제의 치료적 유효량을 포함하는 약학 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체, LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 동물이 포유류인 약학 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서, 포유류가 인간인 약학 조성물.

청구항 5.

제2항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 갖는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체가 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7.

제2항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 조성물이 약 1일 내지 약 14일 동안 LT- $\beta$  수용체-양성 세포를 코팅하기에 충분한 양으로 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 9.

제7항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 항-인간 LT- $\beta$ -R mAb BDA8을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 10.**

제2항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 표면 LT 리간드에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 11.**

제10항에 있어서, 조성물이 1일 내지 14일 동안 표면 LT 리간드 양성 세포를 코팅하기에 충분한 양으로 투여되는 것인 약학 조성물.

**청구항 12.**

제10항에 있어서, 항체가 LT 리간드의 서브유닛에 대해 유도되는 것인 약학 조성물.

**청구항 13.**

제12항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 항-인간 LT- $\beta$  mAb B9를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 14.**

제10항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 쥐 표면 LT 리간드에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 15.**

제1항에 있어서, 약학적 허용 담체 또는 보조제(adjutant)를 더 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 16.**

삭제

**청구항 17.**

삭제

**청구항 18.**

삭제

**청구항 19.**

제4항에 있어서, 인간이 인간 면역결핍 바이러스에 감염된 것인 약학 조성물.

**청구항 20.**

포유류에 있어서 인간 면역결핍 바이러스를 치료, 예방 또는 제거하기 위한, LT- $\beta$ -R 차단제의 치료학적 유효량과 약학적 유효 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 21.**

제20항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 가용성 림포톡신- $\beta$ -R, LT- $\beta$ -R에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 22.**

제21항에 있어서, 차단제가 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 함유하는 가용성 림포톡신- $\beta$ -R을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 23.**

제22항에 있어서, 가용성 수용체가 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 24.**

제20항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 LT- $\beta$ -R에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 25.**

제24항에 있어서, 차단제가 항인간 LT- $\beta$ -R mAb BDA8을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 26.**

제20항에 있어서, 차단제가 표면 LT 리간드에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 27.**

제20항에 있어서, 추가의 항바이러스제를 동시투여하는 단계를 더 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 28.**

삭제

**청구항 29.**

삭제

**청구항 30.**

삭제

**청구항 31.**

삭제

**청구항 32.**

삭제

**청구항 33.**

삭제

**청구항 34.**

대상에서 면역 복합체와 B 세포 소낭(follicle)의 결합을 분열시키기 위한, 유효량의 LT- $\beta$ -R 차단제를 함유하는 약학 조성물.

**청구항 35.**

제34항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체, LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 36.**

제34항에 있어서, 동물이 포유류인 약학 조성물.

**청구항 37.**

제34항에 있어서, 포유류가 인간인 약학 조성물.

**청구항 38.**

제35항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 가지는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 39.**

제38항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 40.**

제38항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 41.**

제40항에 있어서, 이종 단백질 도메인이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 42.**

제38항에 있어서, 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체가 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 43.**

제35항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 44.**

제43항에 있어서, 상기 조성물이 약 1일 내지 약 14일 동안 LT- $\beta$  수용체-양성 세포를 코팅하기에 충분한 양으로 투여되는 것인 약학 조성물.

**청구항 45.**

제43항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 항-인간 LT- $\beta$ -R mAb BDA8을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 46.**

제35항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 표면 LT 리간드에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 47.**

제46항에 있어서, 조성물이 1일 내지 14일 동안 표면 LT 리간드 양성 세포를 코팅하기에 충분한 양으로 투여되는 것인 약학 조성물.

**청구항 48.**

제46항에 있어서, 항체가 LT 리간드의 서브유닛에 대해 유도되는 것인 약학 조성물.

**청구항 49.**

제48항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 항-인간 LT- $\beta$  mAb B9를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 50.**

제46항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 쥐 표면 LT 리간드에 대해 유도된 단일클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 51.**

제34항에 있어서, 약학적 허용 담체 또는 보조제를 더 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 52.**

자가면역 질환으로 고통받는 대상에 있어서 항체-매개 자가면역 질환을 치료하기 위한, 치료적 유효량의 LT-β-R 차단제를 함유하는 약학 조성물.

**청구항 53.**

제52항에 있어서, LT-β-R 차단제가 가용성 림포톡신-β 수용체, LT-β 수용체에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 54.**

제53항에 있어서, LT-β-R이 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 55.**

제54항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 56.**

제54항에 있어서, 가용성 LT-β-R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 57.**

제56항에 있어서, 이종 단백질이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 58.**

제53항에 있어서, 가용성 LT-β-R이 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 59.**

제52항 내지 제58항 중 어느 하나의 항에 있어서, 자가면역 질환이 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판 감소증 자반(ITP), 전신성 홍반성 낭창(SLE), 베그너 육아종증, 결절성 다발성 관절염, 급성 진행성 겸상 사구체신염 및 만성 염증성 질병으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 60.**

제59항에 있어서, 만성 염증성 질병이 샤가스병(Chagas' disease) 또는 그레이브스병(Grave's disease)인 약학 조성물.

**청구항 61.**

과민 반응으로 고통받는 대상에 있어서, 체액성 반응을 억제하기 위한, 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R)의 치료적 유효량을 함유하는 약학 조성물.

**청구항 62.**

제61항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체, LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 63.**

제62항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 64.**

제63항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 65.**

제63항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 66.**

제65항에 있어서, 이종 단백질 도메인이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 67.**

제63항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 68.**

제61항 내지 제67항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과민 반응이 유형 I 반응인 약학 조성물.

**청구항 69.**

제61항 내지 제67항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과민 반응이 유형 II 또는 유형 III 반응인 약학 조성물.

**청구항 70.**

대상에 있어서 이식편 거부와 관련된 체액성 반응을 억제하기 위한, 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R)의 치료적 유효량을 함유하는 약학 조성물.

**청구항 71.**

제70항에 있어서, LT- $\beta$ -R 차단제가 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체, LT- $\beta$  수용체에 대해 유도된 항체 및 표면 LT 리간드에 대해 유도된 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 72.**

제71항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 표면 LT 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 73.**

제72항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 74.**

제72항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

**청구항 75.**

제74항에 있어서, 이종 단백질 도메인이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 76.**

제72항에 있어서, 가용성 LT- $\beta$ -R이 인간 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 77.**

동물에 있어서 체액성 면역 반응을 억제하기 위한 약학 조성물로서, 상기 약학 조성물은 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R)의 가용성, 리간드-결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 유효량 및 약학적 허용 담체를 함유하는 것인 약학 조성물.

**청구항 78.**

제77항에 있어서, 체액성 면역 반응이 전신성 홍반성 낭창(SLE)인 약학 조성물.

**청구항 79.**

제77항에 있어서, LT- $\beta$ -R의 가용성, 리간드-결합 도메인이 서열 번호:1을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 80.**

동물에 있어서 전신성 홍반성 낭창(SLE)을 치료하기 위한 약학 조성물로서 상기 약학 조성물은 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R)의 가용성, 리간드-결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 유효량 및 약학 허용 담체를 함유하는 것인 약학 조성물.

**청구항 81.**

제80항에 있어서, LT- $\beta$ -R의 가용성, 리간드-결합 도메인이 서열 번호:1을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 82.**

동물에 있어서 체액성 면역 반응을 억제하기 위한 폴리펩티드의 유효량 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물로서, 여기서 상기 폴리펩티드가 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R)의 가용성, 리간드-결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 83.**

제82항에 있어서, 체액성 면역 반응이 전신성 홍반성 낭창(SLE)인 조성물

**청구항 84.**

제82항에 있어서, LT- $\beta$ -R의 가용성, 리간드-결합 도메인이 서열 번호:1을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 85.**

인간에 있어서 체액성 면역 반응을 억제하기 위한, 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 서열 번호:1을 포함하는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R) 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 86.**

인간에 있어서 TNF-R 시그널링을 억제하지 않으면서 LT-베타 수용체 시그널링을 억제함으로써 체액성 면역 반응을 억제하기 위한, 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 서열 번호:1을 포함하는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R) 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 87.**

인간에 있어서 면역 복합체와 B 세포 소낭의 결합을 분열시키기 위한, 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 서열 번호:1을 포함하는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R) 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 88.**

인간에 있어서 전신성 홍반성 낭창(SLE)를 치료하기 위한, 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 서열 번호:1을 포함하는 가용성 림포톡신- $\beta$  수용체 (LT- $\beta$ -R) 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 89.

제5항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 90.

제5항에 있어서, 가용성 LT-β-R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 91.

제90항에 있어서, 이종 단백질 도메인이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 92.

제22항에 있어서, 리간드 결합 도메인이 서열 번호:1 또는 그것의 작용성 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 93.

제22항에 있어서, 가용성 LT-β-R이 1 또는 그 이상의 이종 단백질 도메인을 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 94.

제93항에 있어서, 이종 단백질 도메인이 면역글로불린, 혈청 알부민, 리포단백질, 아포리포단백질 및 트랜스페린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

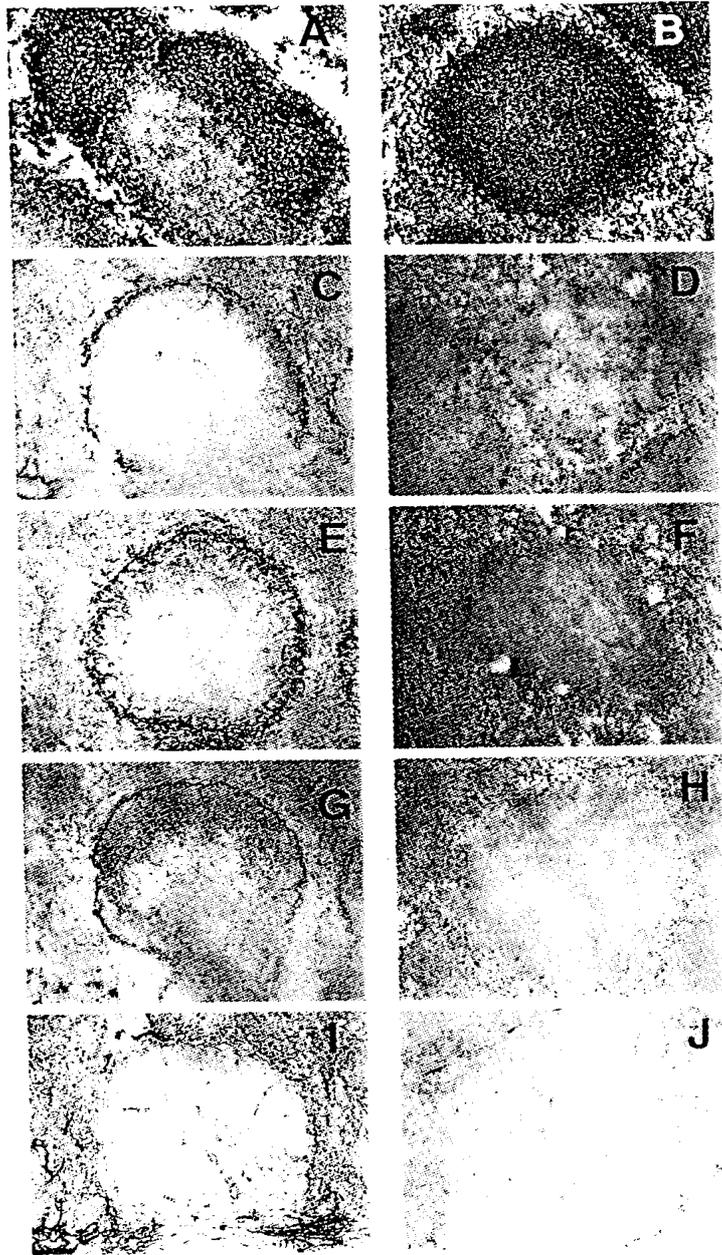
도면

도면1

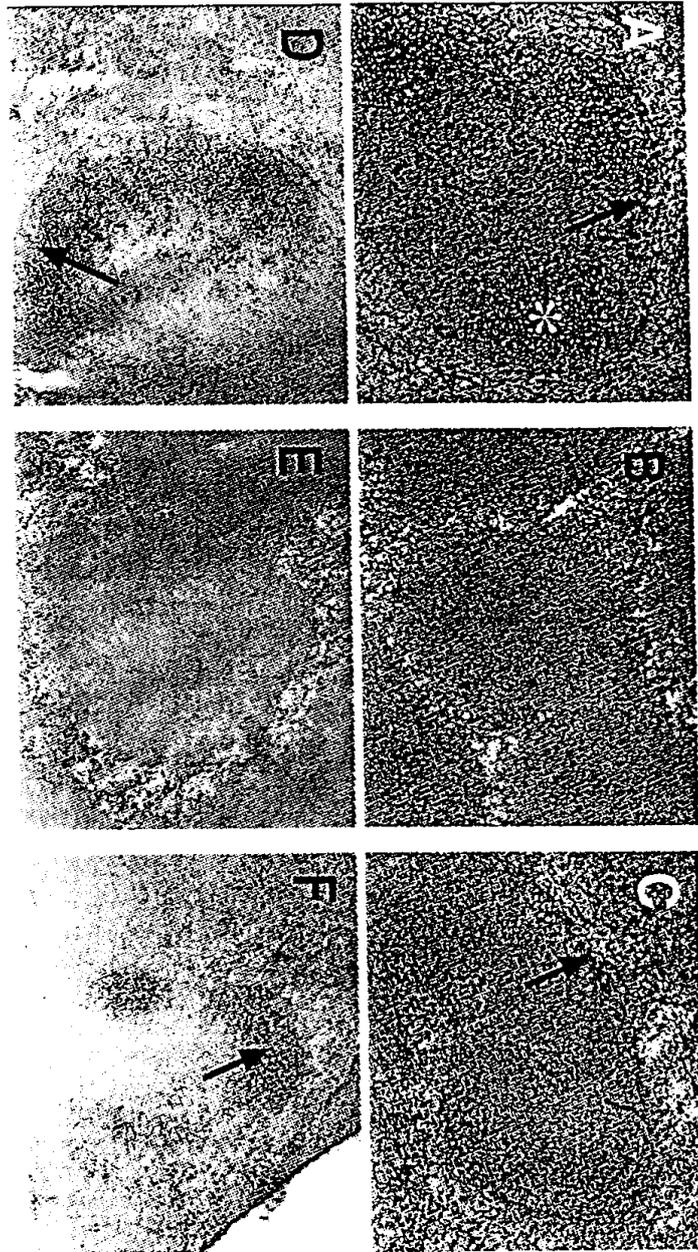
```

1   SQPQAVPPYA SENQTCRDQE KEYYEPQHRI CCSRCPPGTY VSAKCSRIRD 50
51  TVCATCAENS YNEHWNYLTI CQLCRPCDPV MGLEEIAPCT SKRKTQCRCQ 100
101 PGMFCAAWAL ECTHCELLSD CPPGTEAELK DEVGKGNHC VPCKAGHFQN 150
151 TSSPSARCQP HTRCENQGLV EAAPGTAQSD TTCKNPLEPL PPEMSGT 197
    
```

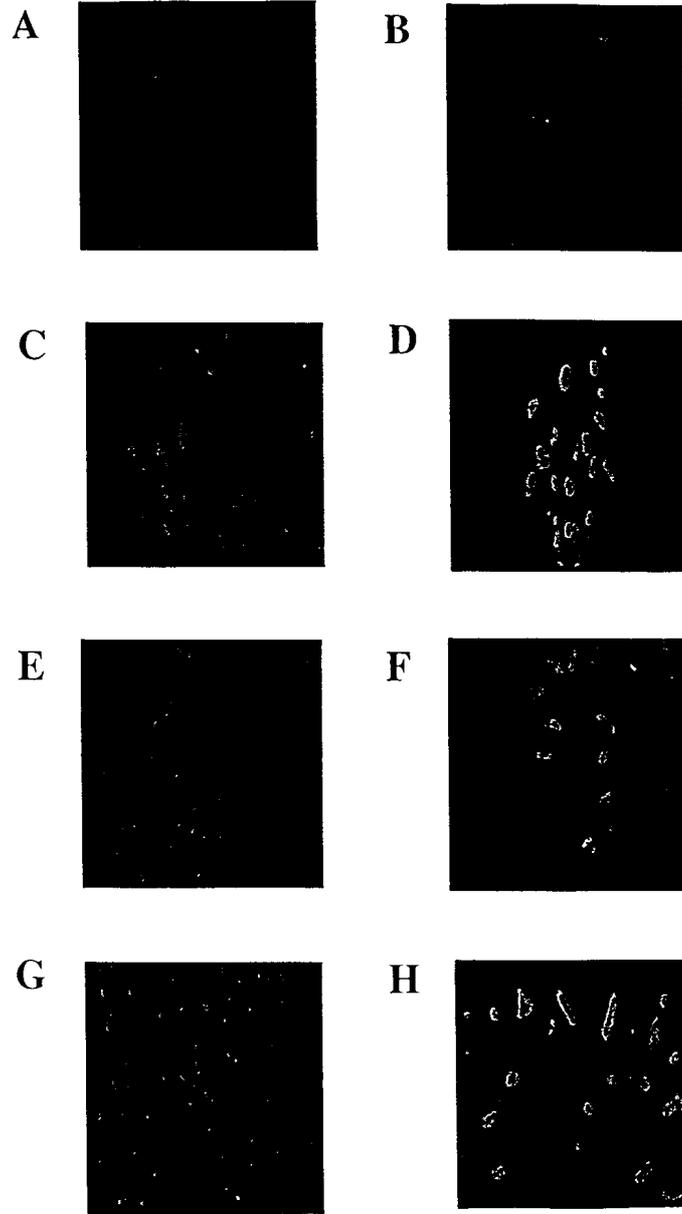
도면2



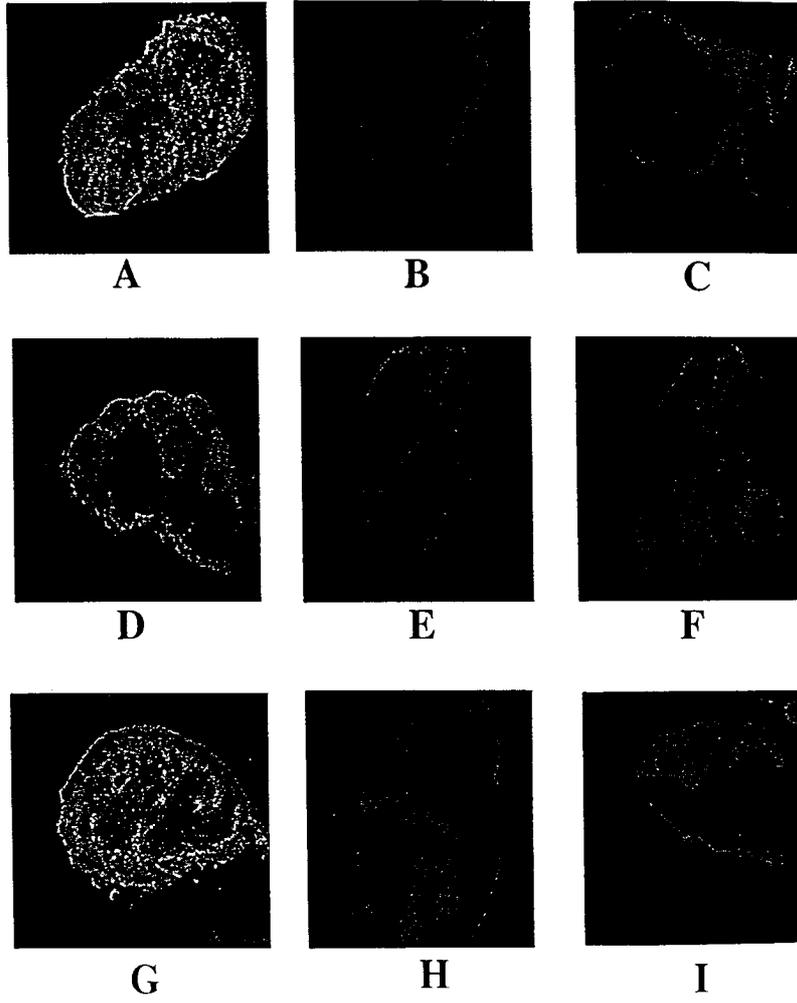
도면3



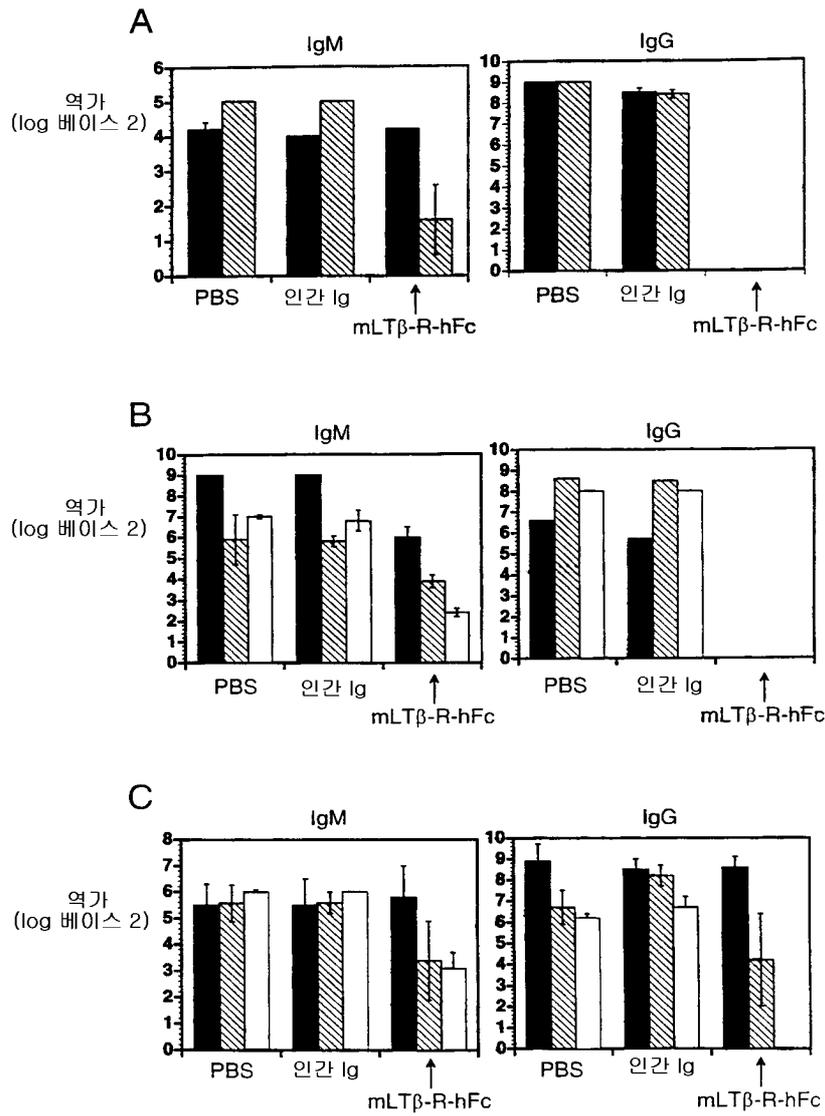
도면4



도면5



도면6



도면7

