(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0096401
(43) 공개일자 2012년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7027566
(22) 출원일자(국제) 2010년04월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/031740
(87) 국제공개번호 WO 2010/123891
국제공개일자 2010년10월28일
(30) 우선권주장
61/171,008 2009년04월20일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
엔에스에이비피 파운데이션, 인크.
미국 15212 펜실베니아주 피츠버그 포 알레게니 센터 5층
(72) 발명자
피페, 퀜돌린
미국 94133 캘리포니아주 샌프란시스코 라 페레라 테라스 20
헤드릭, 에릭
미국 07901 뉴저지주 서미트 호바트 애비뉴 59
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

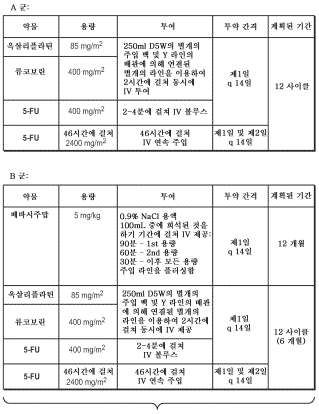
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **아주반트 암 요법**

(57) 요 약

본원은 아주반트 암 요법에서 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 포함하는 방법 및 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

매스, 로버트 디.

미국 94941 캘리포니아주 밀 밸리 엘리노 애비뉴 106

울마크, 노만

미국 15212 펜실베니아주 피츠버그 머레이 힐 애비뉴 1201

(30) 우선권주장

61/171,318 2009년04월21일 미국(US)

61/181,195 2009년05월26일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

결정적 외과수술 이후의 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 1년을 초과하여 투여하여, 환자의 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 연장시키는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, DFS 또는 OS가 VEGF-특이적 길항제에 의한 치료를 개시한 지 약 2 내지 약 5년 후에 평가되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, DFS 또는 OS를 연장시키는 것이 암 재발을 방지 또는 지연시키거나 또는 제2 원발성 암의 발생을 방지 또는 지연시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

결정적 외과수술 이후의 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인 아주반트 요법의 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 6개월 동안 암의 진행이 방지 또는 지연되는 방법.

청구항 6

결정적 외과수술 이후의 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인 아주반트 요법의 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 6개월 동안 암의 재발이 방지 또는 지연되는 방법.

청구항 8

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 1년을 초과하여 투여하여, 환자의 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, DFS 또는 OS가 VEGF-특이적 길항제에 의한 치료를 개시한 지 약 2 내지 약 5년 후에 평가되는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, DFS 또는 OS를 연장시키는 것이 암 재발을 방지 또는 지연시키거나 또는 제2 원발성 암의 발생을 방지 또는 지연시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인 아주반트 요법의 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 6개월 동안 암의 진행이 방지 또는 지연되는 방법.

청구항 13

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인 아주반트 요법의 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 6개월 동안 암의 재발이 방지 또는 지연되는 방법.

청구항 15

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하여 환자의 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제는 1년을 초과하여 투여하는 것인, 암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, DFS 또는 OS가 VEGF-특이적 길항제에 의한 치료를 개시한 지 약 2 내지 약 5년 후에 평가되는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, DFS 또는 OS를 연장시키는 것이 암 재발을 방지 또는 지연시키거나 또는 제2 원발성 암의 발생을 방지 또는 지연시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인, 암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 6개월 동안 암의 진행이 방지 또는 지연되는 방법.

청구항 20

암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속되는 것인, 암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEGF-특이적 길항제의 투여가 임상적으로 검출가능한 종양의 발생 또는 재발 가능성, 또는 그의 전이 가능성을 방지하거나 감소시키는 것인 방법.

청구항 22

환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하고, 상기 VEGF-특이적 길항제의 투여는 암 재발을 방지하는 것인, 환자에서 암 재발을 방지하는 방법.

청구항 23

환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하고, 상기 항-VEGF 항체의 투여는 암 재발 가능성을 감소시키는 것인, 환자에서 암 재발 가능성을 감소시키는 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 환자가 VEGF-특이적 길항제의 투여 이전에 결정적 외과수술을 받은 환자인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 결정적 외과수술 이후에 암 재발 위험이 있거나 또는 생존 가능성이 낮은 것으로 확인된 환자인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, VEGF-특이적 길항제에 의한 치료가 화학요법제에 의한 치료와 동시에 이루어지는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF-특이적 길항제가 항-VEGF 항체인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 항-VEGF 항체를 결정적 외과수술의 적어도 28일 후에 환자에게 투여하는 것인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 항-VEGF 항체가 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 것인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 항-VEGF 항체가

하기 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (서열 1)

및 하기 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR (서열 2)

을 갖는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 폐암, 신암, 위암, 난소암 또는 교모세포종인 방법.

청구항 34

항-VEGF 항체 조성물 및 아주반트 요법에서 항-VEGF 항체 조성물의 사용에 대한 지침서를 포함하는 패키지를 포함하고, 지침서에는 아주반트 요법을 받은 환자의 경우 아주반트 요법 개시 후 1년째에 DFS가 94.3, 위험비가 0.60임이 기재되어 있는 것인, 암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자의 치료용 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2009년 4월 20일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/171,008; 2009년 4월 21일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/171,318; 및 2009년 5월 26일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/181,195에 대한 우선권 및 그 이익을 주장하며, 이들 가출원 각각의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 인간 질환 및 병리 상태의 치료에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 아주반트 암 요법에서의 항혈관신생제의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 암은 인간 건강에 가장 치명적인 위협 중의 하나이다. 미국에서만 매년 1백 3십만명 정도의 새로운 암 환자가 발생하고, 이는 심혈관계 질환 다음으로 두 번째 주요 사망 원인이며, 사망자 4명 중의 대략 1명이 암 환자인 것으로 추정된다. 이러한 사망의 대부분은 고형 종양으로 인한 것이다. 특정 암의 경우에는 의학적 치료에 유의한 진보가 있었지만, 모든 암에 대한 전반적인 5년 생존율은 지난 20년 동안 겨우 약 10%만 개선되었다. 암 또는 악성 종양은 제어되지 않는 방식으로 신속하게 전이 및 성장하기 때문에 제시간에 이를 검출하고 치료하는 것은 극도로 어려운 일이다.

[0006] 현재 대부분의 암 치료 방법은 비교적 비-선택적이고 일반적으로 암이 보다 악성기로 진행된 후의 종양을 표적으로 한다. 수술은 병든 조직을 제거하고; 방사선요법은 고형 종양을 축소시키며; 화학요법은 분열 세포를 신속하게 사멸시킨다. 특히 화학요법은 수 많은 부작용을 야기하는데, 일부 경우에는 제공될 수 있는 투여량을 제한할 정도로 심각한 부작용을 야기하여, 잠재적으로 효과적인 약물의 사용을 배제시킨다. 더우기, 암에서 종종 화학요법 약물에 대한 내성이 생긴다.

[0007] 수술가능한 암이 있는 것으로 새로이 진단된 대부분의 환자의 경우에는, 표준 치료가 결정적 외과수술에 이은 화학요법이다. 이러한 치료는 재발을 방지하고 생존율을 개선시키기 위하여 가능한 한 많은 원발성 및 전이성 질병을 제거하는 것을 목표로 한다. 실제로, 이들 환자 대부분은 수술 후 육안으로는 잔류성 종양이 존재한다는 명백한 증거를 갖고 있지 않다. 그러나, 이들 중 많은 수가 나중에 재발되어 결국에는 사망할 수 있다. 이는, 예를 들어 소수의 생존가능한 종양 세포가 수술 이전에 전이되기 시작했고, 수술을 피하여 현재의 검출 기술 상의 한계로 인해 수술 후 검출되지 않은 경우에 발생할 수 있다.

[0008] 따라서, 이들 암 세포가 재증식하여 치료하기 곤란해지기 전에 이들 잔류성 미세전이성 암 세포를 제거하기 위하여 수술에 대한 보조 수단으로서의 수술후 아주반트 치료법이 중요해진다. 과거 수 십년 동안, 아주반트 요법 상의 진보는 일반적으로 증가 추세였는데, 각종 화학요법제의 사용에 집중되어 왔다. 많은 화학요법 섭생이 조기 주요 암 적응증, 예컨대 폐암, 유방암 및 결장직장암 환자를 보조적으로 치료하는 데에 있어서 임상적 이점을 나타내었다. 문헌 [Strauss et al., J Clin Oncol 22:7019 (2004)]; [International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaboration Group N Engl J Med 350:351-60 (2004)]. 문헌 [Moertel et al., Ann Intern Med 122:321-6 (1995)]; [IMPACT Lancet 345:939-44 (1995)]; [Citron et al., J Clin Oncol 21:1431-9 (2003)].

[0009] 화학물질에 기초한 아주반트 요법의 확립된 이점에도 불구하고, 임의의 종류의 화학요법과 관련된 한 가지 주요 단점은 독성이 상당히 높다는 것이다. 일반적으로, 화학요법 약물은 종양 부위를 표적으로 하지 않고, 정상 세포와 종양 세포를 식별할 수 없다. 독성에 관한 쟁점은 오랜 치료와 환자의 삶의 질에 미치는 영향력 때문에 아주반트 요법에서 특히 도전 과제로 대두된다. 더우기, 재발 위험이 보다 낮은 환자에서 아주반트

화학요법의 이점은 여전히 명확치 않기 때문에, 이들이 화학요법 부작용을 참는 것이 가치있는 일인지의 여부는 의심스럽다.

[0010] 혈관신생은 혈관 내피 세포가 증식하고, 불필요한 부분을 잘라내고, 재구성하여, 기존의 혈관망으로부터 새로운 혈관을 형성하는 중요한 일련의 세포적 사건을 지칭한다. 혈관의 공급 발생이 정상적 및 병리학적 증식성 과정에 필수적이라는 설득력있는 명백한 증거가 있다. 산소 및 영양분의 전달 뿐만 아니라 이화 산물의 제거는, 다세포 유기체에서 발생하는 대다수의 성장 과정에 있어서의 속도 제한 단계를 대표한다.

[0011] 새로운 혈관의 유도가 종양 혈관신생의 우세한 방식이라고 여겨지지만, 최근의 데이터는 일부 종양이 기존의 숙주 혈관을 공동-선택하여 성장할 수 있음을 나타냈다. 이때, 이와 같이 공동-선택된 혈관계는 퇴행하여, 종양 퇴행을 유발하고, 이는 결국에는 종양 주변에서의 저산소증-유도된 혈관신생에 의해 역전된다.

[0012] 정상적인 혈관신생과 비정상적인 혈관신생 둘 다의 핵심적인 양성 조절자 중 하나는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)-A이다. VEGF-A는 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F 및 P1GF를 포함하는 유전자 패밀리의 일부이다. VEGF-A는 주로 2종의 고친화성 수용체 티로신 키나제인 VEGFR-1 (Flt-1) 및 VEGFR-2 (Flk-1/KDR)에 결합하는데, 후자의 것은 VEGF-A의 혈관 내피 세포 유사분열촉진 신호의 주요 전달자이다. 추가로, 뉴로필린-1이 헤파린 결합 VEGF-A 이소형에 대한 수용체로서 확인되었고, 이는 혈관 발생시에 소정의 역할을 할 수 있다.

[0013] VEGF는 혈관신생 인자 이외에도 다면발현성 성장 인자로서, 기타 생리학적 과정, 예컨대 내피 세포 생존 및 증식, 혈관 투과성 및 혈관확장, 단핵구 화학주성 및 칼슘 유입에 있어서 다수의 생물학적 효과를 나타낸다. 더우기, 기타 연구는 여러 개의 비-내피 세포 유형, 예컨대 망막 색소 상피 세포, 췌장관 세포 및 슈반(Schwann) 세포에 대한 VEGF의 분열촉진 효과를 보고하였다.

[0014] VEGF를 병리 상태에서의 혈관신생의 주요 조절자로 인식함에 따라, 병리적 혈관신생을 수반하는 상태에서 VEGF 활성을 차단시키고자 하는 수많은 시도가 있었다.

[0015] VEGF 발현은 대다수의 악성 종양에서 상향조절되고, VEGF의 과다발현은 많은 고형 종양에서 보다 진행된 병기 또는 보다 불량한 예후와 관련이 있다. 따라서, VEGF 신호전달 경로를 억제하는 분자는 병리적 혈관신생이 인지되는 비교적 진행된 고형 종양의 치료에 사용되어 왔다.

[0016] 암은 가장 치명적인 질환 중 하나로 남아있기 때문에, 아주반트 요법과 같은 추가적인 치료가 요망된다. 본 발명은 이러한 필요성 및 기타 필요성에 관한 것으로, 하기하는 개시내용을 검토할 때 명백해질 것이다.

발명의 내용

[0017] **발명의 개요**

[0018] 화학요법과 함께 VEGF-특이적 길항제를 사용하는 것은 암 환자, 예를 들어 전이성 결장직장암, 비소세포 폐암, 유방암 등의 환자에게 유익한 것으로 밝혀져 있지만, 아주반트 요법에서 항-VEGF 항체를 사용하는 것에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본원에서 본 발명은 비전이성, 결장직장암을 가진 인간 대상체에서 아주반트 아바스틴(AVASTIN)®을 사용한 것에 대한 임상 연구 결과에 관한 것이다.

[0019] 따라서, 본 발명은 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 아주반트 요법의 방법은 환자에서 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 연장시킨다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 또한, 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3개월 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 환자는 결정적 외과수술 이후에 VEGF-특이적 길항제를 투여받는다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 계속된다.

[0020] 본 발명은 암에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하여 환자에서 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, 이때 VEGF-특이적 길항제는 1년을 초과하여 투여한다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가된다. 또한, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 계속된다.

[0021] 본 발명은 추가로 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하여 환자에서 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하는, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이때 VEGF-특이적 길항제는 1년을 초과하여 투여한다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 또한, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하는 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하는 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0022] 본 발명은 또한 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암 재발을 방지하거나 지연시키는 방법을 제공하며, 상기 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체의 투여는 암 재발을 방지한다. 본 발명은 추가로 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암 재발 가능성을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어, 항-VEGF 항체의 투여는 암 재발 가능성을 감소시킨다.

[0023] 본 발명의 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 상기 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것은 임상적으로 검출가능한 종양의 발생 가능성 또는 그의 전이 가능성을 방지하거나 감소시킨다.

[0024] 본 발명의 각각의 방법에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체의 투여는 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 계속된다. 일부 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체의 투여는 사망시까지 계속된다.

[0025] 본 발명의 각각의 방법에서, 항-VEGF 항체는 이하에서 기재하는 바와 같은 VEGF 특이적 길항제, 예를 들어 VEGF 수용체 분자 또는 키메라 VEGF 수용제 분자로 대체될 수 있다. 항-VEGF 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 예시적인 항체로는 베바시주맙 (아바스틴®), G6-31, B20-4.1 및 이들의 단편이 포함된다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0026] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA
PGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (서열 1)

[0027] 및 하기 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0028] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR (서열 2)

[0029] 을 포함한다.

[0030] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다.

[0031] 본 발명의 각각의 방법은 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 암의 치료와 관련하여 수행될 수 있다. 이같은 암의 보다 특정한 예에는 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성 암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 신암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 위암, 흑색종 및 다양한 유형의 두경부암이 포함된다. 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 비전이성 결장직장암을 갖는다. 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 전이성 결장직장암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 절제술 후 II 또는 III기의 결장 암종을 갖는다.

[0032] 대상체가 결정적 외과수술을 받은 경우의 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체는 일반적으로 대상체가 외과수술로부터 회복된 소정의 기간 이후에 투여된다. 이러한 기간은 상처 치유 또는 수술 절개부의 치유에 필요한 기간, 상처가 벌어지는 위험을 감소시키는데 필요한 시간, 또는 대상체가 수술 전의 건강 수준과 본질적으로 유사하거나 그보다 더 양호한 건강 수준으로 회복되는데 필요한 기간을 포함할 수 있다. 또한 결정적 외과수술의 완료와 항-VEGF 항체의 첫번째 투여 사이의 기간은 약물 중단기로 필요한 기간을 포함할 수 있으며, 이는 대상체가 치료 요법 사이에 필요로 하거나 요청하는 기간이다. 일반적으로, 결정적 외과수술의 완료와 항-VEGF 항체 요법의 개시 사이의 기간은 1주 미만, 1주, 2주, 3주, 4주 (28일), 5주, 6주, 7주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년 또는 그보다 더 오랜 기간을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 결정적 외과수술과 항-VEGF 항체의 투여 사이의 기간은 2주 초과 1년 미만이다. 한 실시양태에서, 결정적 외과수술과 항-VEGF 항체의 투여 사이의 기간은 적어도 28일이다.

[0033] 상기 각각의 측면은 암의 재발에 대해 대상체를 모니터링하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 모니터링은 예를 들어 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 평가하여 달성할 수 있다. 한 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가된다. 한 실시양태에서, 대상체는 치료 후 적어도 1 내지 5년 동안 무병 상태이다.

[0034] 질환의 유형 및 중증도에 따른 항-VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맙의 바람직한 투여량은 본원에 기재되어 있고, 약 1 ㎍/kg 내지 약 50 mg/kg, 가장 바람직하게는 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 범위, 예를 들어 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 또는 10 mg/kg (이에 제한되지 않음)일 수 있다. 투여 빈도는 질환의 유형 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라서 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 방법으로 측정하여 목적하는 치료 효과가 달성될 때까지 치료를 지속한다. 한 예에서, 본 발명의 항-VEGF 항체는 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 용량 범위로, 예를 들어 5 mg/kg, 7.5 mg/kg 또는 10 mg/kg (이에 제한되지 않음)으로 매주, 2주마다, 또는 3주마다 1회 투여된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 본 발명의 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0035] 상기 각각의 측면의 추가의 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체는 국소 또는 전신 (예를 들어, 경구 또는 정맥내) 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체에 의한 치료는 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 및 12년으로 이루어진 군으로부터 선택된 기간 동안 환자에게 암이 없어질 때까지 연장된다.

[0036] 다른 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제를 이용한 치료는 단독요법이거나, 또는 임상의에 의해 평가되거나 본원에 기재된 바와 같이 VEGF-특이적 길항제 치료 기간 동안 단독요법이다.

[0037] 다른 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제를 이용한 치료는 수술, 방사선 요법, 화학요법, 분화유도 요법, 생물요법, 면역 요법, 혈관신생 억제제 및 항증식성 화합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 추가의 항암 요법과 병용한다. VEGF-특이적 길항제를 이용한 치료에는 또한, 상기 유형의 치료 요법의 임의의 조합이 포함될 수 있다. 추가로, 세포독성제, 항혈관신생제 및 항증식제는 VEGF-특이적 길항제와 조합되어 사용될 수 있다.

한 실시양태에서, 항암 요법은 화학요법이다. 예를 들어, 화학요법제는, 예를 들어 알킬화제, 항대사물, 폴산 유사체, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 관련 억제제, 빈카 알카로이드, 에피포도필로톡신, 항생제, L-아스파라기나제, 토포이소머라제 억제제, 인터페론, 백금 배위 착물, 안트라센디온 치환된 우레아, 메틸 히드라진 유도체, 부신피질 억제제, 아드레노코르티코스테로이드, 프로게스틴, 에스트로겐, 항에스트로겐, 안드로겐, 항안드로겐, 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체 등으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 화학요법제 및 VEGF-특이적 길항제는 동시에 투여된다.

[0038] 추가의 항암 요법을 포함하는 실시양태에서는, 대상체를 VEGF-특이적 길항제를 투여하기 전, 투여하는 동안(예를 들어, 동시에) 또는 투여 후에 추가의 항암 요법으로 추가로 치료할 수 있다. 한 실시양태에서, 항암 요법은 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 류코보린 또는 이들의 조합물의 투여를 포함하는 화학요법이다. 한 실시양태에서, 단독으로 또는 항암 요법과 함께 투여되는 VEGF-특이적 길항제는 유지 요법으로서 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 방법은 또한 예를 들어 원발성 종양의 제거 후에 지속되는 휴면 종양과 같은 종양의 재발 또는 종양의 재성장을 방지하거나, 또는 미세전이의 발생 또는 증식을 감소시키거나 방지하는데 유리하다.

[0040] 본 발명의 상기 각각의 측면의 추가적 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제는 결장직장암 치료를 위해 결정적 외과수술을 받은 대상체의 생존을 증가 또는 연장 (예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 만큼)시키기 위한 양으로 또는 시간 동안 (예를 들어, 특정 치료 요법 동안 시간에 걸쳐) 투여된다. 한 예에서, 대상체에서 생존은 DFS 또는 OS로 측정되고, DFS 또는 OS는 VEGF-특이적 길항제에 의한 아주반트 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가된다. 일부 추가 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제는 대상체에서 암의 재발 가능성 또는 암의 진행을 방지하거나 감소시키기 위해 사용된다.

[0041] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기하는 상세한 설명, 도면 및 특허청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 C-08 시험에 대한 치료 요법을 도시한다. A 군: 12 사이클 (6 개월) 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 (제1일에 옥살리플라틴 (85 mg/m^2)와 동시에 류코보린 (400 mg/m^2) 및 5-FU (400 mg/m^2 IV 볼루스), 및 제1일 및 제2일의 46시간에 걸쳐 5-FU (2400 mg/m^2)); B 군: 12 사이클 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 + 각 화학요법 사이클의 제1일에 옥살리플라틴 이전에 베바시주맙 (5 mg/kg IV)을 1년 동안 q 14일로 투여함.

도 2는 NSABP C-08 시험을 위한 연구 설계를 도시한다. 그룹 1: 12 사이클 (6 개월) 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 (제1일 옥살리플라틴 (85 mg/m^2)와 동시에 류코보린 (400 mg/m^2) 및 5-FU (400 mg/m^2 IV 볼루스), 및 제1일 및 제2일의 46시간에 걸쳐 5-FU (2400 mg/m^2)); 그룹 2: 12 사이클 동안 q 14 일로 변형된 FOLFOX6 + 각 화학요법 사이클의 제1일에 옥살리플라틴 이전에 베바시주맙 (5 mg/kg IV)을 1년 동안 q 14일로 투여함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] **상세한 설명**

[0044] **I. 정의**

[0045] 용어 "VEGF" 또는 "VEGF-A"는 예를 들어 문헌 [Leung et al., Science, 246:1306 (1989)], 및 [Houck et al., Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같은 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 145-, 189-, 및 206- 아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자, 및 또한 이들의 자연 발생 대립유전자 및 프로세싱된 형태를 지칭하는데 사용된다. VEGF-A는 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 및 PlGF를 포함하는 유전자 패밀리의 일부이다. VEGF-A는 주로 2종의 고친화성 수용체 티로신 키나제, VEGFR-1 (Flt-1) 및 VEGFR-2 (Flk-1/KDR)에 결합하며, 여기서 후자는 VEGF-A의 혈관 내피 세포 분열촉진 신호의 주요 전달자이다. 추가로, 뉴로필린-1이 헤파린 결합 VEGF-A 이소형에 대한 수용체로서 확인되었고, 이는 혈관 발생시에 소정의 역할을 할 수 있다. 용어 "VEGF" 또는 "VEGF-A"는 또한 비-인간 종, 예컨대 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 또는 뮤린 VEGF의 경우에는 mVEGF와 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단 형태 또는 단편을 지칭하는데 사용된다. VEGF의 임의의 상기 형태들에 대한 언급은 본 출원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)",

"VEGF (1-109)" 또는 "VEGF165"에 의해 확인될 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화성을 갖는다.

[0046] "항-VEGF 항체"는 VEGF에 충분한 친화성 및 특이성으로 결합하는 항체이다. 선택된 항체는 일반적으로 VEGF에 대해 결합 친화성을 가질 것이고, 예를 들어 상기 항체는 100 nM 내지 1 pM의 Kd 값으로 hVEGF에 결합할 수 있다. 항체 친화성은 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기반 검정 (예컨대 PCT 출원 공보 번호 WO2005/012359에 기재되어 있는 비아코어 검정); 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA); 및 경쟁 검정 (예를 들어 RIA)으로 측정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 이를 방해하는데 있어서의 치료제로서 사용될 수 있다. 또한, 상기 항체를 대상으로 하여 다른 생물학적 활성 검정을 수행하여, 예를 들어 그의 치료제로서의 효과를 평가할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있고, 표적 항원 및 항체의 의도된 용도에 따라 달라진다. 이것의 예는 HUVEC 억제 검정, 종양 세포 성장 억제 검정 (예를 들어, WO 89/06692에 기재된 바와 같음), 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-매개 세포독성 (CDC) 검정 (미국 특허 5,500,362), 및 효능작용 활성 또는 조혈 검정 (WO 95/27062 참조)을 포함한다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B 또는 VEGF-C에도 결합하지 않을 것이고, 다른 성장 인자, 예컨대 P1GF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다.

[0047] "VEGF 길항제"는 1종 이상의 VEGF 수용체에 대한 결합을 포함하여, VEGF 활성을 중화하거나 차단하거나 억제하거나 없애거나 감소시키거나 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원 결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합함으로써 1종 이상의 수용체에 대한 그의 결합을 봉쇄시키는 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제를 포함한다.

[0048] "천연 서열" 폴리펩티드는 자연계로부터 유래된 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 폴리펩티드는 임의의 포유동물로부터의 자연 발생 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 천연 서열 폴리펩티드는 자연계로부터 단리될 수도 있고, 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수도 있다. 구체적으로, 용어 "천연 서열" 폴리펩티드는 폴리펩티드의 자연 발생 말단절단된 형태 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 폴리펩티드의 자연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 달리 스플라이싱된 형태) 및 자연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다.

[0049] 폴리펩티드 "변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적 활성 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 N- 또는 C-말단에 부가되거나 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다.

[0050] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편 (하기 참조)을 포함한다.

[0051] 본 명세서 및 특허청구범위에 걸쳐서, 이뮤노글로불린 중쇄 내의 잔기에 관한 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] (본원에 명백하게 참고로 포함됨)에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다. "카바트에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0052] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 하기 검정에서 기재하는 바와 같이 항체의 Fab 버전 및 VEGF 분자를 사용하여 수행되는 방사선표지된 VEGF 결합 검정 (RIA)으로 측정하고, 이는 VEGF에 대한 Fab의 용액 결합 친화성을 미표지 VEGF의 일련의 적정물의 존재하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 VEGF(109)로 Fab를 평형화시킨 후에 결합된 VEGF를 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획하여 측정한다 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]). 이러한 검정에 대한 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스(Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μg/ml의 포획성 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, 실온 (대략 23℃)에서 2 내지 5 시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]VEGF(109)를 관심 Fab, 예를 들어

Fab-12의 계열 희석물과 혼합한다 (문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 확실히 평형에 도달하게 하기 위해서는 65시간 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시키고, 150 ㎕/웰의 섬광제 (마이크로신트(MicroScint)-20, 패커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(Topcount) 감마 계수기 (패커드)에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다. 또 다른 실시양태에 따르면, Kd 또는 Kd 값을 25℃에서 약 10 반응 단위 (RU)의 고정된 hVEGF (8-109) CM5 칩으로 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용한 표면 플라즈몬 공명 검정으로 측정한다. 간략하게 설명하면, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 인간 VEGF를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 ㎍/mL (약 0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 ㎕/분의 유속으로 주입한다. 인간 VEGF 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응 기를 차단한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 계열 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 ㎕/분의 유속으로 25℃에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램을 동시 핏팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산하였다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의한 결합속도(on-rate)가 $10^6 M^{-1} S^{-1}$을 초과하는 경우, 결합속도는 분광계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic)) (교반 큐벳이 장착됨)에서 측정할 때 증가하는 농도의 인간 VEGF 단쇄 형태 (8-109) 또는 마우스 VEGF의 존재하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-VEGF 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0053] "차단" 항체 또는 항체 "길항제"는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 저하시키는 것이다. 예를 들어, VEGF-특이적 길항제 항체는 VEGF와 결합하여 혈관 내피 세포 증식을 유도하거나 혈관 투과성을 유도하는 VEGF의 능력을 억제한다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 완전히 억제한다.

[0054] 달리 나타내지 않는 한, 표현 "다가 항체"는 본 명세서 전반에 걸쳐 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 항체를 나타내는데 사용된다. 예를 들어, 다가 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 조작되고, 일반적으로 천연 서열 IgM 또는 IgA 항체가 아니다.

[0055] "항체 단편"은 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하여 항원과의 결합 능력을 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 이러한 정의에 포함되는 항체 단편의 예는 다음을 포함한다: (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편, (ii) CH1 도메인의 C-말단에 1개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편, (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편, (iv) VH 및 CH1 도메인을 갖고 CH1 도메인의 C-말단에 1개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편, (v) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편, (vi) VH 도메인으로 이루어지는 dAb 단편 (문헌 [Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)]), (vii) 단리된 CDR 영역, (viii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편, (ix) 단일 쇄 항체 분자 (예를 들어, 단일 쇄 Fv; scFv) (문헌 [Bird et al., Science 242:423-426 (1988)]; 및 [Huston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)]), (x) 동일 폴리펩티드 쇄로 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디(diabody)" (예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조), (xi) 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 병렬식 Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함하는 "선형 항체" (문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]; 및 미국 특허 번호 5,641,870).

[0056] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉, 이러한 집단을 포함하는 개개의 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원에 대하여 지시된다. 추가로, 전형

적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대해 지시된 것이다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 최초로 기재되었던 하이브리도마 방법으로 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)으로 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)] 또는 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재되어 있는 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0057] "Fv" 단편은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인 및 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단하게 회합된 이량체로 이루어지며, 이러한 연결은 예를 들어 scFv에서 성질상 공유 결합일 수 있다. 이러한 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체 표면의 항원 결합 부위를 규정한다. 전체적으로, 6개의 CDR 또는 이것의 하위세트가 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 일반적으로 전체 결합 부위보다 친화성이 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0058] 본원에서 사용된 바와 같이, "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 프레임워크 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄의 일부를 지칭한다. V_H는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. V_L은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다. 본 발명에서 사용되는 방법에 따라, CDR 및 FR에 대해 지정된 아미노산 위치는 카바트 (문헌 [Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 및 1991)])에 따라 규정될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노산 넘버링 역시 카바트에 따른다.

[0059] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)은 항원 결합에 필요한 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 확인되는 3개의 CDR 영역을 갖는다. 각각의 상보성 결정 영역은 카바트에 의해 규정된 바와 같은 "상보성 결정 영역"의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인 내의 대략 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 대략 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "초가변 루프"의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인 내의 대략 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 대략 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상보성 결정 영역은 카바트에 따라 규정된 CDR 영역 및 초가변 루프 둘 다로부터의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 4D5의 중쇄의 CDRH1은 아미노산 26 내지 35를 포함한다.

[0060] "프레임워크 영역" (이하, FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 확인되는 4개의 FR을 갖는다. CDR이 카바트에 따라 정의되는 경우, 경쇄 FR 잔기는 대략 잔기 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) 및 98-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 대략 잔기 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) 및 103-113 (HCFR4)에 위치한다. CDR이 초가변 루프의 아미노산 잔기를 포함하는 경우, 경쇄 FR 잔기는 경쇄에서 대략 잔기 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) 및 97-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 대략 잔기 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) 및 102-113 (HCFR4)에 위치한다. 일부 경우에, CDR이 카바트에 의해 정의된 바와 같은 CDR의 아미노산과 초가변 루프의 아미노산 둘 다를 포함하는 경우에는 FR 잔기가 그에 따라 조정될 것이다. 예를 들어, CDRH1이 아미노산 H26-H35를 포함하는 경우, 중쇄 FR1 잔기는 위치 1 내지 25에 존재하고 FR2 잔기는 위치 36 내지 49에 존재한다.

[0061] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인 및 중쇄의 가변 도메인 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 한 쌍의 Fab 단편 사이에서 이들의 카르복시 말단 근처에서 힌지 시스테인에 의해 일반적으로 공유 연결된 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링 또한 당업계에 공지되어 있다.

[0062] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재하는, 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L

도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0063] 용어 "디아바디"는 동일 폴리펩티드 쇄 (V_H 및 V_L)로 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭한다. 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0064] 표현 "선형 항체"는 문헌 [Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 지칭한다. 간략하게 설명하면, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 병렬식 Fd 절편 (V_H-C_H1-V_H-C_H1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0065] 구체적으로, 본원에서의 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린) 뿐만 아니라, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]).

[0066] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 치환한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0067] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선별되며, 이 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다 (문헌 [Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314 (1996)]: [Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998)]; [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]). 인간 항체는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물, 예를 들어 마우스에 도입시켜 제조될 수도 있다. 시험접종시에, 인간 항체 생성이 관찰되고, 이것은 유전자 재배열, 조립 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 면에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이러한 접근법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 및 하기 학술 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다. 별법적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대해 지시된 항체를 생성하는 인간 B 림프구를 불멸화시킴으로써 제조될 수 있다 (이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수도 있고, 또는 시험관내 면역화되었을 수도 있음). 예를 들어, 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)]; 및 미국 특허 번호

5,750,373을 참조한다.

[0068] "친화성 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시키는, 1개 이상의 CDR에 1개 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화성 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링에 의한 친화성 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0069] 항체의 "기능적 항원 결합 부위"는 표적 항원과 결합할 수 있는 부위이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 항원 결합 부위가 유래된 모 항체만큼 강력할 필요는 없지만, 항원에 결합하는 능력은 항원에 대한 항체 결합을 평가하는 것과 관련하여 공지된 다양한 방법 중 임의의 하나로 측정가능해야 한다. 추가로, 본원에서의 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화성이 정량적으로 동일할 필요는 없다. 본원에서의 다량체 항체의 경우, 기능적 항원 결합 부위의 수는 미국 특허 출원 공개공보 번호 20050186208의 실시예 2에 기재된 바와 같은 초원심분리 분석을 이용하여 평가할 수 있다. 이러한 분석 방법에 따라, 다량체 항체에 대한 표적 항원의 상이한 비율을 조합하고, 기능적 결합 부위의 상이한 수를 추정하여 복합체의 평균 분자량을 계산한다. 이러한 이론적 값을 수득된 실제 실험 값과 비교하여 기능적 결합 부위의 수를 평가한다.

[0070] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 갖는 항체는 이러한 항체를 동일 항원에 결합하는 다른 항체와 구별시켜 주는, 항체의 하나 이상의 생물학적 특징을 보유하는 항체이다.

[0071] 관심 항체가 결합하는 항원상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상의 교차-차단 검정, 예컨대 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수행할 수 있다.

[0072] "종-의존성 항체"는 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화성이 제2 포유동물 종으로부터의 상기 항원의 상동체에 대한 결합 친화성보다 더 강력한 항체이다. 통상적으로, 종-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (즉, 결합 친화성 (K_d) 값이 약 $1x10^{-7}$ M 이하, 바람직하게는 약 $1x10^{-8}$ M 이하, 가장 바람직하게는 약 $1x10^{-9}$ M 이하)하지만, 제2의 비-인간 포유동물 종으로부터의 상기 항원의 상동체에 대한 결합 친화성은 인간 항원에 대한 결합 친화성보다 적어도 약 50배 또는 적어도 약 500배 또는 적어도 약 1,000배 더 약하다. 종-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 전형적으로는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "항체 돌연변이체" 또는 "항체 변이체"는 종-의존성 항체의 1개 이상의 아미노산 잔기를 변형시킨, 종-의존성 항체의 아미노산 서열 변이체를 지칭한다. 이러한 돌연변이체는 종-의존성 항체와 반드시 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 가져야 한다. 한 실시양태에서, 항체 돌연변이체는 종-의존성 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다. 본원에서, 이러한 서열과 관련된 동일성 또는 유사성은 서열을 정렬하고 필요한 경우에는 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위한 갭(gap)을 도입한 후에 종-의존성 항체 잔기와 동일 (즉, 동일 잔기) 또는 유사한 (즉, 공통적인 측쇄 특성을 기초로 할 때 동일 군으로부터의 아미노산 잔기, 이하 참조) 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 가변 도메인에 속하지 않는 항체 서열에서의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0074] 본 발명의 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 샐비지 수용체 결합 에피토프를 코딩하는 핵산 분자를 본 발명의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산과 프레임에 맞게 연결시켜서, 조작된 핵산 분자에 의해 발현된 융합 단백질이 샐비지 수용체 결합 에피토프 및 본 발명의 폴리펩티드 서열을 포함하게 할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie et al., Ann.

Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)], 표 1). 그의 Fc 영역 내에 치환이 존재하는 항체 및 증가된 혈청 반감기가 또한 WO00/42072, WO 02/060919; 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)]; [Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)]에 기재되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 혈청 반감기는 또한 예를 들어 다른 폴리펩티드 서열을 부착시켜 증가될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 유용한 항체 또는 기타 폴리펩티드를 FcRn 수용체에 결합하는 혈청 알부민 또는 혈청 알부민의 일부, 또는 혈청 알부민 결합 펩티드에 부착시켜서 혈청 알부민이 이러한 항체 또는 폴리펩티드와 결합되도록 할 수 있고, 예를 들어 이러한 폴리펩티드 서열은 WO 01/45746에 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 부착될 혈청 알부민 펩티드는 아미노산 서열 DICLPRWGCLW를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fab의 반감기는 이들 방법에 의해 증가된다. 또한, 혈청 알부민 결합 펩티드 서열에 대해서는 문헌 [Dennis et al., J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)]을 참조한다.

[0075] "키메라 VEGF 수용체 단백질"은 적어도 2종의 상이한 단백질로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 VEGF 수용체 분자인데, 이중의 적어도 하나는 VEGF 수용체 단백질로서 존재한다. 특정 실시양태에서, 키메라 VEGF 수용체 단백질은 VEGF와 결합하여 그의 생물학적 활성을 억제할 수 있다.

[0076] "단리된" 항체는 자연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 항체이다. 이의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시퀴네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균일한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0077] "단편"은 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩티드 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상을 함유하는 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600개 이상의 뉴클레오티드, 또는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200개 이상의 아미노산을 함유할 수 있다.

[0078] "항혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 혈관형성, 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접적으로 또는 간접적으로 억제하는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 항혈관신생제는 혈관신생 인자 또는 그의 수용체에 결합하고 이것의 혈관신생 활성을 차단하는 작용제를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어 VEGF-A 또는 VEGF-A 수용체 (예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, 항-PDGFR 억제제, 예컨대 글리벡(Gleevec)™ (이마티닙 메실레이트)이다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991)]; [Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관신생 요법을 열거한 표 3)]; [Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5:1359-1364 (1999)]; [Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (예를 들어, 공지된 혈관신생 인자를 열거한 표 2)]; 및 [Sato. Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (예를 들어, 임상 시험에 사용된 항혈관신생제를 열거한 표 1)]을 참조한다.

[0079] "부하 용량"은 본원에서 일반적으로 환자에게 투여되는 치료제의 초기 용량을 포함하고, 그의 하나 이상의 유지 용량(들)이 후속적으로 투여된다. 일반적으로, 단일 부하 용량이 투여되지만, 다중 부하 용량이 본원에서 고려된다. 대체로, 투여된 부하 용량(들)의 양은 투여되는 유지 용량(들)의 양을 초과하고/하거나, 부하 용량(들)은 유지 용량(들)보다 더 자주 투여되어, 유지 용량(들)으로 달성될 수 있는 것보다 더 일찍 치료제의 목적하는 항정 (steady-state) 농도를 달성할 수 있다.

[0080] 본원에서의 "유지" 용량은 치료 기간에 걸쳐서 또는 치료 기간 이후에 대상체에게 투여되는 치료제의 1회 이상의 용량을 지칭한다. 통상적으로, 유지 용량은 치료 시간 간격을 두고 투여되며, 예컨대 대략 매주, 대략 2주마다, 대략 3주마다, 또는 대략 4주마다 투여된다.

[0081] "수술가능한" 암은 원발성 장기로 한정되고 외과수술에 적합한 암을 지칭한다.

[0082] "생존"은 환자가 살아서 존재하는 것을 지칭하며, 무병 생존 (DFS) 및 전체 생존 (OS)을 포함한다. 생존은

카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법으로 추정할 수 있고, 생존에서의 임의의 차이는 계층화된 로그 순위 시험에 의해 전산화된다.

[0083] "무병 생존 (DFS)"은 환자가 치료 개시 또는 초기 진단으로부터 규정된 기간 동안, 예컨대 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 10년 등 동안 암의 재발 없이 살아서 존재하는 것을 지칭한다. 본 발명의 한 측면에서, DFS는 치료 의향(intent-to-treat) 원칙에 따라서 분석되며, 즉, 환자를 그의 정해진 요법을 기초로 평가한다. DFS의 분석에 사용되는 사건은 암의 국소, 국부 및 원위 재발, 2차 암의 발생, 및 선행 사건 (예를 들어, 결장직장암 재발 또는 제2 원발성 암) 없이 임의의 원인으로 인한 환자의 사망을 포함할 수 있다.

[0084] "전체 생존"은 환자가 치료 개시 또는 초기 진단으로부터 규정된 기간 동안, 예컨대 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 10년 등 동안 살아서 존재하는 것을 지칭한다. 본 발명의 기초가 되는 연구에서, 생존 분석을 위해 사용된 사건은 임의의 원인으로 인한 사망이었다.

[0085] "생존을 연장시키는 것" 또는 "생존 가능성을 증가시키는 것"이란, DFS 및/또는 OS를 증가시키는 것, 또는 비치료 환자와 비교하여 (즉, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체에 의해 치료받지 않은 환자와 비교하여) 또는 대조군 치료 프로토콜, 예컨대 결장직장암의 표준 치료에 사용되는 것, 예를 들어 류코보린, 5-플루오로우라실, 옥살리플라틴, 이리노테칸 또는 이들의 조합물과 같은 화학요법제 단독에 의한 치료와 비교하여 치료받은 환자에서 당해 시점에서의 살아서 존재할 확률 및/또는 무병 확률을 증가시키는 것을 의미한다. 생존은 치료 개시 후 또는 초기 진단 후 적어도 약 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 또는 적어도 약 1년, 또는 적어도 약 2년, 또는 적어도 약 3년, 또는 적어도 약 4년, 또는 적어도 약 5년, 또는 적어도 약 10년 등 동안 모니터링된다.

[0086] 생존 분석에 있어서의 "위험비"는 후속 기간 전반에 걸쳐 대조군과 비교한 치료 시의 사망 위험의 감소를 나타내는 2개의 생존 곡선 간의 차이에 관한 요약이다. 위험비는 증상 발생율에 대한 통계적 정의이다. 본 발명의 목적상, 위험비는 임의의 특정 시점에서 실험군에서의 사건 확률을 대조군에서의 사건 확률로 나눈 것으로 정의된다.

[0087] 본원에서, 용어 "동시에"는 투여의 적어도 일부가 시간상 중첩되는, 2종 이상의 치료제의 투여를 지칭하는데 사용된다. 따라서, 동시 투여는 1종 이상의 다른 작용제(들)을 불연속적으로 투여한 후에 연속하여 1종 이상의 작용제(들)을 투여하는 경우의 투약법을 포함한다.

[0088] "단독요법"은 치료 기간 동안 암 또는 종양을 치료하기 위해서 오직 단일의 치료제만을 포함하는 치료 요법을 의미한다. VEGF-특이적 길항제를 사용한 단독요법은 VEGF-특이적 길항제가 치료 기간 동안 추가의 항암 요법 없이 투여되는 것을 의미한다.

[0089] 본원에서 "아주반트 요법"은 결정적 외과수술 이후에 제공되는 요법을 지칭하며, 그 이후 질환이 잔류한다는 어떤 증거도 검출되지 않아 국소적으로 또는 전이되어 질환이 재발될 위험을 감소시킨다. 아주반트 요법의 목표는 암의 재발을 방지 또는 지연시켜, 암 관련 사망 위험을 감소시키는 것이다.

[0090] "유지 요법"이란 초기 치료적 개입의 유익한 결과 이후에 질환 재발 또는 진행 가능성을 감소시키기 위해 제공되는 치료 요법을 의미한다. 유지 요법은 최대로는 대상체의 수명까지 연장된 기간을 포함하는 임의의 길이의 시간 동안 제공될 수 있다. 유지 요법은 초기 요법 후에 제공될 수도 있고, 또는 초기 또는 추가의 요법과 연계해서 제공될 수도 있다. 유지 요법에 사용되는 투여량은 다양할 수 있고, 다른 유형의 요법에 사용되는 투여량과 비교할 때 감소된 투여량을 포함할 수 있다.

[0091] 본원에서, "표준 치료" 화학요법은 특정 암 치료를 위해 통상적으로 사용되는 화학요법제를 지칭한다.

[0092] "결정적 외과수술"은 의료 공동체 내에서 사용되는 용어와 같은 의미로 사용되며, 전형적으로 결과가 잠재적으로 치료력이 있는 것인 외과수술을 지칭한다. 결정적 외과수술은 예를 들어 종양을 제거 또는 절제하는 수술적 또는 다른 방식의 절차, 예를 들어 전체적으로 가시적인 모든 종양을 제거 또는 절제하는 절차를 포함한다. 결정적 외과수술은 예를 들어 종양의 완전한 또는 치유력 있는 절제 또는 완전한 육안 절제를 포함한다. 결정적 외과수술은 1개 이상의 단계로 수행되는 절차를 포함하고, 예를 들어 종양 절제 전에 하나 이상의 수술 또는 기타 절차가 수행되는 다단계 수술적 절차를 포함한다. 결정적 외과수술은 관련 장기, 장기의 일부 및 조직, 및 또한 주변 장기, 예컨대 림프절, 장기의 일부 또는 조직을 포함하는 종양을 제거하거나 절제하는 절차를 포함한다.

[0093] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 이것의 정의에는 양성 및 악성 암 및 또한 휴면 종양 또는 미세전이가 포함된다. 암의 예는

암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평 세포 암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종 포함), 복막암, 간세포성 암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 유형의 두경부암, 뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 소 림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 소 비-분할 세포 NHL; 거대 종양 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수모구성 백혈병; 및 이식 후 림프구증식성 장애 (PTLD) 뿐만 아니라 모반증과 연관된 비정상적 혈관 증식, 부종 (예를 들어, 뇌 종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0094] "전이"는 암이 그의 원발성 부위로부터 신체 내 다른 부위로 확산되는 것을 의미한다. 암 세포는 원발성 종양으로부터 분리되어, 림프관 및 혈관 내로 침투하고, 혈류를 통하여 순환하여 신체 내 그 밖의 정상 조직의 원위 중심에서 성장 (전이)할 수 있다. 전이는 국소 또는 원위일 수 있다. 전이는 원발성 종양으로부터 분리된 종양 세포에 우발적으로 발생하고 혈류를 통해 이동하여 원위 부위에서 중단되는 순차적 과정으로 여겨진다. 이러한 새로운 부위에서 상기 세포는 혈류 공급을 확립시키고 성장하여 생명을 위협하는 종괴를 형성할 수 있다. 종양 세포 내에서의 자극성 분자 경로와 억제성 분자 경로 모두가 이러한 거동을 조절하고, 종양 세포와 원위 부위의 숙주 세포 사이의 상호 작용이 또한 유의하다.

[0095] "미세전이"는 적은 수의 세포가 원발성 종양으로부터 기타 신체 부위로 확산되는 것을 의미한다. 미세전이는 스크리닝 또는 진단 시험에서 검출될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0096] 본원에서의 "암 재발"은 치료 후 암이 다시 생기는 것을 지칭하고, 원발성 장기에서 암이 다시 생기는 것 및 또한 암이 원발성 장기를 벗어나 다시 생기는 원위 재발을 포함한다.

[0097] "암 재발 위험이 큰" 대상체란 암이 재발할 가능성이 보다 큰 대상체이다. 예를 들어, 비교적 젊은 대상체 (예를 들어, 약 50 세 미만), 양성 림프절, 특히 4개 이상의 전이 림프절 (4-9개의 전이 림프절, 및 10개 이상의 전이 림프절 포함)을 가진 대상체, 및 예를 들어 유방암 환자에서 직경이 2 ㎝를 초과하는 종양을 가진 대상체. 대상체의 위험 수준은 숙련된 의사가 판단할 수 있다. 일반적으로, 이같은 고위험 대상체는 림프절 전이를 가질 것이지만 (예를 들어 4개 이상의 전이 림프절); 림프절 전이가 없는 대상체도 예를 들어 그의 종양이 2 ㎝ 이상인 경우에는 역시 위험도가 높다.

[0098] "암 재발 위험을 감소시킨다"란, 비치료 환자와 비교하여 (즉, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체에 의해 치료받지 않은 환자와 비교하여) 또는 대조군 치료 프로토콜, 예컨대 결장직장암의 표준 치료에 사용되는 것, 예를 들어 류코보린, 5-플루오로우라실, 옥살리플라틴, 이리노테칸 또는 이들의 조합물과 같은 화학요법제 단독에 의한 치료와 비교하여 암의 재발 가능성을 감소시키는 것을 의미한다. 암 재발은 치료 개시 후 또는 초기 진단 후 적어도 약 2개월, 4개월, 6개월, 9개월, 또는 적어도 약 1년, 또는 적어도 약 2년, 또는 적어도 약 3년, 또는 적어도 약 4년, 또는 적어도 약 5년, 또는 적어도 약 10년 등 동안 모니터링된다.

[0099] "치료 개시"는 종양을 외과적으로 제거한 후 치료 요법을 시작하는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, 이는 외과수술 이후에 하나 이상의 화학요법제를 투여하는 것을 지칭할 수 있다. 별법적으로, 이는 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체, 및 하나 이상의 화학요법제를 초기 투여하는 것을 지칭할 수 있다.

[0100] 본원에서 암을 "치유하는 것" 이란, 종양의 유형에 따라 아주반트 요법을 시작한 후 약 2, 3, 4 또는 약 5 년이 되는 시점에 암 재발이 없는 것을 의미한다.

[0101] 본원에서 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성 또는 양성 여부와 상관 없음), 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다.

[0102] "종양 휴면"은 종양 세포가 존재하긴 하지만 종양 진행이 임상적으로 나타나지 않는 연장된 휴지기 상태를 의미한다. 휴면 종양은 스크리닝 또는 진단 시험에서 검출될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0103] "대상체"는 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유동물을 의미한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다. 환자 역시 본원에서의 대상체이다.

[0104] 대상체의 "집단"은 임상 시험에서의 암 대상체 그룹을 지칭하거나, 또는 암 아주반트 요법과 같은 특정 적응

증에 대한 승인, 예를 들어 FDA 승인 이후에 종양학자에 의해 관찰되는 암 대상체 그룹을 지칭한다.

[0105] 용어 "항암 요법"은 암 치료에 유용한 요법을 나타낸다. 항암 치료제의 예는 예를 들어 외과수술, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아폽토시스성 작용제, 항-튜불린제, 및 암 치료를 위한 기타 작용제, 예컨대 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바(Tarceva)®)), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡™ (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토카인, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 표적 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 기타 생물활성 및 유기 화학적 작용제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 작용제의 2 이상의 조합도 역시 본 발명에 포함된다.

[0106] 본원에서 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 예를 들어 그의 단편 및/또는 변이체를 포함한다.

[0107] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이톡산(CYTOXAN)® 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸롤로멜라민을 비롯한 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 디네미신 A를 비롯한 디네미신; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진 소재); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토

신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 옹콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴 소재), 아브락산(ABRAXANE)® 크레모포르-무함유, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그 소재), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (론-프랑 롤러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니 소재); 클로란부실; 겜자르(GEMZAR)® 겜시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (캄프토사르(Camptosar), CPT-11) (이리노테칸과 5-FU 및 류코보린과의 치료 요법 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 치료 요법 (FOLFOX)을 비롯한 옥살리플라틴; PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바)®) 및 세포 증식을 저하시키는 VEGF-A의 억제제 및 상기 언급된 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0108] 또한, 상기 정의에는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조정자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어, 놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)·토레미펜; 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 또한 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로에서의 유전자 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 및 이들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0109] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 림포킨, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토카인에는 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 및 황체화 호르몬 (LH); 표피 성장 인자; 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 뮬러-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-알파; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마 콜로니 자극 인자 (CSF), 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예컨대 IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 기타 폴리펩티드 인자, 예를 들어 LIF 및 키트 리간드 (KL)가 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0110] "성장 억제제"가 본원에서 사용되는 경우, 이것은 세포의 성장을 시험관내 및/또는 생체내 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔(TAXOL)®, 및 토포 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신

을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로까지 이어질 수도 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p. 13]에서 찾아볼 수 있다.

[0111] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성이고, 효소에 의해 활성화되거나 전환되어 더욱 활성인 모 형태가 될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 본 발명의 전구약물은 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형된 전구약물, 글리코실화 전구약물, β-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신, 및 더욱 활성이고 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0112] "방사선 요법"은, 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴시키는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도시키기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 나타낸다. 당업계에는 투여량 및 치료의 지속시간을 결정하는 수많은 방법이 공지되어 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 1일 당 10 내지 200 단위 (그레이(Gray))의 범위이다.

[0113] "감소시거나 억제한다"란 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75%, 85%, 90%, 95% 이상의 전반적인 감소를 야기하는 능력을 나타낸다. 감소시키거나 억제한다는 것은 치료할 장애의 증상, 전이 또는 미세전이의 존재 또는 크기, 원발성 종양의 크기, 휴면 종양의 존재 또는 크기, 또는 혈관신생 장애에서 혈관의 크기 또는 수를 지칭할 수 있다.

[0114] 용어 "정맥내 주입"은 약물을 대략 5분 초과, 바람직하게는 대략 30 내지 90분의 시간에 걸쳐 동물 또는 인간 환자의 정맥으로 도입하는 것을 지칭하지만, 본 발명에 따르면 정맥내 주입은 이와 달리 10 시간 이하 동안 투여된다.

[0115] 용어 "정맥내 볼루스" 또는 "정맥내 푸시(push)"는 신체가 약물을 대략 15분 이하, 바람직하게는 5분 이하로 수용하도록 동물 또는 인간의 정맥 내로 약물을 투여하는 것을 지칭한다.

[0116] 용어 "피하 투여"는 약물 용기로부터 비교적 느린 속도의 지속적인 전달에 의해 동물 또는 인간 환자의 피부 아래쪽으로, 바람직하게는 피부와 기저 조직 사이의 포켓 내로 약물이 도입되는 것을 지칭한다. 포켓은 피부를 기저 조직으로부터 핀칭 또는 드로잉하여 생성될 수 있다.

[0117] 용어 "피하 주입"은 30분 이하 또는 90분 이하를 포함하지만 이에 제한되지 않는 기간의 시간 동안 약물 용기로부터 비교적 저속의 지속적인 전달에 의해 동물 또는 인간 환자의 피부 아래쪽으로, 바람직하게는 피부와 기저 조직 사이의 포켓 내로 약물이 도입되는 것을 지칭한다. 임의로, 주입은 동물 또는 인간 환자의 피부 아래쪽에 이식된 약물 전달 펌프의 피하 이식에 의해 이루어질 수 있는데, 이러한 펌프는 소정량의 약물을 소정 기간의 시간, 예컨대 30분, 90분, 또는 치료 기간의 길이에 걸친 기간 동안 전달한다.

[0118] 용어 "피하 볼루스"는 동물 또는 인간 환자의 피부 밑으로의 약물 투여를 지칭하고, 여기서 볼루스 약물 전달은 바람직하게는 대략 15분 미만, 보다 바람직하게는 5분 미만, 가장 바람직하게는 60초 미만이다. 투여는 바람직하게는 피부와 기저 조직 사이의 포켓 내에서 이루어지고, 포켓은 예를 들어 피부를 기저 조직으로부터 핀칭 또는 드로잉하여 생성된다.

[0119] "장애"는 항-VEGF 항체에 의한 치료로부터 이익을 얻게될 임의의 상태이다. 여기에는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 당해 장애에 걸리기 쉬운 병리 상태 포함)이 포함된다. 본원에서 치료할 장애의 비-제한적인 예는 암; 양성 및 악성 종양; 백혈병 및 림프양 악성종양; 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 기타 선상, 대식세포, 상피, 기질 및 포배강 장애; 및 염증성, 혈관신생 및 면역계 장애를 포함한다.

[0120] 용어 "치료 유효량"은 포유동물에서 질환 또는 장애의 치료에 효과적인 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우에, 치료 유효량의 약물은 암 세포의 수 감소, 종양 크기의 감소, 말초 장기로의 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느

정도 저속화되고 바람직하게는 멈추는 것), 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 저속화되고 바람직하게는 멈추는 것), 종양 성장의 어느 정도의 억제, 및/또는 장애와 관련이 있는 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감을 유도할 수 있다. 종양 휴면 또는 미세전이를 치료하기 위한 약물의 치료 유효량은 미세전이의 수 또는 증식을 감소시킬 수 있거나; 휴면 종양의 성장을 저하 또는 방지시킬 수 있거나; 또는 치료 또는 제거 후에 (예를 들어, 항암 요법, 예를 들어 수술, 방사선 요법 또는 화학요법을 이용함) 종양의 재발을 저하 또는 방지시킬 수 있다. 약물이 기존 암 세포의 성장을 예방하고/하거나 기존 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도라면, 이것은 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 무병 생존 (DFS), 질환 진행까지의 시간 (TTP), 무진행 생존 기간 (DFS), 반응률 (RR), 반응 기간, 차도 시간, 및/또는 삶의 질을 평가함으로써 측정할 수 있다. 유효량은 무병 생존 (DFS)을 개선시키고, 전체 생존 (OS)을 개선시키며, 재발 가능성을 감소시키고, 재발되기까지의 시간을 연장시키며, 원격 재발 (즉, 원발성 부위로부터 벗어난 재발)까지의 시간을 연장시키고, 암을 치유하며, 암 증상을 개선시키고 (예를 들어, 암 특이적 검사를 이용하여 판단된 바와 같음), 제2원발성 암의 출현을 감소시키는 등을 가능하게 한다.

[0121] "치료"는 치유적 치료, 및 예방적 또는 방지적 조치를 둘 다 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체에는 이미 장애를 가진 대상체 뿐만 아니라 암의 발생 또는 재발을 방지시키고자 하는 대상체를 비롯하여 장애를 방지하고자 하는 대상체가 포함된다.

[0122] 본원에서 사용된 "적극 치료"는 치료 약물이 환자에게 투여되고 있는 동안의 기간을 지칭한다. 예를 들어, 치료 약물이 1년 코스에 걸쳐 매 2주마다 환자에게 투여된 후 어떤 치료나 다른 요법도 이루어지지 않은 경우, 치료 약물을 이용한 적극 치료는 약물이 환자에 투여된 시간 동안인 1년 기간이다.

[0123] 본원에 사용된 경우의 용어 "표지"는 폴리펩티드와 직접적으로 또는 간접적으로 접합되는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체로 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변경을 촉매할 수도 있다.

[0124] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원 및 특허는, 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것과 동일한 범위로 본원에 참고로 포함된다.

[0125] **II. 항-VEGF 항체 및 길항제**

[0126] *(i) VEGF 항원*

[0127] 항체 생성에 사용될 VEGF 항원은, 예를 들어 $VEGF_{165}$ 분자 및 또한 원하는 에피토프를 함유하는 VEGF의 다른 이소형 또는 그의 단편일 수 있다. 본 발명의 항-VEGF 항체 생성에 유용한 다른 형태의 VEGF는 당업자에게 명백할 것이다.

[0128] 인간 VEGF는 소 VEGF cDNA를 혼성화 프로브로 사용하여 인간 세포로부터 제조된 cDNA 라이브러리를 처음 스크리닝하여 수득하였다. 문헌 [Leung et al., (1989) Science, 246:1306]. 이로써 확인된 cDNA 중 하나가 소 VEGF와 95% 초과의 상동성을 갖는 165-아미노산 단백질을 코딩하며, 이러한 165-아미노산 단백질은 전형적으로 인간 VEGF (hVEGF) 또는 $VEGF_{165}$라 지칭된다. 인간 VEGF의 유사분열촉진 활성은 포유동물 숙주 세포에서의 인간 VEGF cDNA 발현으로 확인되었다. 인간 VEGF cDNA로 형질감염된 세포에 의해 조건화된 배지는 모세관 내피 세포의 증식을 촉진시켰지만, 대조군 세포는 그렇지 않았다. 문헌 [Leung et al., (1989) Science, 상기 문헌].

[0129] 후속 치료 용도를 위해 혈관 내피 세포 성장 인자가 천연 공급원으로부터 단리 및 정제될 수 있었지만, 여포성 세포 내의 비교적 낮은 농도의 단백질 및 VEGF를 회수하는데 드는 노력과 비용 둘 모두의 면에서 높은 비용은 상업상 이용할 수 없는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 재조합 DNA 기술을 통해 VEGF를 클로닝하고 발현시키기 위한 추가의 노력이 있어왔다. (예를 들어, 문헌 [Ferrara, Laboratory Investigation 72:615-618 (1995)], 및 상기 문헌에서 언급된 참고문헌 참조).

[0130] VEGF는 여러 조직에서 대안적인 RNA 스플라이싱으로 인한 다양한 동종이량체 형태 (단량체 당 121, 145, 165, 189 및 206개 아미노산)로서 발현된다. $VEGF_{121}$은 헤파린과 결합하지 않는 가용성 유사분열촉진인자이고, VEGF가 보다 긴 형태를 가질 수록 점진적으로 더 높은 친화도로 헤파린과 결합한다. VEGF의 헤파린 결합 형태는 플라스민에 의해 카르복시 말단에서 절단되어 확산가능한 형태(들)의 VEGF를 방출시킬 수 있다. 플라스민 절단 후에 확인된 카르복시 말단 펩티드의 아미노산 서열분석은 Arg_{110}-Ala_{111}이다. 동종이량체로서 단리된

아미노 말단 "코어" 단백질인 VEGF (1-110)은 중화 모노클로날 항체 (예를 들어, 4.6.1 및 3.2E3.1.1이라 지칭되는 항체) 및 가용성 형태의 VEGF 수용체에 무손상 $VEGF_{165}$ 동종이량체와 유사한 친화도로 결합한다.

[0131] 또한, 태반 성장 인자 (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 및 VEGF-E를 비롯하여 VEGF와 구조적으로 관련이 있는 여러 분자가 최근 확인된 바 있다. 문헌 [Ferrara and Davis-Smyth (1987) Endocr. Rev., 상기 문헌]; [Ogawa et al., J. Biological Chem. 273:31273-31281(1998)]; [Meyer et al., EMBO J., 18:363-374(1999)]. 수용체 티로신 키나제, Flt-4 (VEGFR-3)는 VEGF-C 및 VEGF-D의 수용체로 확인되었다. 문헌 [Joukov et al., EMBO. J. 15:1751(1996)]; [Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992(1996)]; [Achen et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553]. VEGF-C는 림프 혈관신생을 조절하는데 관여하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Jeltsch et al., Science 276:1423-1425(1997)].

[0132] 2종의 VEGF 수용체 Flt-1 (또한 VEGFR-1이라고도 칭함) 및 KDR (또한 VEGFR-2라고도 칭함)이 확인되었다. 문헌 [Shibuya et al., (1990) Oncogene 8:519-527]; [de Vries et al., (1992) Science 255:989-991]; [Terman et al., (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1579-1586]. 뉴로필린-1은 헤파린-결합 VEGF 이소형에 결합할 수 있는 선택적 VEGF 수용체인 것으로 확인되었다 (문헌 [Soker et al., (1998) Cell 92:735-45]). Flt-I 및 KDR 둘 다 수용체 티로신 키나제 (RTK) 패밀리에 속한다. RTK는 다양한 생물학적 활성을 갖는 막횡단 수용체의 거대 패밀리를 포함한다. 현재, 적어도 열아홉 (19) 종의 별개의 RTK 하위패밀리가 확인되어 있다. 수용체 티로신 키나제 (RTK) 패밀리는 다양한 세포 유형의 성장 및 분화에 중요한 수용체를 포함한다 (문헌 [Yarden and Ullrich (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:433-478]; [Ullrich and Schlessinger (1990) Cell 61:243-254]). RTK의 내재적 기능은 수용체 및 여러 세포 기질의 인산화 및 이후 다양한 세포 반응을 야기하는 리간드 결합시에 활성화된다 (문헌 [Ullrich & Schlessinger (1990) Cell 61:203-212]). 따라서, 수용체 티로신 키나제 매개된 신호 도입은 특정 성장 인자 (리간드)와의 세포외 상호작용으로 개시되고, 전형적으로는 이후에 수용체 이량체화, 내재적 단백질 티로신 키나제 활성의 자극 및 수용체 인산 전달이 일어난다. 이에 따라 세포내 신호 도입 분자를 위한 결합 부위가 생성되고, 적절한 세포 반응 (예를 들어, 세포 분열, 분화, 대사 효과, 세포외 미소환경의 변화)을 용이하게 하는 세포질 신호전달 분자의 스펙트럼을 갖는 복합체가 형성된다. 문헌 [Schlessinger and Ullrich (1992) Neuron 9:1-20]을 참조한다. 구조적으로, Flt-1 및 KDR 둘 다 세포외 도메인의 7개 이뮤노글로불린-유사 도메인, 단일 막횡단 영역, 및 키나제-삽입 도메인이 개재된 컨센서스 티로신 키나제 서열을 갖는다. 문헌 [Matthews et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9026-9030]; [Terman et al., (1991) Oncogene 6:1677-1683].

[0133] *(ii) 항-VEGF 항체*

[0134] 본 발명의 방법에 유용한 항-VEGF 항체는 VEGF에 충분한 친화성 및 특이성으로 결합하고 VEGF의 생물학적 활성을 감소 또는 억제시킬 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 통상적으로, 항-VEGF 항체는 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B 또는 VEGF-C에도 결합하지 않을 것이고, 다른 성장 인자, 예컨대 PlGF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다.

[0135] 본 발명의 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체; 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 "rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴®"이라고도 공지된 "베바시주맙 (BV)"이다. 이것은 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF의 그의 수용체에 대한 결합을 차단하는 뮤린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 베바시주맙의 아미노산 서열의 대략 93% (대부분의 프레임워크 영역 포함)는 인간 IgG1로부터 유래되고, 서열의 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래된다.

[0136] 베바시주맙 및 다른 인간화 항-VEGF 항체는 2005년 2월 26일자로 허여된 미국 특허 번호 6,884,879에 추가로 기재되어 있다. 추가의 항체에는 PCT 공보 번호 WO2005/012359, PCT 공보 번호 WO2005/044853, 및 US 특허 출원 60/991,302에 기재되어 있는 바와 같은 G6 또는 B20 시리즈 항체 (예를 들어, G6-31, B20-4.1)가 포함되며, 이들 특허 출원의 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함된다. 추가의 항체에 대해서는, 미국 특허 번호 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020; 6,054,297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 공개공보 번호 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, 및 20050112126; 및 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]을 참조한다. 그 밖의 항체에는 잔기 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, 및 C104를 포함하거나, 또는 별법적으로 잔기

F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 및 Q89를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합하는 것이 포함된다.

[0137] 본 발명의 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0138] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (서열 1)

[0139] 및 하기 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0140] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR (서열 2)

[0141] 을 포함한다.

[0142] 본 발명에 따른 "G6 시리즈 항체"는 PCT 공보 번호 WO2005/012359 (이것의 전체 개시내용은 본원에 명백하게 참고로 포함됨)의 도 7, 24-26 및 34-35 중 어느 하나에 따른 G6 항체 또는 G6-유래 항체의 서열로부터 유래된 항-VEGF 항체이다. 또한, PCT 공보 번호 WO2005/044853 (이것의 전체 개시내용은 본원에 명백하게 참고로 포함됨)을 참조한다. 한 실시양태에서, G6 시리즈 항체는 잔기 F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 및 Q89를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합한다.

[0143] 본 발명에 따른 "B20 시리즈 항체"는 PCT 공보 번호 WO2005/012359 (이것의 전체 개시내용은 본원에 명백하게 참고로 포함됨)의 도 27-29 중 어느 하나에 따른 B20 항체 또는 B20-유래 항체의 서열로부터 유래된 항-VEGF 항체이다. 또한, PCT 공보 번호 WO2005/044853, 및 US 특허 출원 60/991,302 (이들 특허 출원의 내용은 본원에 명백하게 참고로 포함됨)를 참조한다. 한 실시양태에서, B20 시리즈 항체는 잔기 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 및 C104를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합한다.

[0144] 본 발명에 따른 "기능적 에피토프"는 항체의 결합에 강력하게 기여하는 항원의 아미노산 잔기를 지칭한다. 이와 같이 강력하게 기여하는 항원 잔기 중 임의의 하나를 돌연변이시키면 (예를 들어, 알라닌에 의한 야생형 VEGF의 돌연변이 또는 동족체 돌연변이) 항체의 결합성이 파괴되어 항체의 상대적인 친화성 비율 (IC50돌연변이체 VEGF/IC50야생형 VEGF)은 5초과가 될 것이다 (WO 2005/012359의 실시예 2 참조). 한 실시양태에서, 상대적 친화성 비율은 용액 결합 파지 디스플레이 ELISA로 결정된다. 간략하게 설명하면, 96웰 맥시소르프 (Maxisorp) 이뮤노플레이트 (NUNC)를 4℃에서 PBS 중 2 ㎍/mL 농도의 시험할 항체의 Fab 형태로 밤새 코팅한 후에 2시간 동안 실온에서 PBS, 0.5% BSA 및 0.05% 트윈20 (PBT)으로 차단한다. PBT 중 hVEGF 알라닌 점돌연변이체 (잔기 8-109 형태) 또는 야생형 hVEGF (8-109)를 디스플레이하는 파지의 계열 희석물을 우선 실온에서 15분 동안 Fab-코팅된 플레이트에서 인큐베이션하고, 상기 플레이트를 PBS, 0.05% 트윈20 (PBST)으로 세척하였다. 결합된 파지는 PBT 중에서 1:5000으로 희석된 항-M13 모노클로날 항체 양고추냉이 퍼옥시다제 (아머샴 파마시아(Amersham Pharmacia)) 접합체로 검출하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB, 키르케가아드 및 페리 랩스(Kirkegaard & Perry Labs), 메릴랜드주 게이터스버그 소재) 기질로 대략 5분 동안 발색시키며, 1.0 M H3PO4로 켄칭시킨 후에 450 nm에서 분광광도계로 판독한다. IC50 값의 비율 (IC50,ala/IC50,wt)은 결합 친화성에 있어서의 감소 배수 (상대적 결합 친화성)를 나타낸다.

[0145] *(iii) VEGF 수용체 분자*

[0146] 가장 잘 특징규명된 2종의 VEGF 수용체는 VEGFR1 (또한, Flt-1이라고도 공지됨) 및 VEGFR2 (또한, KDR 및 FLK-1 (뮤린 동족체)이라고도 공지됨)이다. 각 VEGF 패밀리 구성원에 대한 각 수용체의 특이성은 다양하지만, VEGF-A는 Flt-1 및 KDR 둘 다에 결합한다. 전장 Flt-1 수용체는 7개의 Ig 도메인을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 티로신 키나제 활성을 지닌 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 VEGF의 결합에 관여하고, 세포내 도메인은 신호 전달에 관여한다.

[0147] VEGF에 특이적으로 결합하는 VEGF 수용체 분자 또는 그의 단편은, 본 발명의 방법에 사용하여 VEGF 단백질에 결합하고 이를 격리시킴으로써 이것의 신호전달을 저해할 수 있다. 특정 실시양태에서, VEGF 수용체 분자 또는 그의 VEGF 결합 단편은 가용성 형태, 예를 들어 sFlt-1이다. 가용성 형태의 수용체는 VEGF와 결합함으로써 VEGF 단백질의 생물학적 활성에 대한 억제 효과를 발휘하여 VEGF 단백질이 표적 세포 표면상에 존재하는 이것의 천연 수용체와 결합하는 것을 저해한다. 또한, VEGF 수용체 융합 단백질이 포함되는데, 이것의 예는 아래에 기재되어 있다.

[0148] 키메라 VEGF 수용체 단백질은 적어도 2종의 상이한 단백질로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 수용체 분자로서, 이중 적어도 1종은 VEGF와 결합하여 그의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 VEGF 수용체 단백질 (예를 들어, flt-1 또는 KDR 수용체)이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 키메라 VEGF 수용체 단백질은 오직 2종의 상이한 VEGF 수용체 분자로부터 유래된 아미노산 서열로 이루어지지만, flt-1 및/또는 KDR 수용체의 세포외 리간드 결합 영역으로부터의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 모든 Ig-유사 도메인을 포함하는 아미노산 서열이 다른 무관한 단백질로부터의 아미노산 서열, 예를 들어 이뮤노글로불린 서열에 연결될 수 있다. Ig-유사 도메인과 조합되는 다른 아미노산 서열은 당업자에게 매우 명백할 것이다. 키메라 VEGF 수용체 단백질의 예에는, 예를 들어 가용성 Flt-1/Fc, KDR/Fc, 또는 FLt-1/KDR/Fc (VEGF 트랩으로서 공지되기도 함)이 포함된다. (예를 들어, PCT 출원 공보 번호 WO97/44453 참조).

[0149] 본 발명의 가용성 VEGF 수용체 단백질 또는 키메라 VEGF 수용체 단백질은 막횡단 도메인을 통해 세포의 표면에 고정되지 않는 VEGF 수용체 단백질을 포함한다. 가용성 형태의 VEGF 수용체, 예를 들어 키메라 수용체 단백질은 그 자체로 VEGF와 결합하여 이것을 불활성화시키면서도 막횡단 도메인을 포함하지 않기 때문에 일반적으로는 해당 분자가 발현되는 세포의 세포막과 결합되지 않는다.

[0150] **III. 치료 용도**

[0151] 본 발병은 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 대상체에게 1년을 초과하여 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비전이성 결장직장암을 갖는다. 본 방법의 일부 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제는 결정적 외과수술 이후에 투여된다. 본원에서 치료하고자 하는 대상체는 일반적으로 암 재발 위험이 있다.

[0152] 일부 실시양태에서, 아주반트 요법의 방법은 환자의 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 연장시킨다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 또한, 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 환자는 결정적 외과수술 이후에 VEGF-특이적 길항제를 투여받는다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 계속된다.

[0153] 본 발명은 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하여 환자에서 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제는 1년을 초과하여 투여한다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 또한, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는 아주반트 요법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 계속된다.

[0154] 본 발명은 추가로 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하여 환자에서 DFS 또는 OS를 연장시키는 것을 포함하는, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이때 VEGF-특이적 길항제는 1년을 초과하여 투여된다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 또한, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량

의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하는 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 진행은 방지 또는 지연되고, 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 진행은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 본 발명은 추가로, 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제를 포함하는 아주반트 요법을 투여하는 것을 포함하는 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하는 방법을 제공하며, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료 동안 암의 재발은 방지 또는 지연되고, VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료는 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 암의 재발은 VEGF-특이적 길항제에 의한 적극 치료가 중단된 후 약 3, 4, 5 또는 6개월 동안 방지 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 치료를 개시한 후 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년 이상 동안 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0155] 예를 들어, 방법은: a) 각각의 사이클이 대상체에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙, 및 임의로 적어도 하나의 화학요법제를 예정된 간격으로 투여하는 것을 포함하는, 복수의 사이클을 포함하는 제1 단계; 및 b) 각각의 사이클이 대상체에게 유효량의 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙을 임의의 화학요법제 없이 예정된 간격으로 투여하는 것을 포함하는, 복수의 사이클을 포함하는 제2 단계를 포함할 수 있으며; 이때 제1 및 제2 단계의 조합은 최초 수술후 치료 이후에 적어도 1년 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 단계의 조합은 최초 수술후 치료 이후에 1년을 초과하여 지속된다. 일부 실시양태에서, 제2 단계는 최초 수술후 치료 이후에 1년을 초과하여, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년 또는 적어도 10년 동안 지속된다. 한 실시양태에서, 제1 단계는 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 베바시주맙, 및 제1 화학요법 섭생을 투여하는 제1의 복수의 치료 사이클, 및 이어서 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예컨대 베바시주맙, 및 제2 화학요법 섭생을 투여하는 제2의 복수의 치료 사이클을 포함한다.

[0156] 한 예에서, 상기 방법은 12 사이클 (6 개월) 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 (제1일에 옥살리플라틴 (85 mg/m^2)와 동시에 류코보린 (400 mg/m^2) 및 5-FU (400 mg/m^2 IV 볼루스) 및 제1일 및 제2일의 46시간에 걸쳐 5-FU (2400 mg/m^2))를 투여하는 것에 더하여, 각 화학요법 사이클의 제1일에 옥사플라틴 이전에 베바시주맙 (5 mg/kg IV)을 1년 이상 동안 q 14일로 투여하는 것을 포함한다.

[0157] 한 가지 투여 스케줄에서, 본 발명의 아주반트 요법은 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체와 한 가지 이상의 화학요법제를 복수 개의 치료 사이클로 환자에게 투여하는 제1 단계; 및 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 복수 개의 유지 사이클에서 단일 작용제로서 사용하는 제2 단계를 포함한다. 각 치료 사이클은 특정한 치료 계획에 따라서 1 내지 3주로 이루어진다. 예를 들어, 치료 사이클에는 VEGF-특이적 길항제로서의 베바시주맙이 포함될 수 있고, 3주일 수 있는데, 이는 환자에게 1회 용량의 화학요법과 1회 용량의 베바시주맙을 3주마다 투여하는 것을 의미한다. 치료 사이클은 2주일 수도 있는데, 이는 환자에게 1회 용량의 화학요법과 1회 용량의 베바시주맙을 격주로 투여하는 것을 의미한다. 치료의 전체 제1 단계는 약 4-12 사이클 동안 지속될 수 있다. 제2의 유지 단계 동안에는, 특정 사이클 길이에 따라서 총 약 10-50 사이클 동안 베바시주맙을 2주 또는 3주마다 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 아주반트 요법은 치료 개시 (예를 들어, 최초 수술후 치료)로부터 적어도 1년 동안 지속되고, 이 시점 이후에 대상체의 진행 상태를 추적할 것이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체 아주반트 요법은 최초 치료로부터 1년을 초과하여, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년 또는 적어도 10년, 또는 사망시까지 지속된다.

[0158] 질병의 유형 및 중증도에 따라서, 항-VEGF 항체의 바람직한 투여량은 약 1 ㎍/kg 내지 약 50 mg/kg, 가장 바람직하게 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 예를 들어 7.5 mg/kg 또는 10 mg/kg을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아닌 범위이다. 일부 측면에서, 화학요법 방식은 전통적인 고-용량 간헐적 투여를 포함한다. 일부 다른 측면에서, 화학요법제는 예정된 중단없이 보다 적은 용량을 보다 자주 투여한다 ("메트로놈 화학요법"). 본 발명의 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0159] 항체 및 화학요법의 투여는 화학요법 (예를 들어 류코보린, 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸 또는 이들의 조합) 만으로 치료받은 대상체와 비교하여 암 환자에서 질환의 재발 (원발성 장기에서의 암 재발 및/또는 원위 재발)의 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0160] 한 측면에서, 본 발명은 결정적 외과수술 이후의 암 환자에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하여 환자의 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 연장시키는 것을 포함하는 아주반트 요법의 방법을 제공한다. DFS 또는

OS는 치료를 개시한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 일부 실시양태에서, DFS 또는 OS는 치료를 개시하고 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 본 발명은 또한 환자에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암 재발을 방지하는 방법을 제공하며, 항-VEGF 항체를 투여하는 것은 암 재발을 방지한다. 본 발명은 추가로, 환자에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암 재발의 가능성을 감소시키는 방법을 제공하며, 항-VEGF 항체를 투여하는 것은 암 재발 가능성을 감소시킨다. 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 상기 VEGF-특이적 길항제를 투여하는 것은 임상적으로 검출가능한 종양의 발생, 또는 그의 전이 가능성을 방지하거나 감소시킨다.

[0161] 아주반트 요법의 경우, VEGF-특이적 길항제는 종양 전이를 (예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 만큼) 감소 또는 억제하고/거나; 종양 성장 또는 종양 세포 증식을 감소 또는 억제하고/거나; 휴면 종양의 성장을 저해 또는 방지하고/거나; 미세전이의 성장 또는 증식을 저해 또는 방지하고/거나; 치료 또는 제거 이후 종양의 재성장을 저해 또는 방지하고/거나; 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화시키기 위한 양으로 또는 그러한 시간 동안 (예를 들어, 특정 치료 요법을 위한 시간에 걸쳐) 투여될 수 있다.

[0162] VEGF-특이적 길항제는 일반적으로, 대상체가 수술로부터 회복된 기간 후에 투여한다. 이러한 기간은 상처 치유 또는 수술 절개부의 치유에 필요한 기간, 상처가 벌어지는 위험을 감소시키는데 필요한 시간, 또는 대상체가 수술 전의 건강 수준과 본질적으로 유사하거나 그보다 더 양호한 건강 수준으로 회복되는데 필요한 기간을 포함할 수 있다. 결정적 외과수술의 완료와 VEGF-특이적 길항제의 제1 투여 사이의 기간에는 또한, 약물 면제에 필요한 기간이 포함될 수 있는데, 대상체는 치료 요법 사이에 소정의 기간을 요구하거나 요청한다. 일반적으로, 결정적 외과수술의 완료와 VEGF-특이적 길항제 요법의 개시 사이의 기간에는 1주 미만, 1주, 2주, 3주, 4주 (28일), 5주, 6주, 7주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년 이상이 포함될 수 있다. 한 실시양태에서, 결정적 외과수술과 VEGF-특이적 길항제 투여 사이의 기간은 2주 초과 1년 미만이다.

[0163] 한 예에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체는 무병 생존 (DFS) 또는 전체 생존 (OS)을 연장시키는데 효과적인 양으로 투여된다. DFS 또는 OS는 항체를 최초로 투여한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석될 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상체의 DFS 또는 OS는 치료를 개시하거나 또는 최초 진단한 지 약 3-5년, 약 4-5년, 또는 적어도 약 4, 또는 적어도 약 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다.

[0164] VEGF-특이적 길항제를 단일 작용제로서 투여할 수 있다. 본 발명은 또한 적어도 하나의 VEGF-특이적 길항제와 하나 이상의 추가의 항암 요법을 조합한 것의 사용을 특징으로 한다. 항암 요법의 예는 수술, 방사선 요법 (방사선요법), 생물요법, 면역요법, 화학요법, 또는 이들 요법의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 세포독성제, 항혈관신생제 및 항증식제는 VEGF-특이적 길항제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0165] 특정 측면에서, VEGF-특이적 길항제는 결정적 외과수술 후 결장직장암을 치료하기 위한 아주반트 요법용 하나 이상의 화학요법제와 함께 사용한다. 다양한 화학요법제가 본 발명의 조합 치료 방법에서 사용될 수 있다. 고려되는 예시적이고 비제한적인 화학요법제의 목록을 "정의" 섹션 하에 제공하거나 본원에서 기재한다.

[0166] 한 예에서, 본 발명은 VEGF-특이적 길항제를 한 가지 이상의 화학요법제와 함께 (예를 들어 칵테일) 사용하는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 암이 결장직장암인 경우, 화학요법제는 결장직장암에 특이적으로 사용되는 것일 수 있으며, 류코보린, 5-플루오로우라실, 옥살리플라틴, 이리노테칸 또는 이같은 화학요법제의 2종 이상의 조합을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 동시 투여 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성 작용제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 존재한다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 전문인이 경험적으로 결정하는 바에 따라 이용될 수 있다. 화학요법에 대한 제제 및 투여 스케줄은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)]에도 기재되어 있다. 화학요법제는 VEGF-특이적 길항제의 투여 이전 또는 이후에 투여될 수도 있고, 또는 VEGF-특이적 길항제와 동시에 투여될 수도 있다.

[0167] 조합 투여에는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하여 공동투여 또는 동시에 투여하는 것과, 어느 한 순서로 연속적으로 투여하는 것이 포함되는데, 임의로 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 그의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 존재한다. 따라서, 화학요법제는 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 투여하기에 앞서, 또는 투여 후에 투여할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 화학요법제를 1회 이상 투여하는 것과 VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체를 1회 이상 투여하는 것 사이의 시간은 바람직하게 대략 1개

월 이하, 가장 바람직하게 대략 3주, 2주 이하이다. 또 다른 한편, 화학요법제와 항-VEGF 항체는 환자에게 단일 제제 또는 별개의 제제로 동시에 투여한다. 화학요법제 (예를 들어 류코보린, 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸 또는 이들의 조합) 및 항-VEGF 항체 (예를 들어 베바시주맙)의 조합물에 의한 치료는 환자에게 상승작용적이거나, 또는 부가적인 치료학적 이점보다 더 큰 이점을 부여할 수 있다.

[0168] 화학요법제는 투여할 경우, 이에 대해 공지된 투여량으로 통상 투여하거나, 또는 임의로는 약물의 조합 작용 또는 항대사물 화학요법제의 투여에 기인한 음성 부작용 때문에 투여량을 감소시켜 투여한다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 진료의가 경험적으로 결정하는 바에 따라 이용될 수 있다.

[0169] 몇몇 기타 측면에서, 본 발명의 항-VEGF 항체와의 조합 종양 요법에 유용한 기타 치료제에는 종양 성장에 관여하는 기타 인자, 예컨대 EGFR, ErbB2 (Her2로서 공지되기도 함), ErbB3, ErbB4, 또는 TNF의 길항제가 포함된다. 때때로, 1종 이상의 시토카인을 환자에게 투여하는 것이 유익할 수도 있다. 바람직한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제와 공동 투여된다. 예를 들어, 성장 억제제 또는 세포 독성제가 먼저 투여되고 이어서 항-VEGF 항체가 투여될 수 있다. 그러나, 항-VEGF 항체를 동시에 투여하거나 먼저 투여하는 것도 고려된다. 성장 억제제의 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이며, 성장 억제제 및 항-VEGF 항체의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 저하될 수 있다.

[0170] 본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 하나의 제제 중에 EGFR, VEGF (예를 들어, VEGF 상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체), VEGFR 또는 ErbB2 (예를 들어, 헤르셉틴®)에 결합하는 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 상기 조성물은 세포독성제, 시토카인, 성장 억제제 및/또는 소분자 VEGFR 길항제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0171] 특정 측면에서, 본 발명의 항체와의 병용 암 요법에 유용한 기타 치료제에는 기타 항혈관신생제가 포함된다. 많은 항혈관신생제가 당업계에서 확인되었고 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Carmeliet and Jain Nature 407(6801):249-57 (2000)]에 열거되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항-VEGF 항체는 또 다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGF 변이체, 가용성 VEGF 수용체 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단시킬 수 있는 압타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제의 저분자량 억제제, 및 이들의 임의의 조합물과 조합되어 사용된다. 별법적으로 또는 추가로, 2종 이상의 항-VEGF 항체가 대상체에게 공동 투여될 수 있다.

[0172] 아주반트 요법의 경우, VEGF-특이적 길항제의 적절한 투여량은 상기에서 정의한 바와 같이, 치료하고자 하는 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 VEGF-특이적 길항제에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 수 있다. VEGF-특이적 길항제는 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 기간 내내 적절히 투여할 수 있다. 조합 요법에서는, 본 발명의 VEGF-특이적 길항제 및 1종 이상의 항암 치료제는 치료 유효량 또는 치료적 상승작용량으로 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 치료 유효량은 VEGF-특이적 길항제 및 1종 이상의 다른 치료제의 공동 투여 또는 본 발명의 조성물의 투여로 인해 상기 기재된 바와 같이 암이 감소 또는 억제되는 양이다. 치료적으로 상승작용적인 양은 암 재발을 상승작용적으로 또는 현저하게 방지하는데 필요한 VEGF-특이적 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제의 양이다.

[0173] VEGF-특이적 길항제 및 1종 이상의 다른 치료제는 종양, 휴면 종양 또는 미세전이의 발생 또는 재발을 감소시키거나 없애는데 충분한 양으로 충분한 시간 동안 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. VEGF-특이적 길항제 및 1종 이상의 다른 치료제는 종양 재발의 가능성을 예방하거나 감소시키기 위한 유지 요법으로서 투여될 수 있다.

[0174] 당업자에게 이해되는 바와 같이, 화학요법제 또는 기타 항암제의 적절한 용량은 일반적으로 예를 들어 화학요법제가 단독으로 또는 다른 화학요법제와 조합하여 투여되는 임상 요법에서 이미 사용된 용량 정도일 것이다. 치료할 상태에 따라 투여량에서 변동이 발생할 것이다. 치료를 관리하는 전문의는 개개의 대상체에게 적절한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

[0175] 상기 치료 요법 이외에도, 환자에게 방사선 요법을 수행할 수 있다.

[0176] 특정 실시양태에서, 투여된 항-VEGF 항체는 무손상 네이키드 항체이다. 그러나, 항-VEGF 항체는 세포독성제와 접합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합된 항체 및/또는 이와 결합되는 항원은 세포에 의해 내재화되어, 이와 결합되는 암 세포를 사멸시키는 데에 있어서 접합체의 치료 효능을 증가시켜 제공하였다.

한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포 중의 핵산을 표적으로 하거나 이를 방해한다. 이러한 세포독성제의 예는 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클라아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 포함한다.

[0177] **IV. 투여량 및 지속기간**

[0178] VEGF-특이적 길항제 조성물은 양호한 의료 관행과 일치하는 방식으로 제제화되어 투여량에 따라 분배되고 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려해야 하는 요인에는 치료하고자 하는 특정한 장애, 치료하고자 하는 특정한 대상체, 개개 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의사에게 공지된 기타 요인들이 포함된다. 투여하고자 하는 VEGF-특이적 길항제의 "치료 유효량"은 이러한 고려 사항에 의해 좌우될 것이며, 이는 예를 들어, 네오아주반트 또는 아주반트 요법에서, 양성, 전암성 또는 조기 암을 예방, 개선, 치료 또는 안정화시키거나; 또는 종양, 휴면 종양 또는 미세전이의 발생 또는 재발을 치료 또는 예방하는 데에 필요한 최소량이다. VEGF-특이적 길항제는 암을 예방 또는 치료하거나 암 발생 위험을 감소시키기 위해 현재 사용되는 1종 이상의 작용제와 함께 반드시 함께 제제화될 필요는 없지만 임의로는 이것과 함께 제제화된다. 이러한 기타 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 VEGF-특이적 길항제의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 인자에 따라 달라진다. 일반적으로, 이들은 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 이전에 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0179] 질병의 유형 및 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여이든지 아니면 연속적인 주입이든지 간에, VEGF-특이적 길항제 약 1 ㎍/kg 내지 약 100 mg/kg (예를 들어 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg)이 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 상기 언급된 인자에 따라, 전형적인 1일 투여량은 약 1 ㎍/kg 내지 약 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 특히 바람직한 투여량에는, 예를 들어 7.5 mg/kg, 10 mg/kg 및 15 mg/kg이 포함된다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 상태에 따라서 상기 기재되거나 당업계에 공지된 방법으로 측정시에 암이 치료될 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 한 예에서, VEGF-특이적 길항제가 항체인 경우, 본 발명의 항체는 매주, 2주 마다, 또는 3주 마다 1회씩 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 용량 범위, 예를 들어 7.5 mg/kg 또는 10 mg/kg을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아닌 용량 범위로 투여한다. 본 발명의 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0180] 요법의 지속기간은 의학적으로 나타나는 한 계속되거나 원하는 치료 효과 (예를 들어, 본원에 기재된 효과)가 달성될 때까지 지속될 것이다. 일부 실시양태에서, 요법은 1년을 초과하여 계속된다. 특정 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제 요법은 2개월, 4개월, 6개월, 8개월, 10개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 또는 대상체의 수명까지 수 년 동안 지속한다. 일부 실시양태에서, 요법은 질환 진행시까지 계속된다. 일부 실시양태에서, 요법은 질환이 재발되지 않을 때까지 계속된다.

[0181] 본 발명의 VEGF-특이적 길항제는 공지된 방법에 따라서, 예를 들어 정맥내 투여, 예를 들어 거환으로서 또는 소정의 시간에 걸친 연속적 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액막내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 대상체, 예를 들어 인간 환자에게 투여한다. 광범위한 부작용 또는 독성이 VEGF 길항 작용과 연관되는 경우에는 국소 투여가 특히 요망된다. 치료 용도에 생체외 전략을 사용할 수도 있다. 생체외 전략은 대상체로부터 수득된 세포를 VEGF 길항제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염 또는 형질도입시키는 것을 포함한다. 이어서, 상기 형질감염 또는 형질도입된 세포를 대상체에게 다시 주입한다. 세포는 조혈 세포 (예를 들어, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포 또는 B 세포), 섬유모세포, 상피세포, 내피 세포, 각질세포 또는 근육 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 광범위한 범위의 유형일 수 있다.

[0182] 예를 들어, VEGF-특이적 길항제가 항체인 경우, 이러한 항체는 임의의 적합한 수단, 예를 들어 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 면역억제제 치료를 위해 원한다면 병변내 투여를 통해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 추가로, 항체는 특히 항체의 용량을 감소시킨 펄스 주입에 의해 적합하게 투여된다. 바람직하게는, 투여는 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공된다.

[0183] 또 다른 예에서, VEGF-특이적 길항제 화합물은 예를 들어 장애 또는 종양의 위치가 허용된다면 직접 주사를 통해 국소 투여되고, 상기 주사는 주기적으로 반복될 수 있다. VEGF-특이적 길항제는 또한 예를 들어 휴면 종양 또는 미세전이의 국소 재발 또는 전이를 예방하거나 감소시키기 위해서 종양의 수술적 절제 이후에 대상체에게 전신 전달될 수도 있고, 또는 종양 세포에, 예를 들어 종양 또는 종양 층에 직접 전달될 수도 있다.

[0184] 별법적으로, VEGF-특이적 길항제를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 억제성 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드를 대상체의 적절한 세포에 전달할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 핵산은 종양 자체에 대해 지시될 수

있다.

[0185] 핵산은 이용된 벡터에 적절한 임의의 수단에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 많은 이러한 방법이 당업계에 공지되어 있다 (문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌], 및 [Watson et al., Recombinant DNA, Chapter 12, 2d edition, Scientific American Books, 1992]). 유전자 전달 방법의 예는 리포좀 매개 형질감염, 전기천공, 인산칼슘/DEAE 덱스트란 방법, 유전자 총 및 미세주입을 포함한다.

[0186] **V. 제약 제제**

[0187] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 치료 제제는 당업계에 공지되어 있는 표준 방법을 이용하여, 예를 들어 목적하는 순도를 갖는 항체를 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20^{th} edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]) 동결건조된 제제 또는 수용액 형태로 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 바람직한 동결건조된 항-VEGF 항체 제제는 WO 97/04801 (이는 명백하게 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0188] 임의로, 그러나 바람직하게는, 제제는 제약상 허용되는 염, 전형적으로는 예를 들어 염화나트륨을 바람직하게는 대략 생리적 농도로 함유한다. 임의로, 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 보존제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존제 농도는 0.1 내지 2.0%, 전형적으로는 v/v의 범위이다. 적합한 보존제는 제약 업계에 공지된 것을 포함한다. 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 메틸파라벤 및 프로필파라벤이 보존제의 예이다. 임의로, 본 발명의 제제는 0.005 내지 0.02% 농도의 제약상 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0189] 한 실시양태에서, 베바시주맙은 치료 용도를 위해 4 mL 또는 16 mL의 베바시주맙을 전달하기 위한 100 mg 및 400 mg 보존제-무함유 1회용 바이알로 제공된다 (25 mg/mL). 100 mg 생성물은 240 mg α,α-트레할로스 2수화물, 23.2 mg 인산나트륨 (1염기성, 1수화물), 4.8 mg 인산나트륨 (2염기성, 무수), 1.6 mg 폴리소르베이트 20, 및 주사용수, USP 중에 제제화될 수 있다. 400 mg 생성물은 960 mg α,α-트레할로스 2수화물, 92.8 mg 인산나트륨 (1염기성, 1수화물), 19.2 mg 인산나트륨 (2염기성, 무수), 6.4 mg 폴리소르베이트 20, 및 주사용수, USP 중에 제제화될 수 있다.

[0190] 본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 하나의 제제 중에 EGFR, VEGF (예를 들어, VEGF 상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체), VEGFR 또는 ErbB2 (예를 들어, 헤르셉틴®)에 결합하는 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 상기 조성물은 세포독성제, 시토카인, 성장 억제제 및/또는 소분자 VEGFR 길항제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0191] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 매크로에멀젼 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

[0192] 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해

성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37℃에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디술피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

[0193] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0194] **VI. 치료 효능**

[0195] 본 발명은 치료가 유의한 독성 또는 역효과를 유발하지 않고 유익한 항암 효과를 제공하는 암 환자에서의 아주반트 요법의 방법을 제공한다. 본 발명의 치료의 효능은 생존 기간, 무병 생존, 무진행 생존, 질환 진행까지의 시간, 차도 시간, 및/또는 삶의 질을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아닌 암 치료를 평가하는데 흔히 사용되는 다양한 종료점을 이용하여 측정할 수 있다. 본 발명의 항혈관신생제가 종양 혈관계를 표적으로 하고 반드시 신생물성 세포 자체를 표적으로 하는 것은 아니기 때문에, 이들은 독특한 클래스의 항암 약물을 나타내고, 따라서 약물에 대한 임상 반응의 독특한 측정법 및 정의를 필요로 할 수 있다. 본 발명의 항-VEGF 항체는 전이성 확산을 억제할 수 있거나, 또는 단순히 종양증식억제(tumouristatic) 효과를 발휘할 수 있다. 따라서, 예를 들어 혈관신생의 혈장 또는 소변 마커의 측정 및 방사선 영상화를 통한 반응의 측정을 포함하는, 항혈관신생 요법의 효능을 결정하는 새로운 접근법을 이용해야 한다.

[0196] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 환자에서의 암 재발 가능성을 방지하거나 감소시키는 방법을 제공한다.

[0197] 한 예에서, VEGF-특이적 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체는 DFS 또는 OS를 연장시키는 데에 유효한 양으로 투여되는데, 이러한 DFS 또는 OS는 항체를 최초로 투여한 지 약 2 내지 5년 후에 평가, 예를 들어 분석된다. 특정 실시양태에서, 대상체의 DFS 또는 OS는 치료 개시 후 또는 초기 진단 후 약 3-5년, 약 4-5년, 또는 적어도 약 4, 또는 적어도 약 5년, 또는 적어도 약 6년, 또는 적어도 약 7년, 또는 적어도 약 8년, 또는 적어도 약 9년, 또는 적어도 약 10년 째에 평가, 예를 들어 분석된다.

[0198] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 암 또는 암 재발이 생기기 쉽거나 그러한 것으로 진단받은 대상체의 생존 기간을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 생존 기간은 약물의 첫번째 투여에서 사망까지의 시간으로 정의된다. 생존 기간은 또한 치료군 대 대조군의 계층화된 위험비 (HR)에 의해 측정할 수 있으며, 이는 치료 동안 환자의 사망 위험을 나타낸다.

[0199] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 치료법은 각종 항암 요법을 이용하여 치료받고 있는, 암에 대해 감수성이거나 이로 진단된 대상체, 예를 들어 인간 환자군에게서 반응률을 상당히 증가시켜 제공하였다. 반응률은 치료에 반응한 치료받은 환자의 백분율로서 정의된다. 한 측면에서, 항-VEGF 항체를 이용하는 본 발명의 치료법과, 외과수술, 방사선 요법, 또는 하나 이상의 화학요법제를 조합한 것은 외과수술, 방사선 요법, 또는 화학요법 만으로 치료받은 그룹과 비교하여 치료받은 환자 그룹에서의 반응률을 현저하게 증가시킨다.

[0200] **VII. 항체 생산**

[0201] *(i) 폴리클로날 항체*

[0202] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 2관능성 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통함), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, $SOCl_2$, 또는 $R^1N=C=NR$ (여기서, R 및 R^1은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0203] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 ㎍ 또는 5 ㎍ (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후, 프로인트 완전 아주반트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지

1/10로 여러 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정체기(plateau)에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교제를 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 제조될 수도 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 적합하게 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.

[0204] *(ii) 모노클로날 항체*

[0205] 본원에서의 모노클로날 항체를 제조하는 다양한 방법이 당업계에서 이용가능하다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조될 수도 있다.

[0206] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 마카쿠 원숭이를 상기 기술된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 별법적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포가 형성된다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0207] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0208] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 미국 메릴랜드주 록크빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987)]).

[0209] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전법 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사선면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)으로 결정한다.

[0210] 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0211] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

[0212] 통상적인 절차 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 쉽게 단리하고 서열분석한다. 하이브리도마 세포는 이같은 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이러한 벡터를 형질감염되지 않으면 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 합성을 수득하였다. 항체의 재조합 생산은 하기에 더욱 상세하게 기술될 것이다.

[0213] 추가의 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재

된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]은 파지 라이브러리를 사용한 뮤린 및 인간 항체 각각의 단리를 기재한다. 이후의 간행물은 쇄 셔플링에 의한 고친화성 (nM 범위) 인간 항체의 생성 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]), 및 또한 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)])을 기재한다. 따라서, 이러한 기술은 모노클로날 항체 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술의 실행가능한 대안이다.

[0214] DNA는 또한 예를 들어 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다.

[0215] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인 대신 사용되거나 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인 대신 사용되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원 결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.

[0216] *(iii) 인간화 및 인간 항체*

[0217] 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 1개 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "도입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열 대신 사용함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0218] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적 맞춤(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 수용된다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immnol., 151:2623 (1993)]).

[0219] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화성을 보유하고 기타 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화성 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 CDR 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0220] 인간화 항-VEGF 항체 및 그의 친화성 성숙 변이체는 예를 들어 2005년 2월 26일자로 허여된 미국 특허 번호 6,884,879에 기재되어 있다.

[0221] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이같은 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종 시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in

Immuno., 7:33 (1993)]; 및 [Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)]을 참조한다.

[0222] 별법적으로, 파지 디스플레이 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)])이 면역화되지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내 생성하는데 이용될 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 필라멘트형 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 코트 단백질 유전자로 프레임에 맞게 클로닝하고, 파지 입자의 표면상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이한다. 필라멘트형 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택에 의해 이러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자도 선택된다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있고, 이에 대한 검토를 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 절편의 여러 공급원이 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합형 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이가 단리되었다. 본질적으로 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라, 면역화되지 않은 인간 공여자로부터 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체를 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905를 참조한다.

[0223] 상기 논의된 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수도 있다 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조).

[0224] 인간 모노클로날 항-VEGF 항체는 1998년 3월 24일자로 허여된 미국 특허 번호 5,730,977에 기재되어 있다.

[0225] *(iv) 항체 단편*

[0226] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 또 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185를 참조한다.

[0227] *(vi) 기타 아미노산 서열 변형*

[0228] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 아미노산 변화는 또한 항체의 번역후 프로세싱을 변경시킬 수 있으며, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.

[0229] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 변이체를 원하는 활성에 대하여 스크리닝한다.

[0230] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합 및 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽

입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 상기 항체의 N- 또는 C-말단이 융합된 것을 포함한다.

[0231] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 고려된다.

[0232] 항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상으로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선별함으로써 달성된다. 아미노산은 그의 측쇄 특성의 유사성에 따라 하기 군으로 나뉠 수 있다 (문헌 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

[0233] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0234] (2) 비하전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0235] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0236] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

[0237] 별법적으로, 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 하기 군으로 나뉠 수 있다:

[0238] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0239] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0240] (3) 산성: Asp, Glu;

[0241] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0242] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0243] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0244] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0245] 또한, 항체의 적당한 형태 유지에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기가 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화 안정성을 개선시키고 이상 가교를 방지할 수 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)이 항체에 부가되어 그의 안정성이 개선될 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

[0246] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반하였다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선별된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙이다. 간략하게 설명하면, 여러 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6개 또는 7개 부위)를 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환이 생성되도록 돌연변이시킨다. 이로써 생성된 항체 변이체를 필라멘트형 파지 입자로부터 각 입자 내에 패키지된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 1가 방식으로 디스플레이시킨다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 이들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 항체와 인간 VEGF 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체들의 패널을 본원에 기술된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 갖는 항체를 추가적인 개발을 위해 선별할 수 있다.

[0247] 항체의 아미노산 변이체의 또 다른 유형은 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.

[0248] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서,

X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.

[0249] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 항체가 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0250] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착되는 푸코스가 결여된 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체는 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 A1 (교와 하꼬 고교 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))도 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화(bisecting) N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 WO03/011878 (Jean-Mairet et al.), 및 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO97/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO98/58964 (Raju, S.) 및 WO99/22764 (Raju, S.)도 참조한다.

[0251] 본 발명의 항체를 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 증진되도록 이펙터 기능과 관련하여 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)이 Fc 영역 내에 도입되어, 이 영역 내에서의 쇄간 디술피드 결합 형성을 허용할 수 있다. 이로써 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 항종양 활성이 증강된 동종이량체 항체는 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이종2관능성 가교 결합제를 사용하여 제조할 수도 있다. 별법적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 보체 용해 및 ADCC 능력이 증진될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0252] WO 00/42072 (Presta, L.)에는 인간 이펙터 세포의 존재하에 개선된 ADCC 기능을 갖는 항체가 기재되어 있고, 여기서 항체는 그의 Fc 영역 내에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 개선된 ADCC를 갖는 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 상기 위치 중 1개, 2개 또는 3개에서의 치환을 포함하거나 이러한 치환으로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역이다. 이러한 치환은 C1q 결합 및/또는 CDC를 증가시키는 치환(들)과 임의로 조합된다.

[0253] C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)이 변경된 항체는 WO99/51642, 미국 특허 번호 6,194,551B1, 미국 특허 번호 6,242,195B1, 미국 특허 번호 6,528,624B1 및 미국 특허 번호 6,538,124 (Idusogie et al.)에 기재되어 있다. 항체는 그의 Fc 영역의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링) 중 1개 이상에서의 아미노산 치환을 포함한다.

[0254] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편) 내로 혼입할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자 (예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3 또는 IgG_4)의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 상기 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0255] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 WO00/42072 (Presta, L.) 및 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합성을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역은 위치 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 또는 434 (잔기의 Eu 넘버링) 중 1개 이상에서 치환을 가질 수 있다. 개선된 FcRn 결합을 갖는 바람직한 Fc 영역-포함 항체 변이체는 그의 Fc 영역의 위치 307, 380 및 434 (잔기의 Eu 넘버링) 중 1개, 2개 또는 3개에서의 아미노산 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 307/434 돌연변이를 갖는다.

[0256] 3개 이상 (바람직하게는 4개)의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 고려된다 (미국 출원 번호

US2002/0004587 A1 (Miller et al.)).

[0257] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0258] *(v) 면역접합체*

[0259] 본 발명은 또한 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사선접합체)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

[0260] 이러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 앞서 기재된 바 있다. 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사선접합체 항체의 생성을 위해 다양한 방사선핵종이 이용가능하다. 이것의 예는 ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y 및 ^{186}Re를 포함한다.

[0261] 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체와 세포독성제의 접합체가 제조된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다.

[0262] 또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 이용하기 위해 "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 여기서의 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 후에 세정제를 사용하여 순환계로부터 미결합 접합체를 제거한 후, 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0263] *(vi) 이뮤노리포좀*

[0264] 본원에 개시된 항체는 또한 이뮤노리포좀으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은, 예컨대 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 바와 같은 당업계 공지의 방법으로 제조된다. 순환 시간이 증진된 리포좀은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다.

[0265] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발 방법으로 생성될 수 있다. 규정된 공동 크기의 필터를 통해 리포좀을 압출하여 원하는 직경의 리포좀이 산출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디술피드 상호교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포좀에 접합될 수 있다. 화학요법제 (예컨대 독소루비신)는 임의로 리포좀 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst.81(19)1484 (1989)]을 참조한다.

[0266] **VIII. 제조품 및 키트**

[0267] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 기술된 장애의 치료에 유용한 물질들을 함유하는 제조품이 제공된다. 상기 제조품은 용기, 라벨 및 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 상태를 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하주사 바늘이 관통

가능한 마개가 있는 정맥주사액 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중 적어도 1종의 활성 작용제는 항-VEGF 항체이다. 용기 상의 또는 용기와 합쳐진 표지는 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 가리킨다. 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 인산염 완충 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 더 포함할 수 있다. 또한, 제조품은, 예를 들어 조성물이 또 다른 조성물과 병용해서 사용되지 않아야 한다는 경고를 포함하거나, 또는 조성물 사용자에게 항-VEGF 항체 조성물을 환자에게 단독으로 투여하거나 이를 항암 조성물, 예를 들어, 류코보린, 5-FU, 옥살리플라틴, 이리노테칸 또는 이들의 조합물과 병용해서 투여하라고 지시하는 사용 설명서가 적힌 패키지 삽입물을 포함한다. 용어 "사용 설명서"는 모든 수단, 예를 들어 패키지 삽입물 형태의 서면 또는 서면으로 작성된 기타 홍보물에 의해 적용 가능한 요법, 의약, 치료, 치료 요법 등에 대한 지시를 제공하는 것을 의미한다.

[0268] VEGF-특이적 길항제는 단독으로 또는 다른 항암 치료 화합물과 조합되어 키트로서 포장될 수 있다. 이러한 키트는 환자에게 단위 용량을 투여하는 데에 도움을 주는 임의의 성분, 예를 들어 분말 형태를 재구성하기 위한 바이알, 주사용 시린지, 주문제작된 IV 전달 시스템, 흡입기 등을 포함할 수 있다. 추가로, 단위 용량 키트는 조성물의 제조 및 투여를 위한 지침서를 함유할 수 있다. 키트는 1명의 환자를 위한 1회용 단위 용량으로서 제조될 수 있거나, 특정 환자를 위해 여러회 사용하도록 (일정한 용량으로, 또는 요법이 진행됨에 따라 개개의 화합물의 효력이 달라질 수 있도록) 제조될 수 있거나; 또는 키트는 다수의 환자에게 투여하는데 적합한 다중 용량을 함유할 수 있다 ("벌크 포장"). 키트 성분은 카툰, 블리스터 팩, 병, 튜브 등에 조립될 수 있다.

[0269] 본 발명은 암, 예를 들어 원발성 종양에 대해 결정적 외과수술을 받은 환자를 치료하기 위한 패키지를 포함하는 키트를 제공하며, 상기 패키지는 항-VEGF 항체 조성물 및 아주반트 요법에서의 항-VEGF 항체 조성물의 사용에 대한 지침서를 포함하고, 상기 지침서에는 아주반트 요법을 제공받은 환자의 경우 아주반트 요법을 개시한 후 1년 째의 DFS가 94.3이며 위험율이 0.60인 것으로 언급되어 있다.

[0270] **물질의 기탁**

[0271] 하기하는 하이브리도마 세포주는 부다페스트 조약의 규정하에 미국 버지니아주 매너시스 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (ATCC)에 기탁되었다.

[0272] **항체 명칭** **ATCC 번호** **기탁일**

[0273] A4.6.1 ATCC HB-10709 1991년 3월 29일

[0274] 하기 실시예는 단지 본 발명의 실시를 예시하고자 하는 것이며, 제한하기 위해 제공된 것은 아니다.

[0275] **실시예**

[0276] **실시예 1. 결장직장암 환자에서의 베바시주맙 아주반트 요법**

[0277] 본 실시예는 국립 유방암 대장암 임상 연구협회(National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) (NSABP C-08)의 임상 실험에서 치료받은 결장직장암 대상체로부터 수득한 결과를 분석한 것에 관한 것이다. 본 연구의 주요 목적은 무병 생존 (DFS)에 의해 측정되는 바와 같은, 결장직장암을 치료하기 위한 표준 화학요법에 베바시주맙을 첨가하는 것에 대한 임상적 이점을 판단하기 위한 것이다. 두번째 목표는 전체 생존을 연장시키는데 있어서 임상적 이점이 존재하는지 여부를 판단하는 것이다. 본 시험에 사용된 표준 화학요법은 류코보린, 5-플루오로우라실 및 옥살리플라틴 조합이다. 본 시험은 절제술 후 II 및 III기 결장 암종을 갖는 환자에 대해 아주반트 요법으로서의 베바시주맙 (아바스틴®)의 효능을 평가하였다.

[0278] **연구 설계**

[0279] NSABP C-08 연구의 설계를 도 1 및 2에 도시한다.

[0280] NSABP C-08 시험에서, 다음과 같은 치료 프로토콜이 사용되었다:

[0281] A 군/그룹 1: 12 사이클 (6 개월) 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 (mFOLFOX6: 제1일에 옥살리플라틴 (85 mg/m^2)와 동시에 류코보린 (400 mg/m^2) 및 5-FU (400 mg/m^2 IV 볼루스) 및 제1일 및 제2일의 46시간에 걸쳐 5-FU (2400 mg/m^2));

[0282] B 군/그룹 2: 12 사이클 (6 개월) 동안 q 14일로 변형된 FOLFOX6 + 각 화학요법 사이클의 제1일에 옥살리플라

틴 이전에 베바시주맙 (5 mg/kg IV)을 1년 동안 q 14일로 투여함.

[0283] 베바시주맙 (아바스틴®)은 비경구 투여용으로 제조된, 2개의 바이알 크기 내의 투명하거나 내지는 약간 유백색의 멸균 액체로서 공급되었고: 각 100 mg (25 mg/ml - 4 ml 충전)의 유리 바이알은 베바시주맙과 함께 포스페이트, 트레할로스, 폴리소르베이트 20 및 멸균 주사용수, USP를 함유하였고, 각 400 mg (25 mg/ml - 16 ml 충전)의 유리 바이알은 베바시주맙과 함께 포스페이트, 트레할로스, 폴리소르베이트 20, 및 멸균 주사용수, USP를 함유하였다. 아바스틴®은 5 mg/kg 용량에 필요한 양을 덜어내어 투여하였고, 정맥내 투여 이전에 0.9 % 염화나트륨 주사, USP의 총 부피 100 ml로 희석하였다.

[0284] 이들 시험을 적합화하기 이전에, 환자가 하기 단계 중 하나를 충족시키는 조직학적으로 확인된 결장 선암종을 가질 것이 요구되었다:

[0285] (1) II기 암종 ($T_{3\text{ 또는 }4}$, N_0, M_0) (종양이 고유근을 통해 장막하조직 또는 비-복막 결장주위 또는 직장주위 조직을 침범하였거나 (T_3); 또는 바로 다른 장기 또는 구조를 침범하였고/거나 내장측 복막을 천공시킴 (T_4)) 또는

[0286] (2) III기 암종 (임의의 T, $N_{1\text{ 또는 }2}$, M_0) (종양이 부위 림프절과 관련하여 임의의 깊이로 침범함).

[0287] 원발성 종양으로부터 직접 확장에 의해 인접 구조 (예를 들어, 방광, 소장, 난소 등)로 전이된 T4 종양 환자는 하기 조건을 모두 충족시킬 경우에 적합하다:

[0288] (1) 인접 구조의 전부 또는 일부가 원발성 종양과 함께 일괄적으로 제거되었고;

[0289] (2) 외과 의사의 견해에서, 극도로 가시적인 종양이 모두 완전히 절제되었고 ("치유적 절제");

[0290] (3) 병리학자에 의한 조직학적 평가에 의해 절제된 시료의 주변부가 악성 세포에 의해 전이되지 않은 것으로 확인되었고;

[0291] (4) 국부 방사선 요법은 이용되지 않았음.

[0292] 하나를 초과하는 동시성 원발성 결장 종양을 갖는 환자는 보다 진전된 원발성 종양에 기초하여 계층화하는데 적합하였다.

[0293] 환자는 개복술 또는 복강경하 결장절제술에 의해 일괄적으로 완벽한 총체적인 종양 절제 (치유적 절제)가 이루어졌어야 한다. 환자는 먼저 압력완화 결장조루술을 제공받은 후, 후속 절차에서 결정적인 외과적 절제를 받은 2 단계의 수술적 절차를 밟은 자가 적합하다. 종양에서 먼 쪽의 정도는 내시경검사시 항문 끝으로부터 12 cm 이상이어야 한다. 환자가 내시경검사 대상이 아닌 경우, 종양에서 먼 쪽의 정도는 외과적 조사에 의해 판단된 바로서 항문 끝으로부터 12 cm 이상이어야 한다.

[0294] 환자는 18세 이상이어야 하고, ECOG 전신 활동도가 0 또는 1이어야 하며, 연구자의 견해에서 암 진단을 배제하고 예상 수명이 적어도 5년이어야 한다.

[0295] 무작위화 시점에, 환자는 수술후 절대 과립구 수 (AGC)가 1500개/mm^3 이상 (또는 연구자의 견해에서 민족간 또는 인종간 차이로 정상임을 나타내는 경우, 1500개/mm^3 미만)이고, 수술후 혈소판 수가 100,000개/mm^3 이상이어야 한다. 또한 환자는 정상 간 및 신장 기능을 가졌다.

[0296] 결장직장암을 비롯하여 종전에 악성종양을 가졌던 환자는 그들이 적어도 5년 동안 무병상태였고, 의사에 의해 재발 위험이 낮은 것으로 간주되었다면 적합하다. 피부의 편평상피 세포 또는 기저 세포 암종, 상피내 흑색종, 자궁경부의 상피내 암종, 결장 또는 직장의 상피내 암종 환자는 이러한 상태가 무작위화 이전 5년 이내에 진단되었을지라도 효과적으로 치료를 받아왔다면 또한 적합하다.

[0297] 환자가 다음 상태 중 어느 상태를 가진 경우에는 부적합하다: 선암 이외의 결장암, 직장 종양, 단리된 원위 또는 비-인접 복강내 전이 (절제된 경우라도), 악성종양에 대해 개시된 전신 또는 방사선 요법, 연구 진입전 6개월 이내에 원발성 결장 종양과 관계없는 현저한 출혈, 심각하거나 치유되지 않은 상처, 피부 궤양 또는 골절, 내시경술에 의해 활성인 것으로 판정된 위십이지장 궤양, 대수술 절차, 무작위화 이전 28일 이내의 개복 생검 또는 유의한 외상성 상해, 시험 과정 동안 대수술 절차에 대한 필요의 예상, 핵 생검 또는 기타 중요하지 않은 절차, 무작위화 이전 7일 이내에 혈관 접근 장치의 설치 배제, 제어되지 않는 혈압 (150/90 mmHg 초과), CNS 뇌혈관 허혈의 이전 병력, 6개월 이내의 말초 동맥 허혈 병력, 6개월 이내의 혈관 동맥 허혈 병력,

부수적으로 할로겐화된 항바이러스제, 무작위와 시점에서의 임상적으로 현저한 말초 신경병증 (NCI 이상반응 표준 용어 기준(NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events) 버전 3.0에 의한 등급 2 이상의 감각 신경 또는 신경운동 독성), 시험에 사용되는 연구 약물 중 어느 것의 사용도 불가능하게 된 비-악성 전신 질환, 무작위화 시점의 임산부 또는 수유부, 연구자의 견해에서 환자가 연구 시험 요건을 충족시키지 못하는 것으로 판단된 정신적 또는 중독성 장애 또는 그 밖의 상태, 환자가 완전한 용량의 항응고제를 복용하지 않고, 대상체가 안정한 용량의 와파린 또는 안정한 용량의 저분자량 헤파린에 대해 범위내 INR을 갖지 않고, 대상체가 현성 출혈 또는 높은 출혈 위험과 관련이 있는 병리 상태를 갖는 경우의 PT (INR) > 1.5.

[0298] 본 시험의 1차 종료점은 무병 생존 (DFS) 기간이다. DFS에 대한 사건에는 결장암 재발, 제2 원발성 암 또는 임의의 원인으로 인한 사망의 최초로 문서화된 증거가 포함되었다. 2차 종료점은 전체 생존 (OS) 기간 및 연구 요법과 관련된 독성이다. 전체 생존에 대한 사건에는 임의의 원인으로 인한 사망이 포함되었다.

[0299] 결장암 재발은 다음 기준에 의해 진단되었다. 복부 및/또는 골반 부위의 경우: 양성 세포학 또는 문합가능한 경우, 생검;

[0300] 복부, 골반 및 후복막 림프절: (1) 양성 세포학 또는 생검, (2) 적어도 4 주의 간격으로 분리된 2개의 CT 또는 MRI 스캔에 의해 입증된 바와 같은, 계속해서 확대되고 있는 림프절(들), (3) CT 또는 MRI 스캔 상에 밝혀진 바와 같은 종괴의 존재하에서의 수뇨관 장애 또는 (4) 그 부위에서 양성 PET 스캔에 의해 악성인 것으로 확인된 분명한 종괴를 보여주는 단일 CT 또는 MRI 스캔.

[0301] 복막 (내장 및 벽측 복막 또는 대망막 포함): (1) 양성 세포학 또는 생검 또는 (2) 적어도 4 주의 간격으로 분리된 2개의 CT 또는 MRI 스캔에 의해 입증된 바와 같은, 계속해서 확대되고 있는 복강내 고형 종괴, 또는 그 부위에서의 양성 PET 스캔에 의해 악성인 것으로 확인된 단일 스캔.

[0302] 복수: 양성 세포학

[0303] 간: (1) 양성 세포학 또는 생검 또는 (2) 양성 질환과 관련이 없는 다음 중 3가지: (i) 최근의 또는 점진적인 간비대, 비정상적인 간 윤곽; (ii) 양성 방사성뉴클레오티드 간 스캔 또는 초음파 검사도; (iii) 비정상 CT 스캔 또는 MRI 스캔을 확인시켜주고, CEA 증가와 관련이 있는 양성 PET 스캔; (iv) 비정상적 간 기능 연구; 또는 (V) 상승된 CEA, 즉 수술후 정상 CEA 값을 가진 환자에서 4 주 간격으로 떨어져 2번 측정했을때 확인된 (측정은 동일한 실험실에서 동일한 방법을 이용하여 이루어져야 함), 정상 값을 10배 상회하는 CEA 역가에 있어서의 지속적인 증가.

[0304] 골반 종괴는 달리 명시되지 않음 (NOS): (1) 양성 세포학 또는 생검 또는 (2) 적어도 4 주의 간격으로 분리된 2개의 CT 또는 MRI 스캔에 의해 입증된 바와 같은, 계속해서 확대되고 있는 골반내 고형 종괴 또는 (3) 그 부위에서 양성 PET 스캔에 의해 확인된 단일 CT 스캔 상의 고형 종괴.

[0305] 복벽, 회음 및 반흔: 양성 세포학 또는 생검

[0306] 비-복부 및 비-골반 부위:

[0307] 골격: 모든 골-한정 재발의 경우, 생검이 요구된다.

[0308] 폐: (1) 양성 세포학, 흡인 또는 생검 또는 (2) 폐 전이와 일치하는 것으로 보이는 다중 폐 결절의 방사선 증거.

[0309] 골수: 양성 세포학, 흡인, 생검 또는 MRI 스캔

[0310] 중추신경계: (1) 통상 신경학적 증상을 갖는 환자에서의 양성 CT 또는 MRI 스캔; 또는 (2) 생검 또는 세포학 (뇌척수막 침범 진단의 경우).

[0311] 제2 원발성 암의 진단은 가능할 때마다 조직학적으로 확인하였다.

[0312] **결과**

[0313] 본 시험으로부터의 결과는 화학요법에 아바스틴®을 부가한 것이 적극 치료 기간에 해당하는 첫 해 동안 화학요법 단독과 비교하여 DFS를 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. 데이터는 이러한 현저한 이점이 임의의 독성 또는 역효과의 증가와는 관련이 없음을 보여주었다.

[0314] 2,710명의 환자를 연구하였다 (1,356명은 대조군 및 1,354명은 실험군). 대조군의 18명의 환자 및 실험군의 20명의 환자는 추적 관찰 또는 양성 수술 절제면이 없어 효능에 대해 평가되지 못했다. 또한, 22명의 대조군

및 15명의 실험군 환자는 다른 이유로 인해 부적합한 것으로 확인되었지만, 분석에 포함시켰다. 이에 따라, 대조군 및 실험군 각각에서 1,338명 및 1,334명의 환자가 본 분석에 포함되었다. 중앙 추적 관찰 기간은 35.6 개월이었다. 환자의 특징은 치료군 별로 잘 균형을 이루었다. 1/2을 약간 초과하는 환자는 60세 미만이었고, 대략 15%는 70세를 초과하였으며, 성별 분포는 동일하였다. II기 환자가 대략 25%를 차지하였다.

[0315] 사건까지의 시간을 무작위한 때로부터 측정하였다. 1차 종료점 이외의 모든 p 값은 양측 시험에서 0.05 수준을 현저한 것으로 평가하였다. 모든 신뢰 구간은 95%였다. 위험율 (HR)은 콕스(Cox) 모델로부터 계산하였고, 사건까지의 시간으로부터의 p 값은 로그 순위 시험으로부터 구하였다. HR 및 p 값을 가능할 때마다 양성 림프절의 수로 계층화하였다. 비율은 피셔(Fischer)의 확률법과 비교하였다. 1차 분석은 주로 추적 관찰이 없었던 환자 및 무작위화 시점에서 1차 종료점에 대한 위험이 없는 환자 (전이 또는 양성 수술 절제면을 갖는 것으로 공지됨)만 제외하고 치료하고자 하는 것에 기초하였다. 위험 함수의 기초가 되는 평활 추정은 뮐러(Muller) 및 왕(Wang) (문헌 [Biometrics 1994 50:61-76])의 방법으로 계산하였다. 위험의 기초가 되는 비율의 평활 추정은 길버트(Gilbert) 등의 방법으로 계산하였다 (문헌 [Biometrics 2002 58:773-80]).

[0316] 결과는 다음과 같았다:

[0317]

	환자의 수	사건의 수	3년 DFS (%)	p 값
mFOLFOX6	1338	312	75.5	
mFOLFOX6 + 베바시주맙	1334	291	77.4	0.15

[0318] II기 질환 환자의 경우, 3 년 DFS는 실험군 및 대조군 각각에서 87.4% 및 84.7% (HR=0.82 CI 0.54-1.25; p=0.35)였고, III기의 경우에는 74.2% 및 72.4% (HR=0.90 CI 0.76-1.07; p=0.23)였다.

[0319] 최종 위험비 (HR)는 0.888이었고, p 값은 0.146이었다. 시간에 따라 평가한 위험비 (HR) 및 p 값은 다음과 같았다:

[0320]

치료 개시 후 년수	1	1.25	1.5	2	2.5	3
HR	0.6	0.61	0.74	0.81	0.85	0.87
p 값	0.0004	<0.0001	0.004	0.02	0.05	0.08

[0321] 치료 개시 후 1년 째의 DFS는 mFOLFOX6 + 베바시주맙으로 치료한 환자의 경우 94.3이었고, mFOLFOX6으로만 치료한 환자의 경우에는 90.7이었다 (HR은 0.60이었고, p 값은 0.0004임). 베바시주맙은 첫 1.25 년 동안 강력한 효과를 가졌다 (HR=0.61 95% CI 0.48-0.78, p<0.0001). 이들 데이터는 베바시주맙을 화학요법에 부가하는 것이 베바시주맙을 환자에게 투여하는 동안 및 그 직후인 적극 치료 기간 동안 (치료를 개시한 후 첫 12 개월) 임상적으로 유의하고 현저한 이점을 부여함을 나타내었다. 이들 결과는 또한, 1년을 초과하여 베바시주맙을 투여하는 것이 환자에게 유익할 것임을 처음으로 보여주었다.

[0322] 전술된 설명으로부터, 본원에 기재된 발명에 대한 변경 및 변형이 이루어질 수 있으며, 이를 다양한 활용 및 조건에 적합하도록 할 수 있다는 것이 명백할 것이다. 이러한 실시양태는 또한, 하기하는 특허청구범위의 범주 내에 포함된다.

도면

도면1

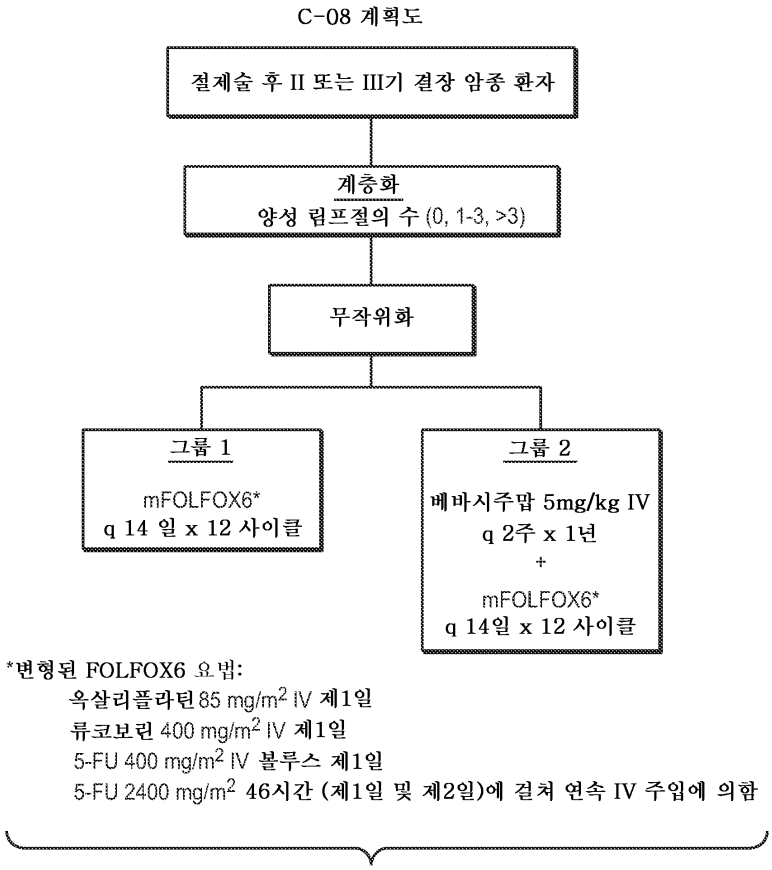
A 군:

약물	용량	투여	투약 간격	계획된 기간
옥살리플라틴	85 mg/m^2	250ml D5W의 별개의 주입 백 및 Y 라인의 배관에 의해 연결된 별개의 라인을 이용하여 2시간에 걸쳐 동시에 IV 투여	제1일 q 14일	12 사이클
류코보린	400 mg/m^2			
5-FU	400 mg/m^2	2-4분에 걸쳐 IV 볼루스		
5-FU	46시간에 걸쳐 2400 mg/m^2	46시간에 걸쳐 IV 연속 주입	제1일 및 제2일 q 14일	

B 군:

약물	용량	투여	투약 간격	계획된 기간
베바시주맙	5 mg/kg	0.9% NaCl 용액 100mL 중에 희석된 것을 하기 기간에 걸쳐 IV 제공: 90분 – 1st 용량 60분 – 2nd 용량 30분 – 이후 모든 용량 주입 라인을 플러싱함	제1일 q 14일	12 개월
옥살리플라틴	85 mg/m^2	250ml D5W의 별개의 주입 백 및 Y 라인의 배관에 의해 연결된 별개의 라인을 이용하여 2시간에 걸쳐 동시에 IV 제공	제1일 q 14일	12 사이클 (6 개월)
류코보린	400 mg/m^2			
5-FU	400 mg/m^2	2-4분에 걸쳐 IV 볼루스		
5-FU	46시간에 걸쳐 2400 mg/m^2	46시간에 걸쳐 IV 연속 주입	제1일 및 제2일 q 14일	

도면2



서 열 목 록

Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC., et al.

<120> ADJUVANT CANCER THERAPY

<130> P4196R1 WO

<141> 2010-04-20

<150> US 61/171,008

<151> 2009-04-20

<150> US 61/171,318

<151> 2009-04-21

<150> US 61/181,195

<151> 2009-05-26

<160> 2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110 115 120

Val Ser Ser

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg