



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년08월31일 10-0754049 2007년08월24일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2001-7016538	(65) 공개번호	10-2002-0069104
(22) 출원일자	2001년12월24일	(43) 공개일자	2002년08월29일
심사청구일자	2005년05월20일		
번역문 제출일자	2001년12월24일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/017423	(87) 국제공개번호	WO 2001/00238
국제출원일자	2000년06월23일	국제공개일자	2001년01월04일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리제, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 60/141,315 1999년06월25일 미국(US)

(73) 특허권자 제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 어거스, 데이비드비.
미합중국,캘리포니아90210,비벌리힐스,522노스크레스트드라이브

스케어,하워드아이.
미합중국,뉴저지07670,테너플라이,264하이우드애비뉴

슬리브코브스키,마크엑스.
미합중국,캘리포니아,산카를로스,42오크크리크레인

(74) 대리인 조용식

(56) 선행기술조사문헌

WO 99/31140 A

Br. J. Cancer 78(suppl 2), 19 (1998)

J. Urology 161(3), 984-9 (1999)

Oncology 11(3 Suppl 2), 43-8 (1997)

심사관 : 여호섭

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 전립선암을 치료하기 위한 약제 제조에 사용되는 항-ErbB2 항체 및 조성물

(57) 요약

본 출원은 항-ErbB2 항체를 사용한 전립선암의 치료를 개시한다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

인간의 전립선암을 치료하기 위한 약제 제조에 사용되며,

ErbB2를 결합시키고 미국특허 제5,821,337호에 개시된 인간화된 모노클로날 항체 huMAb4D5-8보다 50-100% 더 효과적인 ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체로서,

상기 항체가 기탁번호 ATCC HB 12697로부터 얻어질 수 있는 모노클로날 항체 2C4의 ErbB2로의 결합을 차단하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

상기 전립선암이 안드로젠 비의존성 전립선암인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

상기 항체가 마이토젠-활성 단백질 키나아제(MAPK)의 TGF- α 활성을 차단하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 4.

제 1항에 있어서,

상기 항체가 ErbB 헤테로-올리고마의 형성을 차단하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5.

제 4항에 있어서,

상기 항체가 기탁번호 ATCC HB 12697로부터 얻어질 수 있는 모노클로날 항체 2C4 또는 인간화된 2C4를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6.

제 1항에 있어서,

상기 항체가 항체 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7.

제 6항에 있어서,

상기 항체 단편이 Fab 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8.

제 1항에 있어서,

상기 항체가 세포독성제와 접합되지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9.

제 6항에 있어서,

상기 항체 단편이 세포독성제와 접합되지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10.

제 1항에 있어서,

상기 항체가 세포독성제와 접합되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11.

제 1항에 있어서,

상기 전립선암이 안드로겐 의존성 전립선암인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 12.

제 11항에 있어서,

상기 약제가 탁산을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 13.

제 11항에 있어서,

상기 약제의 투여로 인해 인간의 전립선 특이적 항체(PSA) 지수가 증가되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 14.

제 11항에 있어서,

상기 항체가 기탁번호 ATCC HB 12697로 부터 얻어질 수 있는 모노클로날 항체 2C4 또는 인간화된 2C4를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 15.

인간의 전립선암을 치료하기 위한 약제 제조에 사용되며,

ErbB2를 결합시키고 미국특허 제5,821,337호에 개시된 인간화된 모노클로날 항체 huMAb4D5-8보다 50-100% 더 효과적인 ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체 및 화학 요법제를 포함하는 조성물로서,

상기 항체가 기탁번호 ATCC HB 12697로부터 얻어질 수 있는 모노클로날 항체 2C4의 ErbB2로의 결합을 차단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.

제 15항에 있어서,

상기 화학요법제가 탁산인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17.

용기 및 그 안에 담기는 조성물을 포함하고,

상기 조성물은 ErbB2를 결합시키고 미국특허 제5,821,337호에 개시된 인간화된 모노클로날 항체 huMAb4D5-8 보다 50-100% 더 효과적인 ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체를 포함하며,

또한, 상기 조성물은 전립선암 치료에 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 더 포함하는 제품으로서,

상기 항체가 기탁번호 ATCC HB 12697로부터 얻어질 수 있는 모노클로날 항체 2C4의 ErbB2로의 결합을 차단하는 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 18.

제 17항에 있어서,

상기 전립선암이 안드로겐 비의존성 전립선암인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 19.

제 17항에 있어서,

상기 포장 삽입물이 화학요법제를 사용하여 환자를 치료한다는 점을 더 표시하는 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 20.

제 19항에 있어서,

상기 화학요법제가 탁산인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 21.

제 17항에 있어서,

상기 전립선암이 안드로겐 의존성 전립선암인 것을 특징으로 하는 제품.

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 항-ErbB2 항체를 사용한 전립선암의 치료에 관한 것이다.

배경기술

수용체 티로신 키나아제의 ErbB군은 세포 성장, 분화 및 생존의 중요한 매개체이다. 상기 수용체군은 표피 성장 인자 수용체(EGFR 또는 ErbB1), HER2(ErbB2 또는 p185^{neu}), HER3(ErbB3) 및 HER4(ErbB4 또는 tyro2)를 포함하는 4가지 다른 요소를 포함한다.

erbB1 유전자에 의해 암호화되는 EGFR은 때때로 인간 악성종양과 관련된다. 특히, 유방암, 폐암, 머리암, 두경부암 및 위암 뿐만 아니라 교아종에서 증가된 EGFR 발현이 관찰된다. 증가된 EGFR 수용체 발현은 종종 자가분비 자극 경로에 의해 수용체 활성을 일으키는 동일한 종양세포에 의해 성장인자 알파(TGF- α)를 형질전환시키는 EGFR 리간드의 증가된 생산과 관련된다[Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)]. EGFR 또는 이의 리간드에 대한 모노클로날 항체 TGF- α 및 EGF는 이러한 악성종양의 치료에서 치료제로서 평가되었다[예를 들어, Baselga and Mendelsohn., *supra*; Masui *et al. Cancer Reserch* 44:1002-1007(1984); 및 Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95:1897-1905(1995) 참조].

ErbB 군의 두번째 요소인 p185^{neu}는 원래 화학처리된 래트의 신경아세포로부터의 형질전환 유전자의 산물로서 확인되었다. 활성화된 형태의 *neu* 원시-종양원성유전자는 암호화된 단백질의 막투과 영역에서 점변이(발린 또는 글루탐산)로부터 발생한다. *neu*의 인간 동종의 증폭은 유방암 및 난소암에서 관찰되고, 좋지 않은 예후와 서로 관련된다(Slamon *et al., Science*, 235:177-182(1987); Slamon *et al., Science*, 244:707-712(1989); 및 미국특허 제4,968,603호). 지금까지, *neu* 원시-종양원성유전자에서와 동종인 점변이는 인간의 종양에 대해서는 보고되지 않았다. ErbB2의 과발현(자주 그러나 유전자 증폭으로 인해 균일하지 않게)은 위암, 자궁내막암, 타액선암, 폐암, 신장암, 결장암, 갑상선암, 췌장암 및 방광암을 포함하는 다른 암에서도 관찰되었다[특히, King *et al., Science*, 229:974(1985); Yokota *et al., Lancet*: 1:765-767(1986); Fukushima *et al., Mol Cell Biol.*, 6:955-958(1986); Geurin *et al., Oncogene Res.*, 3:21-31(1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81-88(1989); Yonemura *et al., Cancer Res.*, 51:1034(1991); Borst *et al., Gynecol. Oncol.*, 38:364(1990); Weiner *et al., Cancer Res.*, 50:421-425(1990); Kern *et al., Cancer Res.*, 50:5184(1990); Park *et al., Cancer Res.*, 49:6605(1989); Zhau *et al., Mol. Carcinog.*, 3:354-357(1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358-363(1988); Williams *et al. Pathobiology* 59:46-52(1991); 및 McCann *et al., Cancer*, 65:88-92(1990) 참조]. ErbB2는 전립선암에서 과발현될 수 있다(Gu *et al. Cancer Lett.* 99:185-189(1996); Ross *et al. Hum. Pathol.* 28:827-833(1997); Ross *et al. Cancer* 79:2162-2170(1997); 및 Sadasivan *et al. J. Urol.* 150:126-131(1993)). 래트 p185^{neu} 및 인간 ErbB2 단백질 산물에 대한 항체는 기재되어있다. 드레빈(Drebin)과 동료들은 래트 *neu* 유전자 산물 p185^{neu}에 대한 항체를 키웠다[예를 들어, Drebin *et al., Cell* 41:695-706(1985); Myers *et al., Meth Enzym.* 198:277-290(1991); 및 WO94/22478 참조]. 드레빈 등(Drebin *et al. Oncogene* 2:273-277(1988))은 p185^{neu}의 두 다른 영역과 반응성이 있는 항체의 혼합물이 누드 마우스에 이식된 *neu*-형질전환 NIH-3T3 세포에 상승적인 항암 효과를 나타낸다고 보고하였다(1998년 10월 20일자 미국특허 제5,824,311호 참조).

후지악 등[Hudziak *et al., Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172(1989)]은 인간 유방암 세포주 SKBR3를 사용하는 것이 특징인 항-ErbB2 항체의 패널 생성에 대해 기술하였다. 항체에 노출시킨 후에 SKBR3세포의 관련 세포 증식을 72시간후 단층의 결정 바이올렛 착색으로 측정하였다. 이 분석을 사용하여, 세포증식이 56% 억제된 4D5라 불리는 항체를 사용하여 최대 억제를 얻었다. 패널 중의 다른 항체는 이 분석에서 더 적은 양으로 세포증식을 감소시킨다. 또한, 항체 4D5는 TNF- α 의 세포독성 효과에 대해 ErbB2-과발현 유방암 세포주를 민감화하는 것으로 밝혀졌다(1997년 10월 14일자 미국특허 제 5,677,171호 참조). 후지악 등(Hudziak *et al.*)이 기술한 항-ErbB2 항체는 다른 문헌(Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al. In Vitro* 26(3):59A(1990); Sarup *et al. Growth Regulation* 1:72-82(1991); Shepard *et al. J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127(1991); Kumar *et al. Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986(1991); Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263(1993); Pietras *et al. Oncogene* 9:1829-1838(1994); Vitetta *et al. Cancer Research* 54:5301-5309(1994); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665(1994); Scott *et al. J. Biol. Chem.* 266:14300-5(1991); D'souza *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206(1994); Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465(1996); 및 Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394(1997))에 의해 더 특징화되었다.

제조함 인간화 형태의 쥐의 항-ErbB2 항체 4D5(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 또는 HERCEPTIN[®]; 미국특허 제 5,821,337호)는 광범위한 사전 항암치료를 받은 ErbB2-과발현 불안정 유방암 환자에서 임상적으로 활성이다(Baselga *et al., J. Clin. Oncol.* 14:737-744(1996)). HERCEPTIN[®]은 ErbB2 단백질을 과발현하는 불안정 유방암 환자의 치료를 위해 1998년 9월 25일자로 FDA로부터 시장 승인받았다.

다양한 특성을 지닌 다른 항-ErbB2 항체는 문헌{Tagliabue *et al. Int.J.Cancer* 47:933-937(1991); McKenzie *et al. Oncogene* 4:543-548(1989); Maier *et al. Cancer Res.* 51:5361-5369(1991); Bacus *et al. Molecular Carcinogenesis* 3:350-362(1990); Stancovski *et al. PNAS(USA)* 88:8691-8695(1991); Bucus *et al. Cancer Research* 52:2580-2589(1992); Xu *et al. Int.J.Cancer* 53:401-408(1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al. Cancer Research* 52:2771-2776(1992); Hancock *et al. Cancer Res.* 51:4575-4580(1991); Shawver *et al. Cancer Res.* 54:1367-1373(1994); Arteaga *et al. Cancer Res.* 54:3758-3765(1994); Harwerth *et al. J. Biol. Chem.* 267:15160-15167(1992); 미국특허 제5,783,186호; 및 Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109(1997)}에 기재되어 있다.

상동 스크리닝 결과, 두 개의 다른 ErbB 수용체군 요소를 동정하였다: ErbB3(미국특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호 및 Kraus *et al. PNAS(USA)* 86:9193-9197(1989)) 및 ErbB4(유럽특허 출원 제599,274호; Plowman *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:1746-1750(1993); 및 Plowman *et al., Nature*, 366:473-475(1993)). 이 두 수용체는 적어도 약간의 유방암 세포주에서 발현 증가를 나타낸다.

ErbB 수용체는 일반적으로 세포에서 다양한 조합을으로 나타나고, 헤테로다이머화는 다양한 ErbB 리간드에 대한 세포 반응의 차이를 증가시키는 것으로 생각된다(Earp *et al. Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132(1995)). EGFR은 6개의 다른 리간드로 결합된다: 표피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장 인자 알파(TGF- α), 앰피레굴린(amphiregulin), 헤파린 결합 표피 성장 인자(HB-EGF), 베타셀룰린(betacellulin) 및 에피레굴린(epiregulin)(Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257(1994)). 단일 유전자의 대체 접합으로 생긴 헤레굴린(heregulin) 단백질 군은 ErbB3 및 ErbB4에 대한 리간드이다. 헤레굴린군은 알파, 베타 및 감마 헤레굴린(Holmes *et al., Science*, 256:1205-1010(1992); 미국특허 제5,641,869호; 및 Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394(1997)); neu 분화인자(NDFs), 신경교 성장인자(GGFs), 아세틸콜린 수용체 유도 활성화(ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유래 인자(SMDF)를 포함한다[예를 들어, Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257(1994); Lemke, G. *Molec. & Cell.Neurosci.*7:247-262(1996) 및 Lee *et al.Pharm. Rev.* 47:51-85(1995) 참조]. 최근에는 세 개의 추가 ErbB 리간드가 동정되었다; ErbB3 또는 ErbB4를 결합시키는 것으로 보고된 뉴레굴린-2(neuregulin-2, NRG-2)(Chang *et al. Nature* 387 509-512(1997); 및 Carraway *et al Nature* 387:512-516(1997)); ErbB4를 결합시키는 뉴레굴린-3(Zhang *et al. PNAS(USA)* 94(18):9562-7(1997)); 및 ErbB4를 결합시키는 뉴레굴린-4-(Harari *et al.Oncogene* 18:2681-2689(1999)) HB-EGF, 베타셀룰린 및 에피레굴린도 ErbB4를 결합시킨다.

EGF 및 TGF α 는 ErbB2를 결합시키지는 않지만, EGF는 EGFR 및 ErbB2를 자극하여 헤테로다이머를 형성하고, 이것은 EGFR을 활성화시키고, 헤테로다이머에서 ErbB2의 인산전이반응을 일으킨다. 다이머화 및/또는 인산전이반응은 ErbB2 티로신 키나아제를 활성화시키는 것을 나타낸다(Earp *et al., supra* 참조). 이와 마찬가지로, ErbB3이 ErbB2와 공동발현되면, 활성화 신호 복합체가 형성되고, ErbB2에 대한 항체는 이 복합체를 분열시킬 수 있다(Sliwkowski *et al., J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665(1994)). 또한, 헤레굴린(HRG)에 대한 ErbB3의 친화성은 ErbB2와 공동발현될 때 더 높은 친화성상태로 증가한다[ErbB2-ErbB3 단백질 복합체에 대해서는 Levi *et al., Journal of Neuroscience* 15:1329-1340(1995); Morrissey *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435(1995); 및 ErBb2-ErbB3 단백질 복합체에 대해서는 Lewis *et al., Cancer Res.*, 56:1457-1465(1996) 참조]. ErbB3와 같이, ErbB4는 ErbB2와 함께 활성화 신호 복합체를 형성한다(Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8(1994)).

[발명의 개요]

일 실시형태에서, 본 발명은 ErbB2를 결합시키고, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체를 치료적 유효량으로 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 인간의 전립선암(예를 들어, 안드로겐 비의존성 전립선암) 치료방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 항체가 모노클로날 항체 2C4의 ErbB2로의 결합을 차단하고, 및/또는 마이토젠-활성 단백질 키나아제(MAPK)의 TGF- α 활성을 차단한다.

본 발명은 또한 화학요법제(예를 들어, 탁산) 및 ErbB2를 결합시키고, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체를 치료적 유효량으로 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 인간의 전립선암 치료방법을 제공한다.

다른 실시형태에서, 본 발명은 용기 및 그 안에 포함되는 조성물을 포함하고, 상기 조성물은 ErbB2를 결합시키고, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체를 포함하고, 또한 상기 조성물은 전립선암 치료에 사용될 수 있다는 것을 나타내는 포장 계시물을 더 포함하는 제품과 관련된다.

또한, 본 발명은 ErbB2를 결합시키는 항체를 치료적 유효량으로 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 인간의 안드로젠 의존성 전립선암 치료방법에 관한 것이다. 상기 방법은 선택적으로 인간의 전립선 특이적 항원(PSA) 지수를 증가시킨다. 일 실시형태에서, 항체는 ErbB2를 과발현하는 종양세포의 성장을 억제하는 모노클로날 항체 4D5(예를 들어, 인간화된 4D5)와 같은 것이다. 다른 실시형태에서, 상기 항체는 ErbB2 수용체의 리간드 활성을 차단하는 모노클로날 항체 2C4(예를 들어, 인간화된 2C4)와 같은 것이다. 상기 방법은 선택적으로 화학요법제, 바람직하게는 탁산을 인간에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

다른 실시형태에서, 본 발명은 용기 및 그 안에 포함되는 조성물을 포함하고, 상기 조성물은 ErbB2를 결합시키는 항체를 포함하고, 또한 상기 조성물이 안드로젠 의존성 전립선암의 치료에 사용될 수 있다는 것을 나타내는 포장 게시물을 더 포함하는 제품을 제공한다. 상기 포장 게시물을 선택적으로 탁산과 같은 화학요법제를 사용한 환자의 치료를 더 지시한다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

"ErbB 수용체"는 ErbB 수용체군에 속하고, EGFR, ErbB2, ErbB3 및 ErbB4 수용체를 포함하는 수용체 단백질 티로신 키나아제이고, 이 군의 다른 요소는 차후에 확인될 것이다. ErbB 수용체는 일반적으로 ErbB 리간드를 결합시킬 수 있는 세포의 도메인; 지방친화성 막투과 도메인; 보존된 세포내 티로신 키나아제 도메인; 및 인산화될 수 있는 몇몇 티로신 잔기를 포함하는 카르복실-말단 신호 도메인을 포함한다. ErbB 수용체는 "고유 서열" ErbB 수용체 또는 이의 "아미노산 서열 변형체"일 수 있다. ErbB 수용체는 고유 서열 인간 ErbB 수용체인 것이 바람직하다.

"ErbB1", "표피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"이라는 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고, 예를 들어, 문헌 {Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914(1987)}에 기재된 바와 같이 EGFR이라 하고, 이의 자연 발생 돌연변이 형성체(예를 들어, 결실 돌연변이 EGFR, Humphrey *et al. PNAS(USA)* 87:4207-4211(1990))를 포함한다. erbB1은 EGFR 단백질 산물을 암호화하는 유전자를 말한다.

"ErbB2" 및 "HER2"라는 표현은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고, 예를 들어, 문헌 {Semba *et al., PNAS(USA)* 82:6497-6501(1985) 및 Yamamoto *et al. Nature* 319:230-234(1986)}에 기재된 대로, 인간 HER2 단백질을 말한다 (Genebank accession number X03363). "erbB2"라는 용어는 인간 ErbB2를 암호화하는 유전자를 말하고, "neu"는 rat p185^{neu}를 암호화하는 유전자를 말한다. ErbB2는 고유 서열 인간 ErbB2인 것이 바람직하다.

"ErbB3" 및 "HER3"은 예를 들어, 문헌 {미국특허 제5,183,884호 and 제5,480,968호 및 Kraus *et al. PNAS(USA)* 86:9193-9197(1989)}에 개시된 바와 같이 수용체 폴리펩티드를 말한다.

본 명세서에서 "ErbB4" 및 "HER4"이라는 용어는 문헌 {예를 들어, 유럽특허 출원 제599,274호; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750(1993); 및 Plowman *et al., Nature*, 366:473-475(1993)}에 기재된 바와 같은 수용체 폴리펩티드이고, 문헌 {예를 들어, 1999년 4월 22일 공개된 WO99/19488}에 개시된 바와 같이 이의 이형체를 포함한다.

"ErbB 리간드"는 ErbB 수용체에 결합하거나 및/또는 활성화시키는 폴리펩티드를 의미한다. 본 명세서에서 특히 관심있는 ErbB 리간드는 표피 성장 인자(EGF)와 같은 고유 서열 인간 ErbB 리간드(Savage *et al., J. Biol. Chem.* 247:7612-7621(1972)); 형질전환 성장 인자 알파(TGF- α)(Marquardt *et al., Science* 223:1079-1082(1984)); 신경초종 또는 케라티노사이트 자가분비 성장 인자로도 알려진 엠페레굴린(Shoyab *et al. Science* 243:1074-1076(1989); Kimura *et al. Nature* 348:257-260(1990); 및 Cook *et al. Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557(1991)); 베타셀룰린(betacellulin)(Shing *et al., Science* 259:1604-1607(1993); 및 Sasada *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173(1993)); 헤파린-결합 표피 성장 인자(HB-EGF)(higashiyama *et al., Science* 251:936-939(1991)); 에피레굴린(Toyada *et al., J. Biol. Chem.* 270:7495-7500(1995); 및 Komurasaki *et al. Oncogene* 15:2841-2848(1997)); 헤파레굴린(하기 참조); 뉴레굴린-2(NRG-2)(Carraway *et al., Nature* 387:512-516(1997)); 뉴레굴린-3(NRG-3)(Zhang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567(1997)); 뉴레굴린-4(NRG-4)(Harari *et al. Oncogene* 18:2681-2689(1999)); 또는 크립토(crypto, CR-1)(Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335(1997))이다. EGFR를 결합시키는 ErbB 리간드는 EGF, TGF-

α , 앵피레굴린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에피레굴린을 포함한다. ErbB3을 결합시키는 ErbB 리간드는 헤레굴린을 포함한다. ErbB4를 결합시킬 수 있는 ErbB 리간드는 베타셀룰린, 에피레굴린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 및 헤레굴린을 포함한다.

본 명세서에서 사용된 "헤레굴린"(HRG)은 문헌{미국특허 제5,641,869호 또는 Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993)}에 개시된 바와 같이 헤레굴린 유전자 산물에 의해 암호화된 폴리펩티드를 말한다. 헤레굴린의 예로는, 헤레굴린- α , 헤레굴린- β 1, 헤레굴린- β 2 및 헤레굴린- β 3(Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210(1992); 및 미국특허 제 5,641,869호); neu 분화 인자(NDF)(Peles *et al.* *Cell* 69:205-216(1992)); 아세틸콜린 수용체-유도 활성(ARIA)(Falls *et al.* *Cell* 72:801-815(1993)); 신경교 성장 인자(GGFs)(Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318(1993)); 감각 및 운동 뉴런 유래 인자(SMDF)(Ho *et al.* *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532(1995)); γ -헤레굴린(Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394(1997))을 들 수 있다. 이 용어는 생물학적으로 활성인 단편 및/또는 EGF-유사 도메인 단편과 같은 고유 서열 HRG 폴리펩티드의 아미노산 서열 변형체(예를 들어, HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄)를 포함한다.

본 명세서에서 "ErbB 헤테로-올리고머"는 둘 이상의 다른 ErbB 수용체를 포함하는 올리고머와 비공유결합된다. 이러한 복합체들은 둘 이상의 ErbB 수용체를 발현하는 세포가 ErbB 리간드에 노출될 때 형성될 수 있고, 면역침전으로 분리되고, 문헌{예를 들어, Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665(1994)}에 기재된 바와 같이 SDS-PAGE로 분석될 수 있다. 이러한 ErbB 헤테로-올리고머의 예로는, EGFR-ErbB2, ErbB2-ErbB3 및 ErbB3-ErbB4 복합체를 들 수 있다. 또한, ErbB 헤테로-올리고머는 ErbB3, ErbB4 또는 EGFR과 같은 다른 ErbB 수용체와 결합된 둘 이상의 ErbB2 수용체를 포함할 수 있다. 사이토카인 수용체 하위단위(예를 들어, gp130)와 같은 다른 단백질들이 헤테로-올리고머에 포함될 수 있다.

"ErbB 수용체의 리간드 활성"이란 관심있는 ErbB 수용체를 포함하는 ErbB 헤테로-올리고머에 대한 ErbB 리간드 결합에 의해 매개된 신호 전달도입을 의미한다(예를 들어, 기질 폴리펩티드 또는 ErbB 수용체에서 티로신 잔기를 인산화하는 ErbB 수용체의 세포내 키나아제 도메인에 의한 것). 일반적으로, 이것은 헤테로-올리고머 내에서 하나 이상의 ErbB 수용체의 키나아제 도메인을 활성화시켜, 하나 이상의 ErbB 수용체에서 티로신 잔기의 인산화 및/또는 추가의 기질 폴리펩티드(들)에서 티로신 잔기의 인산화를 일으키는 ErbB 리간드의 ErbB 헤테로-올리고머로의 결합을 포함한다. ErbB 수용체 활성은 다양한 티로신 인산화 분석으로 정량화할 수 있다.

"고유 서열" 폴리펩티드는 자연에서 유래된 폴리펩티드(예를 들어, ErbB 수용체 또는 ErbB 리간드)와 동일한 아미노산 서열을 가진 것이다. 이러한 고유 서열 폴리펩티드는 자연으로부터 분리되거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 고유 서열 폴리펩티드는 자연 발생 인간 폴리펩티드, 쥐의 폴리펩티드, 또는 임의의 다른 포유류종의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

"아미노산 서열 변형체"라는 용어는 고유 서열 폴리펩티드와는 약간 다른 내용의 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드를 말한다. 보통, 아미노산 서열 변형체는 하나 이상의 고유 ErbB 리간드의 수용체 결합 영역 또는 하나 이상의 고유 ErbB 수용체의 리간드 결합 영역과 약 70% 이상의 상동성을 가지고, 바람직하게는 이러한 수용체 또는 리간드 결합 영역과 약 80% 이상, 더 바람직하게는 약 90% 이상 상동성을 가진다. 아미노산 서열 변형체는 고유 아미노산 서열의 아미노산 서열 내의 어떤 위치에서 치환, 결실, 및/또는 삽입된다.

"상동성"이란 필요시, 최대 퍼센트 상동성을 얻기 위해 서열을 정렬하고, 갭을 도입한 후 동일 아미노산 서열 변형체 중에서 잔기의 퍼센트로 정의된다. 정렬하기 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램 중 하나는 "정렬 2"(1991년 12월 10일자 United States Copyright Office, Washington, DC 20559에 사용자 문서로 제출된 Genentech사제)이다.

본 명세서에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 둘 이상의 온전한 항체 및 항체 단편에서 형성된 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적(bispecific) 항체)를 포함한다.

본 명세서에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종 항체 집단으로부터 얻은 항체를 말하며, 즉, 이 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항체 부위에 대해 지향되면 매우 특이적이다. 또한, 다른 결정인자(에피토프)에 대해 지향된 다른 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지향된다. 이의 특이성 이외에, 모노클로날 항체는 다른 항체로 오염되지 않고 합성될 수 있기 때문에 유리하다. 변형인자 "모노클로날"은 실질적으로

항체의 동종 집단으로부터 얻어진 것으로서의 항체 특성을 나타내고, 특정 방법에 의한 항체 생산에 필요한 것으로 해석되는 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 먼저 하이브리도마 방법(Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495(1975)) 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국특허 제4,816,567호)으로 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 문헌{예를 들어, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991)}에 기재된 방법으로 파지(phage) 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

본 명세서에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄 부분이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체종 또는 하위클래스에 속하는 항체의 대응 서열과 동일하거나 동종이고, 그쇄(들)의 나머지는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종으로부터 유래되거나, 다른 항체종 또는 하위클래스에 속하는 항체 및 이러한 항체들의 단편의 대응 서열과 동일하거나 동종인 "키메라" 항체를 포함한다(미국특허 제4,816,567호; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984)). 여기서 관심있는 키메라 항체는 비-인간 영장류(예를 들어, 고대 원숭이, 유인원 등) 및 인간 불변 영역 서열로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열을 포함하는 "영장류" 항체를 포함한다.

"항체 단편"은 바람직하게는 항원-결합 또는 이의 가변 영역을 포함하는 온전한 항체 부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 다이아바디(diabodies); 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

"온전한" 항체는 경쇄 불변 영역(C_L) 및 중쇄 불변 영역(C_H1, C_H2 및 C_H3) 뿐만 아니라 항원-결합 가변 영역을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 고유 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 고유 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변형체일 수 있다. 바람직하게는, 고유 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가진다.

항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역(고유 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변형체 Fc 영역)에 기여하는 생물학적 활성을 말한다. 항체 효과기 기능의 예로는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 식작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하부 조절 등을 들 수 있다.

중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 온전한 항체는 다른 "클래스"로 할당된다. 온전한 항체에는 5개의 주요 클래스가 있고: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 이들 중 몇몇은 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2와 같은 "하위클래스"(아이소타입)로 더 분리된다. 항체의 다른 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, β, ε, γ, 및 μ라 불린다. 다른 종류의 면역글로불린의 하부구조 및 3차원 배치는 잘 공지되어 있다.

"항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 자연 킬러(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)는 표적세포에 결합된 항체를 인식하고, 이어서 표적 세포를 용해시키는 세포-매개 반응을 말한다. ADCC, NK 세포를 매개하는 주요 세포는 FcγRIII 만을 발현하는 반면, 단핵세포는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌{Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92(1991)} 464 쪽 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 문헌(미국특허 제5,500,362호 또는 제 5,821,337호)에 기재된 바와 같이 생체의 ADCC 분석을 시행하였다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 자연 킬러(NK)세포를 포함한다. 대안적, 또는 추가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어, 문헌{Clynes *et al.* *PNAS(USA)* 95:652-656(1998)}에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다.

"인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcRs를 발현하고, 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이 세포는 적어도 FcγRIII를 발현하고, ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는, 말초 혈액 단핵세포(PBMC), 자연 킬러(NK) 세포, 단핵세포, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고; PBMCs 및 NK 세포를 가진 것이 바람직하다. 효과기 세포는 이의 고유 공급원, 예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMCs로부터 분리될 수 있다.

"Fc 수용체" 또는 "FcR"이라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하는데 사용된다. 바람직한 FcR은 고유 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)를 결합시키는 것이고, FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위클래스의 수용체를 포함하고, 이들 수용체의 대립형질 변형체 및 대안적으로 결합된 형태를 포함한다. FcγRII 수용체는 주로 세포질 도메인이 다른 유사 아미노산 서열을 가진 FcγRIIA("활성화 수용체") 및 FcγRIIB("억제 수용체")를 포함한다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성 모티프(ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프(ITIM)를 포함한다(M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997) 참조). FcRs는 문헌{Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92(1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34(1994); 및 de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)}을 참조한다. 앞으로 확인

될 것들을 포함하여, 다른 FcRs은 본 명세서에서 "FcR"이라는 용어로 포함된다. 이 용어는 또한 성숙 IgGs를 태아로 전달하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(Guyer *et al.*, *J.Immunol.* 117:587(1976) 및 Kim *et al.*, *J.Immunol.* 24:249 (1994)).

"보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재하에 표적을 용해하는 분자의 능력을 말한다. 보체 활성화 경로는 보체계(C1q)의 제1성분을 동종 항원과 혼합된 분자(예를 들어, 항체)에 결합시킴으로써 개시된다. 보체 활성을 평가하기 위하여, 문헌{Gazzano-Santoro *et al.*, *J.Immunol.Methods* 202:163(1996)}에 기재된 바와 같이 CDC 분석을 수행할 수 있다.

"고유 항체"는 일반적으로, 두 개의 동일한 경(L)쇄 및 두 개의 동일한 중(H)쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 헤테로테트라머 단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 이황화물 공유결합에 의해 중쇄에 연결되고, 이황화 결합의 수는 상이한 면역글로불린 아이소타입의 중쇄에서 다르다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 사슬내 이황화물 다리에 규칙적인 간격을 가진다. 각각의 중쇄는 한 단면에 가변 도메인(V_H)에 이어 다수의 불변 도메인을 가진다. 각 경쇄는 한 단면(V_L)에 가변 도메인을 가지고, 다른 단면에 불변 도메인을 가진다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특히 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 인터페이스를 형성하는 것으로 생각된다.

"가변"이라는 말은, 항체의 서열에서 가변 도메인의 특정 부분이 매우 다르고, 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용되는 것을 말한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 평등하게 분배되지 않는다. 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변영역이라 불리는 세 부분이 집중된다. 더 많이 보존된 가변 도메인 부분은 외곽 영역(FRs)이라 불린다. 고유 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 β -시트 배치를 크게 채택한, 세 개의 초가변영역으로 연결된, 고리 연결을 형성하는, 그리고 어떤 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는, 4개의 FRs를 포함한다. 각 사슬에서 초가변영역은 FRs에 의해 근접하여 모이고, 다른 사슬로부터 초가변영역과 함께 항체의 항원-결합부위의 형성에 기여한다(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관련되지는 않지만, 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC)에서 항체의 침전과 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

여기서 사용되는 "초가변영역"이란 말은 항원-결합을 일으키는 항체의 아미노산 잔기를 말한다. 초가변영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 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 "초가변고리"로부터의 이들 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia and Lesk *J. Mol.Biol.*196:901-917(1987))를 포함한다. "외곽구조 영역" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에서 정의된 초가변영역과는 다른 가변영역 잔기이다.

항체의 파파인(Papain) 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 가진 "Fab" 단편이라 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편, 및 쉽게 결정화하는 능력을 반영하는 이름을 가진 잔기 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리하면 두 항원-결합 부위를 가진 $F(ab')_2$ 단편을 수득하고, 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있다.

"Fv"는 완전 항원-인식 및 항원-결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단한 비공유 결합 중에 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 다이머로 구성된다. 이 배치에서, 각 가변 도메인의 세 개의 초가변영역이 상호작용하여 V_H - V_L 다이머의 표면에서 항원-결합 부위를 정의한다. 일괄적으로, 여섯 개의 초가변영역은 항체에 대해 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 대해 단지 세개의 초가변영역을 포함하는 Fv의 반)은 전체 결합 부위보다 친화력이 더 낮지만, 인식 능력을 가지고, 항원을 결합시킨다.

Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1불변 도메인(CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇몇 잔기를 부가하므로 Fab 단편과는 다르다. 여기서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 가지는 Fab'에 대해 지정된다. 원래 $F(ab')_2$ 항체 단편은 사이에 힌지 시스테인을 가진 Fab' 단편의 쌍으로 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학 결합도 공지되어 있다.

임의의 척추동물종으로부터 항체의 "경쇄"는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 카파(κ) 및 람다(λ)라 불리는 두 개의 명백히 다른 형태 중 하나로 할당된다.

"단일-사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 영역을 포함하고, 여기서 이들 영역은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 항원 결합을 위하여 scFv를 원하는 구조로 형성할 수 있는 V_H 및 V_L 영역 사이에 폴리펩티드 연결기를 더 포함한다. scFv에 대해서는 문헌{Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 11, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)}을 참조한다. 항-ErbB2 항체 scFv 단편은 문헌(WO93/16185; 미국특허 제5,571,894호; 및 미국특허 제5,587,458호)에 기재되어 있다.

"다이나마디"라는 용어는 두 개의 항원-결합 부위를 가진 작은 항체 단편을 말하고, 단편들은 동일한 폴리펩티드 사슬(V_H - V_L)에서 가변 경쇄 도메인(V_L)에 연결된 가변 중쇄 도메인(V_H)을 포함한다. 동일한 사슬에서 두 영역 사이가 짝지어 지도록 하기에는 너무 짧은 연결기를 사용하여, 도메인을 다른 사슬의 상보 도메인과 짝지어주고, 두 개의 항원-결합 부위를 생성한다. 다이나마디는 문헌{예를 들어, EP 404,097; WO93/11161; 및 Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)}에 더 상세히 기재되어 있다.

비-인간(예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소한의 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 대부분 인간화된 항체는 수용체의 초가변영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성, 및 수용력을 가진 쥐, 래트, 토끼 또는 비인간 영양류와 같은 비-인간종(공여 항체)의 초가변영역으로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린(수용 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 외곽 영역(FR) 잔기가 대응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 수용 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형체들은 또한 항체 성능을 정제하기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 하나 이상, 일반적으로는 둘 이상의 가변도메인 모두를 포함하고, 여기서 비-인간 면역글로불린 및 모든 또는 실질적으로 모든 FR의 경우에 대응하는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변고리는 인간 면역글로불린 서열의 초가변고리이다. 인간화된 항체는 선택적으로 또한 적어도 일부의 면역글로불린 불변영역(Fc), 일반적으로는 인간 면역글로불린 불변영역을 포함할 것이다. 상세하게는, 문헌{Johns *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.

인간화된 항-ErbB2 항체는 본 명세서에 참조문헌으로 통합된 미국특허 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®); 인간화된 520C9(WO93/21319) 및 하기 기재된 바와 같은 인간화된 2C4을 포함한다.

"분리된" 항체는 이의 자연환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및/또는 수집된 것을 말한다. 이의 자연환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료적 사용을 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질 또는 비단백 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 (1) 로우리법(Lowry method)으로 측정된 항체의 95중량% 이상, 및 가장 바람직하게는 99중량% 이상, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터(spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15 잔기 이상을 얻기에 충분한 정도, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 실버 스테인을 사용하여 감압 또는 비감압 상태에서 SDS-PAGE에 의한 동종으로 정제할 것이다. 항체의 자연환경의 성분 중 하나 이상은 존재하지 않기 때문에 분리된 항체는 원 위치의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 분리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 준비될 것이다.

관심있는 항체, 예를 들어, ErbB2를 "결합시키는" 항체는 충분한 친화력으로 항체를 결합시킬 수 있어서, 항원을 발현하는 세포를 표적화하는 치료제로서 유용한 항체를 말한다. 항체가 ErbB2를 결합시키는 항체인 경우, 그것은 일반적으로 다른 ErbB 수용체에 대립되는 ErbB2를 결합시키고, EGFR, ErbB3 또는 ErbB4와 같은 다른 단백질과 의미있는 교차반응하지 않는 것일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 항체를 이들 비-ErbB2 단백질(예를 들어, 내생 수용체에 결합하는 세포 표면)에 결합시키는 양은 형광 활성화 세포 소팅(FACS) 분석 또는 방사면역침전법(RIA)으로 측정하여 10% 미만일 것이다. 종종, 항-ErbB2 항체는 문헌{예를 들어, Schecter *et al.* *Nature* 312:513(1984) 및 Drebin *et al.*, *Nature* 312:545-548(1984)}에 기재된 바와 같이, 래트 *neu* 단백질과 의미있는 교차반응을 하지 않을 것이다.

ErbB 수용체의 리간드 활성을 "차단"하는 항체는 상기 정의된 바와 같은 이러한 활성을 감소시키거나 방해하는 항체이고, 상기 항체는 모노클로날 항체 4D5보다 실질적으로 더 효과적으로, 예를 들어, 거의 모노클로날 항체 7F3 또는 2C4 또는 이의 Fab 단편만큼 효과적으로, 바람직하게는 거의 모노클로날 항체 2C4 또는 이의 Fab 단편만큼 효과적으로 ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단할 수 있다. 예를 들어, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 항체는 ErbB 헤테로-올리고머의 형성을 차단하는 4D5보다 약 50-100% 더 효과적인 것일 수 있다. ErbB 수용체의 리간드 활성의 차단은 어떤 방법, 예를 들어, ErbB 수용체에 대한 리간드 결합, ErbB 복합체 형성, ErbB 복합체 중의 ErbB 수용체의 티로신 키나아제 활성 및/또는 티로신 키나아제 잔기(들)의 인산화를 방해하거나 또는 ErbB 수용체에 의해 일어날 수 있다. ErbB 수용체의 리간드 활

성을 차단하는 항체의 예로는, 모노클로날 항체 2C4 및 7F3(ErbB2/ErbB3 및 ErbB2/ErbB4 헤테로-올리고머의 HRG 활성; 및 EGF, TGF- α , 엠펙레굴린, HB-EGF 및/또는 EGFR/ErbB2 헤테로-올리고머의 에피레굴린 활성을 차단함); 및 EGFR, ErbB2, ErbB3 및 ErbB4를 발현하는 T47D 세포에 대한 EGF 및 NDF 결합을 차단하는 L26, L96 및 L288 항체를 포함한다[Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099-2109 (1997)].

2C4로 표시되는 모노클로날 항체와 같이, 표시된 항체의 "생물학적 특성"을 가진 항체는 동일한 항원(예를 들어, ErbB2)에 결합하는 다른 항체와 구별되는 그 항체의 생물학적 특성을 하나 이상 가진 항체를 말한다. 예를 들어, 2C4의 생물학적 특성을 가진 항체는 ErbB2, ErbB3 또는 ErbB4를 포함하는 ErbB 헤테로-올리고머의 HRG 활성을 차단하고; EGF, TGF- α , HB-EGF, EGFR 및 ErbB2를 포함하는 ErbB 수용체의 에피레굴린 및/또는 엠펙레굴린 활성을 차단하고; EGF, TGF- α 및/또는 MAPK의 HRG 매개 활성을 차단하고; 및/또는 2C4에 의해 결합된 ErbB2의 세포의 도메인 내의 동일한 에피토프를 결합시킬 수 있다(예를 들어, 모노클로날 2C4의 ErbB2로의 결합을 차단함).

달리 언급하지 않는 한, "모노클로날 항체 2C4"라는 표현은 하기 실시예의 쥐의 2C4 항체의, 또는 이로부터 유래된 항원 결합 잔기를 가진 항체를 말한다. 예를 들어, 모노클로날 항체 2C4는 쥐의 모노클로날 항체 2C4 또는 쥐의 모노클로날 항체 2C4의 아미노산 잔기를 결합시키는 항원을 가진, 인간화된 2C4와 같은 이의 변형체일 수 있다. 인간화된 2C4 항체의 예는 하기 실시예 3에 제공된다. 달리 나타내지 않으면, 본 명세서에서 사용된 "rhuMAb 2C4"라는 표현은 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에 의해 임의로 발현된 인간 경쇄 및 중쇄 IgG1(비-A 알로타이프) 불변영역 서열에 융합된, 각각 SEQ ID Nos. 3 및 4의 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH) 서열을 말한다.

달리 나타내지 않으면, "모노클로날 항체 4D5"라는 용어는 쥐의 4D5 항체(ATCC CRL 10463)의, 또는 이로부터 유래된 항원 결합 잔기를 가진 항체를 말한다. 예를 들어, 모노클로날 항체 4D5는 쥐의 모노클로날 항체 4D5 또는 쥐의 모노클로날 항체 4D5의 항원 결합 잔기를 가진 인간화된 4D5와 같은 이의 변형체일 수 있다. 인간화된 4D5 항체의 예로는 미국특허 제5,821,337호에 기재된 바와 같이, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®])을 들 수 있고, huMAb4D5-8은 인간화된 4D5 항체인 것이 바람직하다.

본 명세서에서 사용된 "성장 억제제"는 세포, 특히 생체내 또는 생체의 종양세포를 발현하는 ErbB의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 말한다. 따라서, 성장 억제제는 S 상에서 ErbB 발현 퍼센트를 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예로는, G1 어레스트(arrest) 및 M-상 어레스트를 유도하는 약제와 같이, 세포 순환 진행을 (S 상과는 다른 곳에서) 차단하는 약제를 들 수 있다. 고전적인 M-상 차단제로는 빈카스(vincas)(빈크리스틴(vincristine) 및 빈블라스틴(vinblastine)), 타산(taxanes), 및 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 도노루비신(daunorubicin), 에토포사이드(etoposide), 및 블레오마이신(bleomycin)과 같은 토포(topo)II 억제제가 있다. G1을 어레스트하는 이들 약제는 예를 들어, 타목시펜(tamoxifen), 프레드니손(prednisone), 다카르바진(dacarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시스플라틴(cisplatin), 메토폭세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 및 아라-C(ara-C) 등의 DNA 알킬화제와 같은 S-상 어레스트로 넘친다. 더 많은 정보는 문헌{ *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakamo *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995) 특히, p 13}에서 찾을 수 있다.

"성장 억제제" 항체의 예로는, ErbB2에 결합하고, ErbB2를 과발현하는 종양세포의 성장을 억제하는 것들을 들 수 있다. 바람직한 성장 억제제인 항-ErbB2 항체는 약 0.5 내지 30 μ g/ml의 항체 농도에서 20% 이상, 및 바람직하게는 50% 이상(예를 들어, 약 50% 내지 약 100%) 배양된 세포 중의 SK-BR-3 유방암 세포의 성장을 억제하고, 성장 억제는 SK-BR-3 세포를 항체에 노출시킨 후 6일만에 결정한다(1997년 10월 14일자 미국특허 제5,677,171호 참조). SK-BR-3 세포 성장 억제 분석은 상기 특허 및 하기에 더 상세히 기재된다.

"세포사멸을 유도하는" 항체는 생존가능한 세포를 생존불가능한 세포로 만드는 것이다. 세포는 일반적으로 ErbB2 수용체를 발현하는 것이고, 특히, 상기 세포는 ErbB2 수용체를 과발현한다. 바람직하게는, 상기 세포는 종양세포, 예를 들어, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 생체외에서, 상기 세포는 SK-BR-3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 생체외 세포사멸은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)에 의해 유도된 세포사멸을 구별하는 보체 및 면역 효과기 세포 부재로 결정될 수 있다. 따라서, 세포사멸 분석은 열 비활성 혈청을 사용하거나(즉, 보체 부재하에서) 면역 효과기 세포 부재하에서 수행할 것이다. 항체가 세포사멸을 유도할 수 있는지 결정하기 위하여, 요오드화 프로피듐(propidium iodide,

PI), 트립판 블루(Moore *et al. Cytotechnology* 17:1-11(1995) 참조) 또는 7AAD를 흡수하여 평가한 바와 같은 막 무결성의 손실을 미처리된 세포와 비교하여 평가할 수 있다. 바람직한 세포사멸-유도 항체는 BT474 세포에서 PI 흡수 분석에서 PI 흡수를 유도하는 것이다(하기 참조).

"세포사멸을 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 분열, 세포감소, 내형질세망 확장, 세포분열, 및/또는 막소포(세포사멸체라고 불림)의 형성으로 결정된 바와 같이 프로그램된 세포사멸을 유도하는 것이다. 상기 세포는 일반적으로 ErbB2 수용체를 과발현하는 것이다. 상기 세포는 예를 들어, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포와 같은 종양세포인 것이 바람직하다. 생체외에서, 상기 세포는 SK-BR-3, BR474, Calu3 세포, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 세포사멸(apoptosis)과 관련된 세포의 추이를 평가하기 위한 방법은 다양하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린(PS)의 위치이동은 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고; DNA 분열은 DNA 래더링(raddding)을 통해 평가될 수 있고; DNA 분열과 함께 핵/염색질 축합은 저이배체(hypodiploid) 세포의 어떤 증가에 의해 평가될 수 있다. 세포사멸을 유도하는 항체는 BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석에서 미처리된 세포와 비교하여 아넥신 결합 유도의 약 2 내지 50 구배, 바람직하게는 약 5 내지 50 구배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50 구배인 것이 바람직하다(하기 참조). 종종 프로-아폽토틱(pro-apoptotic) 항체는 ErbB 수용체의 ErbB 리간드 활성을 더 차단하는 것일 수 있고(예를 들어, 7F3 항체); 즉, 항체는 모노클로날 항체 2C4와 생물학적 특성을 공유한다. 다른 상황에서, 항체는 ErbB 수용체(예를 들어, 7C2)의 ErbB 리간드 활성을 상당히 차단하지 않는 것이다. 또한, 항체는 세포사멸을 유도하는 동안, S 상에서 세포의 퍼센트를 크게 감소시키지 않는 7C2와 같은 것(예를 들어, 대조구에 비해, 이들 세포를 약 0-10%로만 감소시키는 것)일 수 있다.

"에피토프 2C4"는 항체 2C4가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 문헌{*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)}에 기재된 바와 같이 통상의 교차-차단 분석이 수행될 수 있다. 이와 달리, 에피토프 지도화는 항체가 ErbB2의 2C4 에피토프에 결합하는지를 평가하기 위하여 수행될 수 있다(예를 들어, ErbB2의 잔기 22 내지 잔기 584 영역 내의 하나 이상의 잔기 포함; 도 1a-b 참조).

"에피토프 4D5"는 항체 4D5(ATCC CRL 10463)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프는 ErbB2의 막투과 도메인에 인접해있다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 문헌{*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)}에 기재된 바와 같이 통상의 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 이와 달리, 에피토프 지도화는 항체가 ErbB2의 4D5 에피토프에 결합하는지 평가하기 위해 수행될 수 있다(예를 들어, 잔기 529 내지 잔기 625 영역 내의 하나 이상의 잔기 포함; 도 1a-b 참조).

"에피토프 3H4"는 항체 3H4가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프는 ErbB2 세포외 도메인의 아미노산 서열내의 약 541 내지 약 599의 잔기를 포함한다(도 1a-b 참조).

"에피토프 7C2/7F3"는 7C2 및/또는 7F3 항체(각각 ATCC와 침전됨, 하기 참조)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인의 N 말단의 영역이다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 문헌{*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)}에 기재된 바와 같이 통상의 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 이와 달리, 에피토프 지도화는 항체가 ErbB2 상의 7C2/7F3 에피토프에 결합하는지를 입증하기 위하여 수행될 수 있다(예를 들어, ErbB2의 잔기 22 내지 잔기 53의 영역 내의 하나 이상의 잔기; 도 1a-b 참조).

"치료"는 치료적 처리 및 예방 또는 방지법을 말한다. 치료할 필요가 있는 것은 이미 질병이 있는 것 뿐만 아니라 질병을 막아야 하는 것이다. 따라서, 여기서 치료될 포유류는 질병이 있다고 진단받거나, 질병에 걸리기 쉬운 것들이다.

치료하기 위한 "포유류"는 인간, 가정 및 농장의 동물, 및 개, 말, 고양이, 소 등의 동물원, 스포츠, 또는 애완용 동물을 포함하는 포유류로 분류되는 임의의 동물을 말한다.

"치료적 유효량"이라는 용어는 포유류에서 질병이나 장애를 치료하기 위해 효과적인 약제의 양을 말한다. 암인 경우, 약제의 치료적 유효량은 종양 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기를 감소시키고; 주변 기관으로의 종양세포 증식을 억제하고(즉, 어느 정도 느리게하거나, 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고(즉, 어느 정도 느리게하거나, 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제하고; 및/또는 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화시킬 수 있다. 존재하는 종양 세포의 성장을 방해하고 및/또는 죽일 수 있는 약제의 양은, 세포증식억제 및/또는 세포독성일 수 있다. 암치료를 위해, 예를 들면, 질병 진행시간(TTP) 및/또는 반응속도 결정(RR)을 평가하여 효율성을 측정할 수 있다.

"암" 및 "암의"라는 용어는 일반적으로 비조절된 세포 성장이 특징인 포유류의 생리학적 상태를 말하거나 기술한다. 암의 예로는, 암, 림프종, 아세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프종양을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 암의 예로는 특히, 편평세포암(예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포폐암, 비-소세포폐암, 폐의 선암 및 폐의 편평암을 포함하는 폐암, 복막암, 간세포암, 위장관암을 포함하는 위암, 췌장암, 교아종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막암, 타액선암, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암, 항문암, 음경암 뿐만 아니라 두경부암을 포함한다.

"ErbB-발현 암"은 이의 세포표면에 ErbB 단백질을 가진 세포를 포함하는 것이다. "ErbB2-발현 암"은 이의 세포표면에 충분한 수준의 ErbB2를 제공하므로, 항-ErbB2 항체가 여기에 결합하여, 암에 대해 치료적 효과를 가진다.

ErbB 수용체의 "과도한 활성이 특징인" 암은 암세포 내의 ErbB 수용체 활성량이 동일한 조직형태의 비-암세포 내의 수용체의 활성 수준을 상당히 초과하는 것이다. 이러한 과도한 활성은 ErbB 수용체의 과발현 및/또는 암세포 내에서 ErbB 수용체를 활성화할 수 있는 보통 수준보다 큰 ErbB 리간드 때문에 생길 수 있다. 이러한 과도한 활성은 종양세포의 악성 상태의 원인 및/또는 결과일 수 있다. 일부 실시형태에서는, ErbB 수용체의 증식 및/또는 과발현이 이러한 과도한 활성의 ErbB 수용체를 발생시키는 지 결정하기 위해 암을 진단 또는 예방 분석할 것이다. 이와 달리, 또는 추가적으로, 수용체의 과도한 활성에 기인하는 암에서 ErbB 리간드의 증식 및/또는 과발현이 발생하는지를 결정하기 위해 암을 진단 또는 예방 분석할 수 있다. 이러한 암의 일부에서, 수용체의 과도한 활성은 자가분비 자극 경로에 기인한다.

"자가분비" 자극 경로에서, 자기 자극은 ErbB 리간드 및 이의 동종 ErbB 수용체를 모두 생성하는 암세포에 의해 발생한다. 예를 들어, 암은 ErbB를 발현 또는 과발현하고, 또한 EGFR 리간드(예를 들어, EGF, TGF- α 또는 HB-EGF)를 발현 또는 과발현한다. 다른 실시형태에서, 암은 ErbB2를 발현 또는 과발현하고, 헤레굴린(예를 들어, γ -HRG)을 발현 또는 과발현한다.

ErbB 수용체를 "과발현"하는 암은 이의 세포표면에서 동일한 조직형태의 암이 아닌 세포에 비해 상당히 고수준의 ErbB2와 같은 ErbB 수용체를 가지는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 기인할 수 있다. ErbB 수용체 과발현은 세포 표면에 존재하는 ErbB 단백질의 증가된 수준을 평가함으로써 진단 또는 예방 분석에서 결정될 수 있다(예를 들어, 면역조직화학 분석, IHC). 이와 달리, 또는 추가적으로, 예를 들어, 세포내 형광 하이브리드형성을 통하여; (FISH; 1998년 10월 공개된 WO98/45479 참조), 사우던 블롯팅, 또는 실시간 정량 PCR(RT-PCT)과 같은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 통하여, 세포 내의 ErbB-암호화 핵산의 수준을 측정할 수 있다. 또한, 혈청과 같은 생물학적 유체에서 흘러나온 항원(예를 들어, ErbB 세포의 도메인)을 측정하여 ErbB 수용체 과발현을 연구할 수도 있다(1990년 6월 12일자 미국특허 제4,933,294호; 1991년 4월 18일 공개된 WO91/05264; 1995년 3월 28일자 미국특허 제5,401,638호; 및 Sias *et al.* *J.Immunol.Methods* 132:73-80(1990) 참조). 상기 분석 이외에, 기술자들에게는 다양한 생체내 분석이 사용가능하다. 예를 들어, 환자의 체내 세포를 선택적으로 방사성 동위원소와 같은 검출가능한 표지로 표지된 항체에 노출시키고, 방사성 외부 스캐닝 또는 미리 항체에 노출시킨 환자로부터 얻은 생검(biopsy)을 분석하여 방사성 항체가 환자의 세포에 결합하는 것을 평가할 수 있다.

이와 반대로, "ErbB2 수용체의 과발현이 특징이 아닌" 암은 진단 분석에서 동일한 조직형태의 암이 아닌 세포에 비해 ErbB2 수용체를 보통 수준보다 더 높게 발현하지 않는 것이다.

ErbB 리간드를 "과발현"하는 암은 동일한 조직형태의 암이 아닌 세포에 비해 상당히 높은 수준의 리간드를 생성하는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 기인할 수 있다. ErbB 리간드의 과발현은 예를 들면, 종양 생검에서 또는 상기 IHC, FISH, 사우던 블롯팅, PCR 또는 생체내 분석으로 환자의 리간드(또는 이를 암호화하는 핵산)의 수준을 평가함으로써 진단적으로 결정될 수 있다.

"호르몬-비의존성" 암은 이의 증폭이 암세포에 의해 발현된 수용체에 결합하는 호르몬의 존재와 무관한 것이다. 이러한 암은 종양에서 또는 종양 근처에서 호르몬의 농도를 감소시키는 약리학적 또는 외과용 방법의 투여에서 임상적 경감을 진행시키지 않는다. 호르몬-비의존성 암의 예로는 안드로겐-비의존성 전립선암, 에스트로겐-비의존성 유방암, 자궁내막암 및 난소암을 들 수 있다. 이러한 암은 호르몬-의존성 종양으로 시작하고, 호르몬-민감성 단계에서 호르몬-면역성 종양에 이어 항-호르몬 치료로 진행된다.

여기서 사용된 "세포독성제"이라는 용어는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고, 및/또는 세포를 파괴시키는 물질을 말한다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독신과 같은 독신 또는 박테리아, 균, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독신을 포함하고, 단편 및/또는 이의 변형체를 포함한다.

"화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는, 티오테파(thiotepa) 및 사이클로포스파미드(CYTOXANTM)과 같은 알킬화제; 부설판(busulfan), 임프로설판(improsulfan) 및 피포설판(piposulfan)과 같은 알킬 설포네이트; 벤조도파(benzodopa), 카르보퀸(carboquon), 메처도파(meturedopa) 및 유레도파(uredopa)와 같은 아지리딘(aziridines); 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸톨로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 클로람부실(chlorambucil), 클로르나파진(chlornaphazine), 콜로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라머스틴(estramustine), 이포스파미드(ifsosamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란(melphalan), 노베티친(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니머스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard)와 같은 질소 머스타드; 카르머스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포테머스틴(fotemustine), 로머스틴(lomustine), 니머스틴(nimustine), 라니머스틴(ranimustine)과 같은 나이트로소유레아; 액클라시노마이신(aclacinomysins), 액티노마이신(actinomycin), 오토라마이신(authramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins), 캅티노마이신(cactinomycin), 칼리키아마이신(calicheamicin), 카라비신(carabycin), 카르미노마이신(carminomycin), 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이신(chromomycins), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin), 아이다루비신(idarubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신(mitomycins), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 펄로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 푸로마이신(puromycin), 퀘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin)과 같은 항생물질; 메토크렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 대사산물; 데노프테린(denopterin), 메토크렉세이트, 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate)와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토푸린(6-mercaptopurine), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine)과 같은 푸린 유사체; 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자우리딘(6-azauridine), 카모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 디데옥시우리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록스우리딘(floxuridine), 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론(calusterone), 드로모스타놀론 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 테스트락톤(testolactone)과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 미토탄(mitotane), 트릴로스탄(trilostane)과 같은 항-아드레날; 프롤린산(frolineic acid)과 같은 엽산 보충액; 알도포스파미드 글리코사이드(aldophosphamide glycoside); 아미노레블린산(aminolevulinic acid); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트락세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 데메콜신(demecolcine); 디아지퀸(diaziquone); 엘포르니틴(elformithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에토글루시드(etoglucid); 갈륨 나이트레이트(gallium nitrate); 하이드록시유레아(hydroxyurea); 렌티난(lentinan); 로니다민(lonidamine); 미토구아존(mitoguazone); 미톡산트론(mitoxantrone); 모피다몰(mopidamol); 니트라크린(nitracrine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 피라루비신(pirarubicin); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하이드라자이드; 프로카르바진(procabazine); PSK[®]; 라족산(razoxane); 시조피란(sizofiran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테뉴아존산(tenuazonic acid); 트리아지퀸(triaziquone); 2, 2', 2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신(vindesine); 다카르바진(dacarbazine); 만노머스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미톨락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가사이토신(gacytosine); 아라비노사이드(arabinoside, "Ara-C"); 사이클로포스파미드(cyclophosphamide); 티오테파(thiotepa); 탁산, 예를 들면, 파클리탁셀(paclitaxel, TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 및 도세탁셀(docetaxel, TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 겐시타빈(gemcitabine); 6-티오구아닌(6-thioguanine); 머캅토푸린(mercaptopurine); 메토크렉세이트; 시스플라틴(cisplatin) 및 카르보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(etoposide, VP-16); 이포스파미드(ifsosamide); 미토마이신 C; 미톡산트론(mitoxantrone); 빈크리스틴; 비노렐빈(vinorelbine); 나벨빈(navelbine); 류코보린(LV), 노반트론(novantrone); 테니포사이드(teniposide); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); CPT-11; 토포아이소머라제(topoisomerase) 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티산(retinoic acid); 에스페라마이신(esperamicins); 카페시타빈(capecitabine); 및 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 상기 어떤 것의 유도체를 들 수 있다. 또한, 이 정의 내에 포함되는 것은 예를 들어, 타목시펜(tamoxifen), 랄옥시펜(raloxifene), 4(5)-이미다졸을 억제하는 아로마타제, 4-하이드록시타

목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜(keoxifene), LY117018, 오나프리스톤(onapristone), 및 토레미펜(toremifene, Fareston)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 플루타미드(flutamide), nil루타미드(nilutamide), 바이칼루타미드(bicalutamide), 류프롤라이드(leuprolide), 및 고세렐린(goserelin)과 같은 항-안드로겐과 같은 종양에서 호르몬 작용을 규제 또는 억제하기 위해 작용하는 항-호르몬제; 및 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 상기 어떤 것의 유도체이다.

"사이토카인"이라는 말은 일반적으로 세포내 매개체로서 다른 세포 상에 작용하는 한 세포 집단에 의해 방출된 단백질을 말한다. 이러한 사이토카인의 예로는, 림포카인, 모노카인, 및 전통적인 폴리펩타이드 호르몬을 들 수 있다. 사이토카인에는, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소의 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 소포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 루테인화 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사인자- α 및 - β ; 뮐러(Mullerian)-억제 물질; 쥐의 고나도트로핀-관련 펩타이드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 혈전형성(thrombopoietin, TPO); NGF- β 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판 성장 인자; TGF- α 및 TGF- β 와 같은 형질전환 성장 인자(TGFs); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도(osteoinductive) 인자; 인터페론- α , - β , 및 - γ 와 같은 인터페론; 매크로파지-CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(CSFs); 과립구-매크로파지-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12와 같은 인터류킨(ILs); TNF- α 또는 TNF- β 와 같은 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 키티 리간드(KL)를 포함하는 다른 폴리펩타이드 인자가 포함된다. 여기서 사용된 바와 같이, 사이토카인이라는 말은 자연공급원 또는 제조합 세포 배양 및 생물학적으로 활성인 동등한 고유 서열 사이토카인으로부터의 단백질을 포함한다.

본 명세서에서 사용된 "EGFR-표적 약제"라는 말은 EGFR 수용체에 결합하고, 선택적으로는 EGFR 수용체 활성을 억제하는 치료제를 말한다. 이러한 약제의 예로는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 들 수 있다. EGFR에 결합하는 항체의 예로는 MAb579(ATCC CRL HB 8506), MAb455(ATCC CRL HB8507), MAb225(ATCC CRL 8508), MAb528(ATCC CRL 8509)(미국특허 제4,943,533호, Mendelsohn *et al.* 참조) 및 키메라 225(C225) 및 재형성 인간 255(H255)와 같은 이의 변형체(WO 96/40210, Imclone System Inc. 참조); 타입 II 돌연변이 EGFR을 결합시키는 항체(미국특허 제5,212,290호); 미국특허 제5,891,996호에 기재된 바와 같은 EGFR을 결합시키는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR을 결합시키는 인간 항체(WO98/50433, Abgenix)를 들 수 있다. 항-EGFR 항체는 세포독성제와 접합되어, 면역접합체를 생성할 수 있다(예를 들어, EP659,439A2, Merck Patent GmbH 참조). EGFR을 결합시키는 소분자의 예로는, ZD1839(Astra Zeneca), CP-358774(OSI/Pfizer) 및 AG1478을 들 수 있다.

"항-맥관형성제"는 맥관 발육을 어느 정도 차단 또는 방해하는 화합물을 말한다. 항-맥관형성 인자는 예를 들면, 맥관형성 촉진과 관련된 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 여기서, 바람직한 항-맥관형성 인자는 맥관 내피 성장 인자(VEGF)에 결합하는 항체이다.

본 출원서에서 사용되는 "프로드러그"라는 말은 모약제(parent drug)에 비해 종양세포에 대한 세포 독성이 적고, 효소 활성화되거나 더 활성인 모형태로 전환되는 약제학적 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 말한다(예를 들면, Wilman, *Prodrugs in Cancer Chemotherapy* "Biochemical Society Transactions", 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, "Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985) 참조). 본 발명의 프로드러그는 인산염-함유 프로드러그, 티오인산염-함유 프로드러그, 황산염-함유 프로드러그, 펩타이드-함유 프로드러그, D-아미노산-변형 프로드러그, 글리코실화 프로드러그, β -락탐-함유 프로드러그, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 프로드러그 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드러그, 5-플루오로사이토신 및 더 활성인 세포독성이 없는 약제로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 프로드러그를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기 위한 프로드러그 형태로 유도될 수 있는 세포독성제의 예로는 상기 화학요법제를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

"리포솜"은 다양한 형태의 지질, 인지질 및/또는 약제(본 명세서에 기재된 항-ErbB2 항체 및 선택적으로는 화학요법제 등)를 포유류에 전달하는데 유용한 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포솜의 성분은 일반적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사하게 2층형으로 배열된다.

"포장 삽입물"이라는 말은 지시, 용도, 투여량, 투여, 금기 및/또는 이러한 치료 생성물의 사용에 관한 경고에 대한 정보를 담은 치료 생성물의 상업적 포장에 포함된 통상적인 지시물을 말한다.

"심장보호물(cardioprotectant)"은 안트라사이클린(anthracycline) 항생제 및/또는 항-ErbB2 항체와 같은 약제를 환자에게 투여한 것과 관련하여 심근 기능장애(즉, 심근증 및/또는 충혈 심부전)를 예방하거나 감소시키는 화합물 또는 조성물이다. 심장보호물은 예를 들면, 자유-라디칼-매개 심장독성 효과를 차단 또는 감소시키고 및/또는 산화-스트레스 손상을 예

방 또는 감소시킬 수 있다. 본 정의에 포함되는 심장보호물의 예로는, 철-킬레이트화제 텍스라죽산(dexrazoxane, ICRF-187)(Seifert *et al. The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072(1994)); 지질-저하제 및/또는 프로부콜(probucol)과 같은 항-산화제(Singal *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063(1995)); 아미포스틴 (WR-2721로도 불리는 아미노티올 2-[(3-아미노프로필)아미노]에탄에티올-이수소 인산염 에스테르 및 WR-1065로도 불리는 이의 탈인산염화 세포용해 형태) 및 S-3-(3-메틸아미노프로필아미노)프로필포스포로티오산(WR-151327), Green *et al. Cancer Research* 54:738-741(1994) 참조); 디곡신(digoxin)(Bristow, M.R.In: Bristow MR, ed. *Drug-Induced Heart Disease*, New York: Elsevier 191-215(1980)); 메토프롤롤과 같은 베타-차단제(Hjalmarson *et al. Drugs* 47: Suppl 4:31-9(1994); and Shaddy *et al. Am. Heart J.* 129:197-9(1995)); 비타민 E; 아스코르브산(비타민 C); 올리놀산, 우솔산(ursolic acid) 및 N-아세틸시스테인(NAC)과 같은 자유라디칼 스캐빈저; 알파-페닐-3차-부틸 나이트론(PBN)과 같은 스핀 트랩핑 화합물; (Paracchini *et al., Anticancer Res.* 13:1607-1612(1993)); P251(Elbesen)과 같은 셀레노유기 화합물 등을 들 수 있다.

II. 항-ErbB2 항체 제조

본 발명에 따라 사용된 항체를 제조하기 위한 실시예 방법을 하기에 설명한다. 항체 제조에 사용되는 ErbB2 항원은 예를 들면, 원하는 에피토프를 함유하는 ErbB2의 세포외 도메인의 가용성 형태 또는 이의 일부일 수 있다. 이와 달리, 이의 세포 표면에서 ErbB2를 발현하는 세포(예를 들어, ErbB2를 과발현하기 위해 형질전환된 NIH-3T3 세포; 또는 SKBR3 세포와 같은 암세포주, Stancovski *et al. PNAS(USA)* 88:8691-8695(1991) 참조)는 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 항체 생성에 유용한 다른 형태의 ErbB2는 당해 기술분야의 기술자들에게 명백하다.

(i) 폴리클로날 항체

폴리클로날 항체는 적당한 항원 및 보강제를 동물에 다중 피하(sc) 또는 내복막(ip) 주사하여 증가시키는 것이 바람직하다. 적당한 항원은 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통해 접합), N-하이드록시숙신이미드(리신 잔기를 통해 접합), 글루타알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 상이한 알킬기이다)과 같은 이작용성 또는 유도화제를 사용하여 예를 들어, 키홀 림피트(keyhole limpet) 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소의 티로글로불린, 또는 소이빈 트립신 억제제와 같은, 면역화될 종의 면역원성 단백질과 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체(각각 래빗 또는 마우스용)를 3 부피의 프론트 완전보강제와 결합시키고, 이 용액을 다양한 부위에 내피 주사하여 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 동물들을 면역시킨다. 한달 후, 동물들을 다양한 부위에서 피하주사로 프론트 완전보강제 내의 처음 양의 펩타이드 또는 접합체를 1/5 내지 1/10로 추가자극하였다. 7 내지 14일 후, 동물들에서 채혈하고, 항체 적정을 위해 혈청을 분석하였다. 동물들을 적정 정점까지 추가자극하였다. 바람직하게는, 동물들을 다른 단백질과 접합시키고 및/또는 다른 교차-결합 시약을 통한 것을 제외하고는 동일한 항원의 접합체로 추가자극하였다. 접합체들은 또한 단백질 융합과 같은 재조합 세포 배양에서 제조할 수 있다. 또한, 명반(alum)과 같은 밀집제는 면역 반응을 강화하는데 적합하게 사용된다.

(ii) 모노클로날 항체

모노클로날 항체는 실질적으로 동종 항체 집단에서 얻어지고, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형 "모노클로날"은 별개의 항체 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다.

예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌{Kohler *et al., Nature*, 256:495(1975)}에 처음 기재된 하이브리도마법을 사용하여 제조하거나, 재조합 DNA 방법(미국특허 제4,816,567호)으로 제조한다.

하이브리도마법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 다른 적당한 숙주 동물은 상기와 같이 면역되어, 구체적으로는 면역화에 사용되는 단백질에 결합하는 항체를 생성하는 또는 생성시킬 수 있는 림프구를 이끌어낸다. 이와 달리, 림프구는 생체외에서 면역화될 수 있다. 그리고 나서, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 융합제를 사용하여 골수종 세포와 융합하여, 하이브리도마 세포를 형성한다[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103(Academic Press, 1986)].

따라서, 제조된 하이브리도마 세포는 시드되고, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적당한 배지에서 성장한다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포릴보실 전이효소(HGPRT 또는 HPRT)가 부족하면, 하이브리도마를 위한 배지는 일반적으로 하이포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘(HAT 매질)을 포함하고, 이 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 막는다.

바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합한, 선택된 항체-생성 세포에 의해 항체의 안정한 고수준 제조를 유지하고, HAT 매질과 같은 매질에 민감한 것이다. 이 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA로부터 입수가능) 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA로부터 입수가능)로부터 유래된 것과 같은 쥐의 골수종 주이다. 인간 골수종 및 쥐-인간 헤테로골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 기재되었다[Kozbor, *J.Immunol.*, 133:3001(1984); 및 Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

항원에 대한 모노클로날 항체의 생성을 위해 하이브리도마 세포가 성장하는 배지를 분석한다. 바람직하게는, 면역침전 또는 방사선면역분석(RIA) 또는 효소-결합 면역흡수분석(ELISA)과 같은 생체의 결합 분석을 사용하여 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 결정한다.

모노클로날 항체의 결합 특이성은, 예를 들면, 스캐차드(Scatchard) 분석으로 결정할 수 있다[Munson *et al.*, *Anal.Biochem.*, 107:220(1980)].

하이브리도마 세포가 원하는 특이성, 친화성, 및/또는 활성의 항체를 생성한다고 확인된 후, 클론들은 희석 과정을 제한하여 서브클로닝되고, 표준법으로 성장시킬 수 있다[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103(Academic Press, 1986)]. 이 목적에 적합한 배지는 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 매질을 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물의 복수 종양으로서 생체내에서 성장할 수 있다.

서브클로닝에 의해 분리된 모노클로날 항체는 예를 들면, 단백질 A-세파로즈, 하이드록실아파타이트(hydroxylapatite) 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상의 항체 정제 방법에 의해 배지, 복수 유체, 또는 혈청으로부터 적당하게 분리된다.

모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 분리되고, 통상의 방법(예를 들어, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특별히 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 사용)으로 연속된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현벡터에 위치하고, 항체 단백질을 생성하지 않는 대장균 세포, 유인원 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주세포로 트랜스펙트되어, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체를 암호화하는 DNA의 합성을 얻기 위한 재조합에 관한 논문이 있다[Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993) 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188(1992)].

다른 실시형태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편은 문헌{McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554(1990)}에 기재된 방법을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 문헌{Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597(1991)}에는 파지 라이브러리를 사용한 쥐 및 인간 항체 각각의 분리가 기재되어 있다. 뒤이은 공개물은 연쇄 혼합(shuffling)에 의한 고친화성(nM 범위) 인간 항체의 생성(Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)), 뿐만 아니라 조합 감염 및 매우 큰 파지 라이브러리를 구성하기 위한 방법으로서 생체 내 재조합을 기재하고 있다(Waterhouse *et al.*, *Nuc.Acids.Res.*, 21:2265-2266(1993)). 따라서, 이 방법들은 모노클로날 항체를 분리하기 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 방법에 대해 실행가능한 대안이다.

DNA는 또한 예를 들면, 동종 쥐의 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환하거나(미국특허 제4,816,567호; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.USA*, 81:6851(1984)), 비-면역글로불린 폴리펩타이드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시켜 변형될 수 있다.

일반적으로 이러한 비-면역글로불린 폴리펩타이드는 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 항체의 항원-결합부위의 가변 영역을 치환하여, 항원에 대해 특이성을 가진 한 항원-결합부위 및 다른 항원에 대해 특이성을 가진 다른 항원-결합부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성한다.

(iii) 인간화된 항체

비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당해 기술분야에 기재되어 있다. 바람직하게는, 인간화된 항체는 비-인간 공급원로부터 이것으로 유도된 하나 이상의 잔기를 가진다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 "수입(import)"잔기라고 하며, 이는 일반적으로 "수입" 가변 도메인에서 취한다. 인간화는 본질적으로 추가변영역 서열 대신 인간 항체의 대응 서열을 사용하여 원터와 동료들의 방법 [Winter and co-workers (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 "인간화된" 항체는 실질적으로 더 적은 고유 인간 가변 도메인이 비-인간 종의 대응 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국특허 제4,816,567호). 실질적으로, 인간화된 항체는 일반적으로 일부 추가변영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

인간화된 항체를 제조하는데 사용되는 경쇄 및 중쇄 인간 가변 도메인을 선택하는 것은 항원성을 감소시키는 데 매우 중요하다. 일명 "가장-알맞은" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 그리고 나서, 설치류의 서열과 가장 근접한 인간 서열이 인간화된 항체에 대한 인간 외곽구조 영역(FR)으로서 수용된다 [Sims *et al.*, *J.Immunol.*, 151:2296(1993); Chothia *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 196:901(1987)]. 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위그룹의 모든 인간 항체의 교감 서열로부터 유래된 특정 외곽구조 영역을 사용한다. 동일한 외곽구조는 몇몇 다른 인간화된 항체에 사용될 수 있다 [Carter *et al.*, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta *et al.*, *J.Immunol.*, 151:2623(1993)].

항체가 항원 및 다른 바람직한 생물학적 특성에 대한 고도의 친화력을 보유하면서 인간화되는 것도 중요하다. 이를 달성하기 위하여, 바람직한 방법에 따르면, 인간화된 항체는 모체 서열 및 다양한 개념의 인간화된 생성물을 모체 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 사용하여 분석하는 방법으로 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 입수가능하고, 당해 기술분야의 기술자들에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 3차원 형태 구조를 묘사 및 디스플레이할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다. 이 디스플레이를 조사하여, 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할을 분석하고, 즉, 이의 항원을 결합시키는 후보 면역글로불린의 능력에 미치는 잔기의 영향을 분석할 수 있다. 이런 식으로, FR 잔기가 선택되고, 수용체 및 수입 서열로부터 결합되어, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화력과 같은 원하는 항체 특성을 얻을 수 있다. 일반적으로, 추가변영역 잔기는 항원 결합에 직접적으로, 그리고 상당히 영향을 미친다.

하기 실시예 3은 ErbB2를 결합시키고, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 인간화된 항-ErbB2 항체 제조의 실시예를 설명한다. 여기서 특히 관심있는 인간화된 항체는 쥐 모노클로날 항체 2C4(또는 이의 Fab 단편)만큼 효과적으로 EGF, TGF- α 및/또는 MAPK의 HRG 매개 활성을 차단하고, 본질적으로 쥐 모노클로날 항체 2C4(또는 이의 Fab 단편)만큼 효과적으로 ErbB2를 결합시킨다. 여기서, 인간화된 항체는 예를 들면, 인간 가변 중쇄 도메인으로 통합된 비인간 추가변영역 잔기를 포함하고, 문헌 {Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)}에 따른 가변 도메인 넘버링 시스템을 사용하여, 69H, 71H, 및 73H로 구성된 그룹에서 선택된 위치에서 외곽구조 영역(FR) 치환을 더 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 인간화된 항체는 둘 또는 모든 위치 69H, 71H 및 73H에서의 FR 치환을 포함한다.

여기서 관심있는 인간화된 항체의 예는 잔기 GFTFTDYTMX(여기서, X는 D 또는 S)(SEQ ID NO:7), DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO:8); 및/또는 NLGPSFYFDY(SEQ ID NO:9)를 결정하는 가변 중쇄 도메인 상보성을 포함하고, 선택적으로 예를 들어, 변형체들이 본질적으로 항체의 친화력을 유지 또는 향상시키는 이들 CDR 잔기의 아미노산 변형체를 포함한다. 예를 들어, 관심있는 항체 변형체는 상기 가변 중쇄 CDR 서열에서 약 1 내지 7 또는 5개의 아미노산 치환체를 가진다. 이러한 항체 변형체는 하기와 같이 친화성 성숙분열에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화된 항체는 SEQ ID NO:4 내의 가변 중쇄 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

인간화된 항체는 예를 들어, 상기 단락의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에, 잔기 KASQDVSIGVA(SEQ ID NO:10), SASYX¹X²X³(여기서, X¹은 바람직하게는 R 또는 L이고; X²는 바람직하게는 Y 또는 E이고; X³는 바람직하게는 T 또는 S이다)(SEQ ID NO:11); 및 QQYYIYPYT(SEQ ID NO:12)를 결정하는 가변 경쇄 도메인 상보성을 포함할 수 있다. 이러한 인간화된 항체는 선택적으로 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형체를 포함하고, 예를 들어, 여기서 변형체는 본질적으로 항체의 친화력을 유지 또는 향상시킨다. 예를 들어, 관심있는 항체 변형체는 상기 가변 경쇄 CDR 서열 내의 약 1 내지 약 7 또는 약 5개의 아미노산을 가질 수 있다. 이러한 항체 변형체는 하기와 같이 친화성 성숙분열에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화된 항체는 SEQ ID NO:3 내의 가변 경쇄 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

본 출원은 또한 ErbB2를 결합시키고, ErbB 수용체의 리간드 활성을 차단하는 친화성 성숙된 항체에 관한 것이다. 모항체는 인간 항체 또는 인간화된 항체, 예를 들면, 각각 SEQ ID Nos. 3 및 4(즉, 변형체 574)의 가변 경쇄 및/또는 중쇄 서열을

포함하는 것일 수 있다. 친화성 성숙된 항체는 쥐의 2C4 또는 변형체 574의 친화성보다 더 뛰어난 친화성을 가진 ErbB 수용체에 결합하는 것이 바람직하다(예를 들면, ErbB2-세포의 도메인 (ECD) ELISA를 사용한 평가에서와 같이, 예를 들어, 약 2 또는 약 4구배 내지 약 100구배 또는 약 1000 구배 향상된 친화성). 치환을 위한 가변 중쇄 CDR 잔기의 예로는, H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 또는 둘 이상(예를 들어, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯 또는 일곱 잔기)의 조합이 포함된다. 교대를 위한 가변 경쇄 CDR 잔기의 예로는, L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 또는 둘 이상(예를 들어, 둘 내지 셋, 넷, 다섯 또는 약 열개 이하의 잔기)의 조합이 포함된다.

다양한 형태의 인간화된 또는 친화성 성숙된 항체가 관찰되었다. 예를 들어, 인간화된 또는 친화성 성숙된 항체는 Fab와 같은 항체 단편일 수 있고, 이는 선택적으로 하나 이상의 세포독성제(들)와 접합되어, 면역접합체를 생성할 수 있다. 이와 달리, 인간화된 또는 친화성 성숙된 항체는 고유 IgG1 항체와 같은 고유 항체일 수 있다.

(iv) 인간 항체

인간화하는 대신, 인간 항체를 생성할 수 있다. 이체는, 예를 들어, 면역시 내생 면역글로불린 산물의 부재하에 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자도입 동물(예를 들어, 마우스)을 생성할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 세균주 돌연변이 마우스 내의 항체 중쇄 결합 영역(J_H) 유전자의 동질 집합체 결여는 내생 항체 생성을 완전히 억제한다. 이러한 세균주 돌연변이 마우스에서 인간 세균주 면역글로불린 유전자 배열의 전달은 항원 면역성 검사시 인간 항체를 생성한다 [예를 들어, 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 미국특허 제5,591,669호, 제5,589,369호, 및 제 5,545,807호 참조].

이와 달리, 파지 디스플레이 방법(McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553(1990))은 비면역화된 공여자의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터, 생체의 인간 항체 및 항체 단편을 생성하는데 사용될 수 있다. 이 방법에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 구조내에서 M13 또는 fd와 같은 섬유상 박테리오파지의 주요 또는 보조 피복 단백질 유전자로 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에서 기능성 항체 단편으로서 디스플레이된다. 섬유상 입자는 파지 게놈의 단일가닥 DNA 카피를 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 이들 특성을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자의 선택이다. 따라서, 파지는 B-세포 특성의 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 형태로 수행될 수 있다[예를 들어, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)]. V-유전자 마디의 몇몇 공급원은 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 클락슨 등(Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628(1991))은 면역된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 임의의 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 분리하였다. 비면역된 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구성할 수 있고, 항원(자기-항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체는 본질적으로 문헌(Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991), 또는 Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993))에 기재된 방법에 따라 분리될 수 있다(미국특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호 참조).

상기한 바와 같이, 인간 항체는 또한 생체의 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다(미국특허 제5,567,610호 및 제 5,229,275호 참조).

인간 항-ErbB2 항체는 문헌(1998년 6월 30일자 미국특허 제5,772,997호 및 1997년 1월 3일 공개된 WO 97/00271)에 기재되어 있다.

(v) 항체 단편

항체 단편을 제조하기 위한 다양한 방법이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 고유 항체의 단백질 가수분해 침지를 통해 유래되었다[예를 들어, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992); 및 Brennan *et al.*, *Science*, 229:81(1985) 참조]. 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기한 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 이와 달리, Fab'-SH 단편은 대장균으로부터 직접 회수되고, 화학적으로 결합되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다[Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167(1992)]. 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편을 생성하는 다른 방법은 기술자들에게는 명백할 것이다. 다른 실시형태에서, 선택된 항체는 단일 쇠 Fv 단편(scFv)이다(WO 93/16185; 미국특허 제5,571,894호; 및 미국특허 제5,587,458호 참조). 항체 단편은 또한 예를 들면, 미국특허 제5,641,870에 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 1종(monospecific) 또는 2종(bispecific)일 수 있다.

(vi) 2중 항체

2중 항체는 둘 이상의 다른 에피토프에 대해 결합 특이성을 가지는 항체이다. 대표적인 2중 항체는 ErbB2 단백질의 두 가지 다른 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 이러한 항체는 ErbB2 결합부위를 EGFR, ErbB3 및/또는 ErbB4에 대한 결합 부위(들)와 결합시킬 수 있다. 이와 달리, 항-ErbB2 완(arm)은 ErbB2-발현 세포에 대해 세포 방어 메커니즘을 집중시키기 위하여, T-세포 수용체 분자(예를 들어, CD2 또는 CD3), 또는 FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)과 같은 IgG(FcγR)에 대한 Fc 수용체 등의 백혈구 상의 유발 분자에 결합하는 완과 결합할 수 있다. 2중 항체는 또한 ErbB2를 발현하는 세포에 세포독성제를 배치하는 데 사용될 수 있다. 이들 항체는 ErbB2-결합완 및 세포독성제(예를 들어, 사포린(saporin), 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 리친 A쇄(ricin A-chain), 메토틱세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)를 결합시키는 완을 가진다. 2중 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 2중 항체)으로 제조될 수 있다.

WO 96/16673에는 2중 항-ErbB2/항-FcγRIII 항체가 기재되어 있고, 미국특허 제5,837,234호에는 2중 항-ErbB2/항-FcγRI 항체가 기재되어 있다. 2중 항-ErbB2/Fcα항체는 WO98/02463에 나타나 있다. 미국특허 제5,821,337호는 2중 항-ErbB2/항-CD3 항체를 기술한다.

2중 항체의 제조방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 전통적인 전장 2중 항체 제조는 두 개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 공동발현에 기초하며, 여기서 두 개의쇄는 상이한 특이성을 가진다[Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539(1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 임의의 분류로 인해, 이들 하이브리도마(퀴드로마, quadroma)는 단 한개만 정확한 2중 구조를 가진 10개의 다른 항체분자의 가능한 혼합물을 생성한다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계로 수행되는 정확한 분자의 정제는 부담스럽고, 생성물의 수율도 낮다. 유사한 방법이 문헌(WO 93/08829 및 Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659(1991))에 기재되어 있다.

다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 가진 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 적어도 일부의 힌지(hinge), CH2, 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과 융합되는 것이 바람직하다. 하나 이상의 융합에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제 1 중쇄 불변 영역(CH1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA는 분리 발현 벡터로 삽입되고, 적당한 숙주 유기체에 공동-트랜스펙트된다. 이로써, 구성에 사용된 비동등 비율의 세계의 폴리펩티드쇄가 최적 수율을 제공하는 경우, 실시형태에서 세계의 폴리펩티드 단편의 성숙 비율을 조절하는데 커다란 유연성이 얻어진다. 그러나, 동등한 비율의 둘 이상의 폴리펩티드쇄의 발현이 고수율로 일어나거나, 비율이 어떤 특정한 의미를 갖지 않는 경우, 둘 또는 모든 세계의 폴리펩티드쇄에 대한 코딩서열을 하나의 발현 벡터로 삽입할 수 있다.

이 접근법의 바람직한 실시형태에서, 2중 항체는 한 완에서 첫번째 결합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 완에서 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(두번째 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 쉽게 분리하기 위하여 2중 분자의 1/2에만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것과 같이, 이 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린쇄 조합으로부터 원하는 2중 화합물의 분리를 쉽게한다. 이 접근법은 WO 94/046690에 개시되어 있다. 2중 항체의 생성에 대한 상세한 설명은 문헌(예를 들어, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986))을 참조한다.

미국특허 제5,731,168호에 기재된 다른 접근법에 따르면, 항체 분자쌍 사이의 인터페이스는 재조합 세포 배양에서 회수되는 헤테로다имер의 퍼센트를 최대화하도록 설계될 수 있다. 바람직한 인터페이스는 적어도 일부의 항체 불변 도메인의 CH₃ 도메인을 포함한다. 이 방법에서, 첫번째 항체 분자의 인터페이스로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 큰 측쇄(예를 들면, 티로신 또는 트립토판)와 교체될 수 있다. 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 두번째 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이로써, 호모다имер와 같은 원하지 않는 다른 최종 생성물 이외에 헤테로다имер의 수율을 증가시키는 메커니즘이 얻어진다.

2중 항체는 교차-결합 또는 "이종접합(heteroconjugate)" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체에서 한 항체는 아비딘에 결합되고, 다른 항체는 비오틴에 결합될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들면, 원하지 않는 세포에 대한 면역계 세포를 표적화하고(미국특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위해 제안된다(WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089). 이종접합 항체는 어떤 편리한 교차-결합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적당한 교차-결합제는 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, 다수의 교차-결합 방법과 함께 미국특허 제4,676,980호에 기재되어 있다.

항체 단편으로부터 2중 항체를 생성하는 방법도 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 2중 항체는 화학결합을 사용하여 제조될 수 있다. 브레난 등(Brennan *et al.*, *Science*, 229:81(1985))은 고유 항체가 단백질 가수분해되어 F(ab')₂ 단편을 생성하는 방법을 기재하고 있다. 이 단편들은 디티올 착제의 존재하에서, 아비산나트륨을 감소시켜, 인접 디티올을 안정화시키

고, 분자내 이황화물의 형성을 방지한다. 그리고 나서, 생성된 Fab' 단편은 티오나이트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. 그리고 나서, 하나의 Fab'-TNB 유도체는 머캅토에틸아민과의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환되고, 동등한 양의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어, 2중 항체를 형성한다. 생성된 2중 항체는 효소의 선택 고정을 위한 약제로 사용될 수 있다.

최근의 방법은 화학결합하여 2중 항체를 형성할 수 있는 대장균으로부터 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 한다. 문헌{Shalaby *et al.*, *J.Exp.Med.*, 175:217-225(1992)}에는 완전히 인간화된 2중 항체 F(ab')₂ 분자의 생성이 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 대장균으로부터 분리 분리되고, 생체외에서 직접 화학 결합되어 2중 항체를 형성한다. 따라서, 형성된 2중 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을뿐 아니라, 인간 유방암 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 일으킬 수 있다.

제조합 세포 배양으로부터 2중 항체 단편을 직접 제조 및 분리하는 다양한 방법도 기재되어 있다. 예를 들어, 2중 항체는 류신 지퍼(leucine zipper)를 사용하여 제조된다[Kostelny *et al.*, *J.Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩타이드는 유전자 융합에 의해 두개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결된다. 항체 호모다имер는 힌지 영역에서 감소하여 모노머를 형성하고, 다시 산화되어 항체 헥사다имер를 형성한다. 이 방법은 항체 호모다имер의 제조에 대해서도 사용될 수 있다. 문헌{Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)}에 기재된 "다이아바디" 방법은 2중 항체 단편을 제조하기 위한 대체 매커니즘을 제공한다. 단편은 동일한 쇠에서 두 도메인 사이에 쌍을 이루기에는 너무 짧은, 연결기에 의해 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 다른 단편의 상보 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루도록 강요되어, 두개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv(sFv) 다имер를 사용하여 2중 항체 단편을 제조하는 다른 방법도 보고되어 있다[Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368(1994) 참조].

2 이상의 원자가를 가진 항체도 고려되었다. 예를 들어, 3중 항체를 제조할 수 있다[Tutt *et al.* *J.Immunol.* 147:60(1991)].

(vii) 다른 아미노산 서열 변이

본 명세서에 기재된 항-ErbB2 항체의 아미노산 서열 변이(들)이 고려되었다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 향상시키는 것이 바람직하다. 항-ErbB 항체의 아미노산 서열 변형체는 적당한 뉴클레오타이드 변화를 항-ErbB2 항체 핵산에 도입하거나 펩타이드 합성하여 제조된다. 이러한 변이는 예를 들면, 항-ErbB2 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 유전자 결여, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 유전자 결여, 삽입, 및 치환의 어떤 조합은 원하는 특성을 가진 최종 구조를 제공하는 최종 구조에 도달하기 위해 만들어진다. 아미노산 변경은 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변경과 같이, 항-ErbB2 항체의 번역후 과정을 변경시킬 수 있다.

돌연변이 유발에 바람직한 위치인 항-ErbB2 항체의 어떤 잔기 또는 영역의 유용한 확인 방법은 문헌{Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085(1989)}에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기 그룹은 확인되었고(예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같이 대전된 잔기), 중성 또는 음성으로 대전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 ErbB2 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 그리고 나서, 치환체에 대한 기능적 민감도를 보여주는 이들 아미노산 배치는 치환 부위에 다른 변형체를 도입하여 정제한다. 따라서, 아미노산 서열 변형을 도입하는 부위는 정해지지만, 돌연변이의 특성이 정해질 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이 성능을 분석하기 위하여, 표적 코돈 또는 영역에서 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 수행하고, 항-ErbB2 항체 변형체를 원하는 활성에 대해 스크리닝한다.

아미노산 서열 삽입물은 길이가 하나의 잔기 내지 백개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드 범위인 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합물 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물을 포함한다. 말단 삽입물의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항-ErbB 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 들 수 있다. 항-ErbB2 항체 분자의 다른 삽입 변형체는 효소(예를 들어, ADEPT) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 항-ErbB2 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합물을 포함한다.

다른 종류의 변형체는 아미노산 치환 변형체이다. 이들 변형체는 다른 잔기로 교체된 항-ErbB2 항체 분자 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 치환 돌연변이원을 위한 가장 관심있는 부위는 초가변영역을 포함하지만, FR 변경도 고려된

다. 온건한 치환체는 "바람직한 치환체"라는 제목으로 표 1에 나타난다. 이러한 치환체가 생물학적 활성을 변화시키면, 아미노산 클래스를 참조하여 하기에 기재된 바와 같은, 또는 표 1의 "대표적인 치환체"로 명명한 더 많은 변화가 도입될 수 있고, 생성물은 스크리닝될 수 있다.

[표 1]

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

항체의 생물학적 특성에서 실질적인 변형은 (a) 예를 들면, 시트 또는 나선형 구조와 같은 치환 영역에서 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 차지 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기의 유지에 있어서, 상당히 다른 영향을 가지는 치환체를 선택함으로써 이루어진다. 자연 발생 잔기는 일반적인 측쇄 특성에 기초하여 그룹으로 나뉜다:

- (1) 소수성: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 자연 소수성: cys, ser, thr;
- (3) 산성: asp, glu;
- (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및
- (6) 방향성: trp, tyr, phe.

비-보존 치환체는 이 클래스의 한 성분을 다른 클래스로 교환한다.

항-ErbB2 항체의 적당한 구조를 유지하는데 관련되지 않은 임의의 시스테인 잔기도 일반적으로는 세린과 치환되어, 분자의 산화적 안정성을 향상시키고, 돌연변이 교차결합을 방지할 수 있다. 이와 반대로, 시스테인 결함(들)이 항체에 첨가되어 이의 안정성(특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우)을 향상시킬 수 있다.

특히 바람직한 종류의 치환 변형체는 모항체(예를 들어, 인간화된 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 더 발육시키기 위해 선택된 생성된 변형체(들)는 이로부터 생성된 모항체에 비해 향상된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변형체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 돌연변이를 포함한다. 요약하면, 몇몇 초가변영역 부위(예를 들어, 6-7 부위)가 돌연변이되어 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환체를 생성한다. 따라서, 생성된 항체 변형체는 각 입자 내에 일괄된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 섬유상 파지 입자로부터 1가인 종류로 디스플레이된다. 그리고 나서, 파지-디스플레이된 변형체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 이의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보 초가변영역 부위를 확인하기 위하여, 알려진 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 초가변영역 잔기를 확인할 수 있다. 이와 달리, 또는 추가적으로, 항체와 인간 ErbB2의 접촉점을 확인하기 위하여 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 본 발명이 설명하는 방법에 따른 치환을 위한 후보자이다. 일단 이러한 변형체가 발생되면, 변형체의 패널은 여기 기재된 바와 같이 스크리닝되고, 하나 이상의 적절한 분석에서 뛰어난 특성을 가진 항체는 더 발육시키기 위해 선택될 수 있다.

다른 종류의 항체의 아미노산 변형체는 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 바꾼다.

변화에 의한다는 것은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기를 제거, 및/또는 항체 내에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 추가하는 것을 의미한다.

항체의 글리코실화는 일반적으로 N-결합 또는 O-결합이다. N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 잔기가 부착하는 것을 말한다. X가 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 잔기가 효소적으로 부착하기 위한 인식서열이다. 따라서, 폴리펩타이드 내에 이들 트리펩타이드가 존재하면 잠재적인 글리코실화 부위를 만든다. O-결합 글리코실화는 당인 N-아세틸갈락토사민, 갈락토즈, 또는 자일로즈 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌에 부착하는 것을 말하며, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용될 수 있다.

(N-결합 글리코실화 부위에 대하여) 하나 이상의 상기 트리펩타이드 서열을 함유하도록 아미노산서열을 변화시켜서 항체에 글리코실화 부위를 추가할 수 있다. 변화는 (O-결합 글리코실화 부위에 대하여) 원항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가, 또는 치환함으로써 이루어질 수도 있다.

항-ErbB2 항체의 아미노산서열변형체를 암호화하는 핵산분자는 당해 기술분야에서 공지된 다양한 방법으로 제조된다. 이들 방법에는 자연공급원으로부터 분리(자연 발생 아미노산서열 변형체인 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 위치특이적) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 항-ErbB2 항체의 이전 제조된 변형체 또는 비변형체의 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다.

예를 들면, 항원-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체의존성 세포독성(CDC)을 증진시키기 위하여, 효과기 기능에 관하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 선택적으로 또는 추가적으로, Fc 영역에 시스테인잔기를 도입하여 이 영역에서 사슬간 디설파이드결합이 형성되게 할 수 있다. 그 결과 생성된 호모다имер 항체는 내부화 능력이 개선 및/또는 보체-매개 세포사멸과 항체-의존성 세포매개 세포독성(ADCC)이 증가될 수 있다(Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195(1992) and Shopes, B. *J.Immunol.* 148:2918-2922(1992)). 항-종양활성이 증진된 호모다имер 항체도 문헌(Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993))에 기재된 바와 같은 헤테로이작용성 교차링커를 사용하여 제조할 수 있다. 선택적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 가짐으로써 보체용해 및 ADCC 능력이 증진될 수 있도록 조작될 수 있다(Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230(1989) 참조).

항체의 혈청반감기를 증가시키기 위하여, 예를 들면, 미국특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같은 항체(특히 항체단편) 속에 회수(salvage) 수용체 결합 에피토프를 삽입할 수 있다. 본 명세서에서 사용된, "회수 수용체 결합 에피토프"란 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 IgG 분자(예를 들면 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 말한다.

(viii) 원하는 특성을 가진 항체의 스크리닝

항체를 생성하는 기술은 앞에서 설명하였다. 원하는 바에 따라, 어떤 생물학적 특성을 가진 항체를 선택할 수도 있다.

ErbB 수용체의 리간드활성을 차단하는 항체를 확인하기 위하여, (예를 들면, 관심있는 ErbB 수용체가 ErbB 헤테로-올리고머를 형성하는 다른 ErbB 수용체와의 접합에서) ErbB 수용체를 발현하는 세포에 ErbB 리간드가 결합하는 것을 차단하는 항체의 능력을 확인할 수 있다. 예를 들면, ErbB 헤테로-올리고머의 ErbB 수용체를 자연히 발현하거나 발현하도록 트랜스펙션된 세포를 항체와 함께 배양한 후 표지된 ErbB 리간드에 노출시킬 수 있다. 그리고 나서 항-ErbB2 항체가 ErbB 헤테로-올리고머에서 ErbB 수용체에 리간드가 결합하는 것을 차단하는 능력을 평가할 수 있다.

예를 들면, 하기 실시예 1에서 설명한 바와 같이 얼음 위 24-조 플레이트 형태의 단일층 MCF7 배양물을 사용하여 항-ErbB2 항체에 의해 MCF7 유방암 세포주에 HRG가 결합하는 것을 저해할 수 있다. 항-ErbB2 모노클로날 항체를 각 조에 첨가하여 30분 동안 배양할 수 있다. ^{125}I -표지 rHRG $\beta 1_{177-224}$ (25pm)를 첨가하고, 4 내지 16시간동안 계속 배양할 수 있다. 투여량 반응곡선을 만들 수 있고, 관심있는 항체에 대한 IC_{50} 값을 계산할 수 있다. 일 실시형태에서, ErbB 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 이러한 분석에서 MCF7 세포에 HRG가 결합하는 것을 저해하는 IC_{50} 가 약 50nM 이하, 더 바람직하게는 10nM 이하일 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체단편인 경우, 이 분석에서 MCF에 HRG가 결합하는 것을 저해하기 위한 IC_{50} 은 100nM 이하, 더 바람직하게는 50nM 이하일 수 있다.

선택적으로, 또는 추가적으로, 항-ErbB2 항체가 ErbB 헤테로-올리고머에 존재하는 ErbB 수용체의 ErbB 리간드-자극 티로신 인산화를 차단하는 능력을 평가할 수 있다. 예를 들면 ErbB 수용체를 내생적으로 발현하거나 발현하도록 트랜스펙션된 세포를 항체와 배양하여 (검출가능 라벨과 선택적으로 접합된) 항-포스포티로신 모노클로날을 이용하여 ErbB 리간드-의존성 티로신 인산화에 대해 평가할 수 있다. 미국특허 제5,766,863호에 기재된 키나아제 수용체 활성화 분석도 ErbB 수용체 활성화를 확인하고 항체에 의해 그 활성을 차단하는데 이용할 수 있다.

일 실시형태에서, 하기 실시예 1에 설명된 바와 같이 MCF7 세포 내의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 저해하는 항체를 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, MCF7 세포를 24-조 플레이트에 도말하고 ErbB에 대한 모노클로날 항체를 각 조에 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양할 수 있다; 그리고 나서, rHRG $\beta 1_{177-224}$ 를 최종농도가 0.2nM이 되도록 각 조에 첨가하고, 8분동안 계속 배양할 수 있다. 각 조로부터 배지를 흡인하고, 100 μl 의 SDS 시료버퍼(5% SDS, 25mM DTT, 및 25mM Tris-HCl, pH 6.8)를 첨가하여 반응을 중지시킬 수 있다. 4-12% 구배 겔(Novex)에서 각 시료(25 μl)를 전기영동한 후 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막으로 전기영동적으로 옮길 수 있다. 항포스포티로신(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 면역블랏을 현상하여, M_r ~180,000에서 미리 정해진 반응성 밴드를 반사율 농도계로 정량할 수 있다. 선택된 항체는 이 분석에서 약 0-35%의 대조구에 대한 p180 티로신 인산화의 자극을 상당히 저해하는 것이 바람직할 것이다. 반사율 농도계로 확인한 p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 저해에 대한 투여량-반응곡선을 만들어 관심있는 항체에 대한 IC_{50} 값을 계산할 수 있다. 일 실시형태에서, ErbB 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 이러한 분석에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 저해하는 IC_{50} 가 약 50nM 이하, 더 바람직하게는 10nM 이하일 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체단편인 경우, 이 분석에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 저해하기 위한 IC_{50} 은 100nM 이하, 더 바람직하게는 50nM 이하일 수 있다.

문헌{Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997)}에 기재된 바와 같이, MDA-MB-175 세포에 대한 항체의 성장 저해효과를 평가할 수도 있다. 이 분석에 따르면, MDA-MB-175 세포에 항-ErbB2 모노클로날 항체(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 4일간 처리하고 크리스탈 바이올렛으로 염색할 수 있다. 항-ErbB2 항체를 사용하여 배양하면 모노클로날 항체 2C4에 의해 나타나는 것과 유사하게 이 세포주에 대한 성장저해효과를 나타낼 수 있다. 다른 실시형태에서, 외인성 HRG는 이 저해를 그다지 역전시키지 못할 것이다. 바람직하게는, 항체는 외인성 HRG의 존재 및 부재 하에서 MDA-MB-175 세포의 증식을 모노클로날 항체 4D5보다 더 많이 (및 선택적으로 모노클로날 항체 7F3보다 더 많이) 저해할 수 있을 것이다.

일 실시형태에서, 관심있는 항-ErbB2 항체는 모노클로날 항체 4D5보다 실질적으로 더 효과적이고, 선택적으로 모노클로날 항체 7F3보다 실질적으로 더 효과적으로, 실시예 2에 기재된 바와 같은 공동면역치전실험에서 확인된 바와 같이 MCF3 SK-BR-3 세포 모두에서 ErbB3와 ErbB2의 헤레쿨린 의존성 결합을 차단할 수 있다.

선택적으로, 또는 추가적으로, 하기 실시예 4에 나타난 바와 같이, 항체가 마이토젠-활성화된 단백질 키나아제(MAPK)의 EGF, TGF- α 및/또는 HRG 매개 활성화를 차단하는 능력을 확인할 수 있다. HERCEPTEST[®] 또는 모노클로날 항체 4D5보다 더 많이 마이토젠-활성화된 단백질 키나아제(MAPK)의 EGF, TGF- α 및/또는 HRG 매개 활성화를 차단하는 항체를 선택할 수 있다. 또한, 관심있는 항체는 모노클로날 항체 7F3보다 더 많이 마이토젠-활성화된 단백질 키나아제(MAPK)의 EGF, TGF- α 및/또는 HRG 매개 활성화를 차단할 수 있다.

성장 저해 항-ErbB2 항체를 확인하기 위하여, ErbB2를 과발현하는 암세포의 성장을 저해하는 항체를 스크리닝할 수도 있다. 일 실시형태에서, 선택된 성장저해항체는 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체농도에서 세포배양물 중의 SK-BR-3 세포의 성장을 약 20-100%, 바람직하게는 약 50-100%까지 저해할 수 있다. 그러한 항체를 동정하기 위하여, 미국특허 제 5,677,171호에 기재된 SK-BR-3 분석을 행할 수 있다. 이 분석에 따르면, SK-BR-3 세포는 10% 우태아혈청, 글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신을 보충한 F12 및 DMEM 배지의 1:1 혼합물에서 성장한다. SK-BR-3 세포를 35mm 세포배양접시에 20,000 세포를 도말한다(2ml/35mm 접시). 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-ErbB2 항체를 접시마다 첨가한다. 6일 후, 전기 COULTER™ 세포계수기를 사용하여 미처리세포와 비교한 세포의 수를 계수한다. SK-BR-3 세포의 성장을 약 20-100% 또는 약 50-100%까지 저해하는 항체들을 성장저해항체로 선택할 수 있다.

세포사멸을 유도하는 항체를 선택하기 위하여, PI, 트리판 블루 또는 7AAD 흡수 등으로 표시되는 막 완전성의 소실을 대조구와 관련하여 평가할 수 있다. 바람직한 분석은 BT474 세포를 이용한 PI 흡수분석이다. 이 분석에 따르면, BT474세포 {ATCC(Rockville, MD)로부터 입수할 수 있음}를 10% 열불활성화된 FBS(Hyclone)와 2mM L-글루타민을 보충한 D-MEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium):Ham's F12 (50:50)에서 배양하였다. (따라서, 분석은 보체 및 면역효과기세포의 부재하에서 행해진다). BT474 세포를 100×20mm 접시에 접시당 3×10^6 의 농도로 접종하고 밤새 부착시킨다. 그 다음에 배지를 제거하고 신선한 배지 단독 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 적당한 모노클로날 항체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 배양한다. 각 처리 후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신처리하여 떼어낸다. 그 다음에 세포를 4℃, 1200rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 펠렛을 3ml 얼음냉각 Ca^{2+} 결합버퍼(10mM Hepes, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl_2)에 재현탁시키고 30mm 여과기-마개 12×75 튜브(튜브당 1ml, 치료그룹당 3튜브)로 분획하여 세포덩어리를 제거한다. 그 다음에 튜브에 PI(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. FACSCAN™ 유세포분석기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 확인된 바와 같은 통계적으로 상당한 수준의 세포사멸을 유도하는 이들 항체를 세포사멸-유도 항체로서 선택할 수 있다.

세포사멸사를 유도하는 항체를 선택하기 위하여, BT474세포를 이용한 아넥신(annexin) 결합분석을 할 수 있다. BT474 세포를 배양하여 상기에서 설명한 바와 같이 접시에 접종한다. 그 다음에 배지를 제거하고 신선한 배지 단독 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모노클로날 항체를 함유하는 배지로 교체한다. 3일간 배양한 후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신처리하여 떼어낸다. 그 다음에 세포사멸분석에 대해 설명한 바와 같이, 세포를 원심분리하고, Ca^{2+} 결합버퍼에 재현탁시키고 튜브에 분획한다. 그 다음에 튜브에 표시된 아넥신(예를 들면, 아넥신 V-FTIC)(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. FACSCAN™ 유세포분석기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. 대조구에 비해 통계적으로 상당한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 세포사멸-유도 항체로서 선택한다.

아넥신 결합분석외에도, BT474세포를 이용한 DNA 염색 분석을 할 수 있다. 이 분석을 하기 위하여, 상기 설명한 바와 같이 관심있는 항체로 처리된 BT474 세포를 37℃에서 2시간 동안 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HOECHST 33342™로 배양한 후, MODFITLT™ 소프트웨어(Verity Software House)를 사용하여 EPICS ELITE™ 유세포분석기(Coulter Corporation)에서 분석한다. 세포사멸세포의 핵분율을 미처리세포(100% 이하 세포사멸세포)보다 2배 이상(및 바람직하게는 3배 이상) 변화하도록 유도한 항체를 이 분석을 이용한 전-세포사멸 항체로서 선택할 수 있다.

관심있는 항체가 결합한 ErbB2 상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 문헌{*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)}에 기재된 바와 같은 통상적인 교차차단 분석을 행할 수 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 당해 기술분야에서 공지된 방법들을 사용하여 에피토프 지도제작을 할 수 있다(도 1a 및 1b 참조).

(ix) 면역접합체

본 발명은 또한 화학요법제, 독소(소분자 독소 또는 이의 단편 및/또는 변형체를 포함하는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소적으로 활성인 독소 등), 또는 방사성동위원소(즉, 방사성접합체)와 같은 세포독성제에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체를 사용한 치료에 관련된다.

그러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제를 상기에서 설명하였다.

본 명세서에서는 항체와 칼리치 아미신, 마이탄신(미국특허 제5,208,020호), 트리코텐, 및 CC1065와 같은 하나 이상의 소분자 독소와의 접합체도 생각한다.

본 발명의 바람직한 실시형태에서, 항체는 하나이상의 마이탄신분자(예를 들면, 항체분자 당 약 1 내지 약 10 마이탄신 분자)에 접합된다. 마이탄신은 예를 들면, May-SH3으로 환원되어 변형된 항체{Chari *et al. Cancer Research* 52:127-131(1992)}와 반응하여 마이탄시노이드-항체 면역접합체를 생성할 수 있는 May-SS-Me로 전환될 수 있다.

관심있는 다른 면역접합체는 하나 이상의 칼리치아미신 분자에 접합된 항-ErbB2 항체를 포함한다. 칼리치아미신계 항체는 피코몰 이하의 농도에서 이중가닥 DNA 절단을 만들 수 있다. 사용될 수 있는 칼리치아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 θ_1^I 가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다 {Hinman *et al. Cancer Research* 53:3336-3342 (1993) and Lode *et al. cancer Research* 58:2925-2928 (1998)}.

사용할 수 있는 효소적 활성 독소 및 이의 단편에는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아독소의 비결합 활성단편, 엑소톡신 A 사슬(슈도모나스 아에루기노사 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나(Phytolacca americana) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다(예를 들면, 1993년 10월 28일 공개된 WO93/21232 참조).

본 발명은 핵융해활성을 가진 화합물(예를 들면, 리보뉴클레아제 또는 데옥시리보뉴클레아제; DNase와 같은 DNA 엔도뉴클레아제)와 항체 간에 형성된 면역접합체도 생각한다.

다양한 방사성 동위원소를 방사선접합된 항-ErbB2 항체 생산에 이용할 수 있다. 그 예에는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다.

항체와 세포독성제의 접합체는 N-숙신이미딜-3(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(디메틸 아디프이미데이트 HCL 등), 활성 에스테르(디숙신이미딜 수베레이트 등), 알데하이드(글루타르알데하이드), 비스아지도 화합물{비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민 등}, 비스-디아조늄 유도체{비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민 등}, 디이소시아네이트(톨리엔 2,6-디이소시아네이트 등), 및 비스-활성 불소화합물(1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 등)과 같은 다양한 이작용성 단백질 결합체를 사용하여 만들 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 문헌{Vitetta *et al. Science* 238:1098 (1987)}에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. C^{14} -표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 방사성 뉴클레오티드를 접합하기 위한 착체의 예이다(WO94/11026 참조). 링커는 세포 내에서 세포독성 약제의 배출을 촉진하는 "분할가능 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩타이드아제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커{Chari *et al. Cancer Research* 52:127-131(1992)}를 사용할 수 있다.

선택적으로, 예를 들면, 재조합기술이나 펩타이드합성에 의해 항-ErbB2 항체와 세포독성제를 포함하는 융합단백질을 만들 수 있다.

또다른 실시형태에서, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여하는 종양 전표적화에 이용하기 위하여 항체를 (스트렙타비딘과 같은) "수용체"에 접합한 후, 제거제를 사용하여 순환으로부터 미결합 접합체를 제거하고 세포독성제(예를 들면, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드"(예를 들면, 아비딘)를 투여할 수 있다.

(x) 항체의존성 효소매개 프로드러그 치료(ADEPT)

본 발명의 항체는 항체를 프로드러그(예를 들면, 펩티딜 화학요법제, WO81/01145 참조)를 활성 항암 약제로 전환하는 프로드러그-활성화 효소에 접합시킴으로써 ADEPT에서 사용될 수 있다(예를 들면, WO88/07378 및 미국특허 제 4,975,278 참조).

ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소성분에는 프로드러그를 보다 활성인 세포독성형태로 전환시키기 위한 방식으로 프로드러그에 작용할 수 있는 임의의 효소가 포함된다.

본 발명에 유용한 효소에는 포스페이트-함유 프로드러그를 유리 약제로 전환하는데 유용한 알칼라인 포스파타제; 설페이트-함유 프로드러그를 유리 약제로 전환하는데 유용한 아틸sul파타제; 비독성 5-플루오로사이토신을 항암 약제인 5-플루오로우라실로 전환하는데 유용한 사이토신 디아미나제; 펩타이드-함유 프로드러그를 유리 약제로 전환하는데 유용한, 세

라티아 프로테아제, 서모리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텝신(카텝신 B와 L 등)과 같은 프로테아제; D-아미노산 치환체를 함유하는 프로드러그를 전환하는데 유용한 D-알라닐카복시펩티다제; 글리코실화된 프로드러그를 유리 약제로 전환하는데 유용한 β -갈락토시다제와 뉴라미니다제와 같은 탄수화물-분해 효소; β -락탐에서 유도된 약제를 유리 약제로 전환하는데 유용한 β -락타마제; 및 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기를 가진 아민 질소에서 유도된 약제를 각각 유리 약제로 전환시키는데 유용한 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제와 같은 페니실린 아미다제가 포함된다. 선택적으로, 본 발명의 프로드러그를 유리 활성 약제로 전환시키는데 당해 기술분야에서 "아브자임(abzyme)"으로도 알려진 효소활성을 가진 항체를 사용할 수 있다(Massey, *Nature* 328:457-458 (1987) 참조). 종양세포 집단에 아브자임을 전달하기 위하여 항체-아브자임 접합체를 본 명세서에서 설명한 바와 같이 제조할 수 있다.

본 발명의 효소는 상기 설명한 헤테로이작용성 교차결합체를 사용하는 것과 같은 당해 기술분야에서 공지된 기술을 사용하여 항-ErbB2 항체에 공유결합할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 효소의 하나 이상의 기능적 활성 부분에 결합된 본 발명의 항체의 하나 이상의 항원결합부위를 포함하는 융합단백질을 당해 기술분야에서 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성할 수 있다(Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604-608 (1984)).

(xi) 다른 항체변형

항체의 다른 변형도 생각된다. 예를 들면, 항체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 코폴리머와 같은 다양한 비단백질성 폴리머 중 하나에 결합할 수 있다. 항체는 또한 콜로이드성 약제운반시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내의, 예를 들면, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의하여 제조된 마이크로캡슐(예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 속에 또는 마크로에멀전 속에 넣을 수도 있다. 그러한 기술은 문헌{*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)}에 기재되어 있다.

본 명세서에 개시된 항-ErbB2 항체도 면역리포솜으로 조성될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌{Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030(1980); 미국특허 제 4,485,045호와 제 4,544,545호; 및 1997년 10월 23일에 공개된 WO97/38731}에 기재된 바와 같은, 당해 기술분야에서 공지된 방법으로 제조된다. 순환시간이 증진된 리포솜은 미국특허 제 5,013,556호에 개시되어 있다.

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질조성물을 사용하여 역상 증발법으로 생성할 수 있다. 리포솜을 원하는 구멍크기를 가진 필터를 통해 성형하여 원하는 직경을 가진 리포솜을 만든다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설파이드 교차반응을 통해 문헌{Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257:286-288(1982)}에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합할 수 있다. 화학요법제는 선택적으로 리포솜 내에 함유된다 {Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19)1484(1989) 참조}

III. 약학적 조성

본 발명에 따라 사용되는 항체의 치료적 조성은 원하는 순도를 가진 항체를 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제{*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)}와 혼합함으로써, 동결건조제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에 서 수혜자에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 버퍼; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로옥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸 등); 저분자량(약 10잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코즈, 만노즈, 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 착제; 슈크로즈, 만니톨, 트레할로즈 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염형성 억제이온; 금속착제(예를 들면, Zn-단백질 착제); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제가 포함된다. 바람직한 동결건조 항-ErbB2 항체 조성은 WO97/04801에 기재되어 있으며, 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.

본 명세서에서 제제는 치료되는 특정 징후에 필요한 하나 이상의 활성화합물, 바람직하게는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가진 활성화합물을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 하나의 조성에서 EGFR, ErbB2 (예를 들면, ErbB2에

대한 다른 에피토프에 결합하는 항체), ErbB3, ErbB4 또는 혈관 내피인자(VEGF)에 결합하는 항체를 더 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 상기 조성은 화학요법제, 세포독성제, 사이토카인, 성장저해제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제를 더 포함할 수 있다. 그러한 분자들은 원하는 목적을 위해 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.

활성성분은 콜로이드성 약제운반시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내의, 예를 들면, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의하여 제조된 예를 들면, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐과 같은 마이크로캡슐 속에 또는 마크로에멀전 속에 넣을 수도 있다. 그러한 기술은 문헌 {Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)}에 기재되어 있다.

지속적 배출 제제도 제조할 수 있다. 지속적 배출 제제의 적합한 예로는 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형된 물품의 형태이며 항체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 들 수 있다. 지속적 배출 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 하이드로겔 {예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락티드(미국특허 제 3,773,919호), L-글루탐산과 γ -에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, LUPRON DEPOTTM(락트산-글리콜산 코폴리머와 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주입가능 미세구)과 같은 분해성 젖산-글리콜산 코폴리머, 및 폴리-D-(-)3-하이드록시부티르산이 포함된다.

생체내 투여에 사용되는 조성은 멸균되어야만 한다. 이것은 멸균여과막을 통해 여과함으로써 쉽게 이루어진다.

IV. 항 ErbB2 항체를 사용한 치료

본 발명에 따르면, 항-ErbB2 항체는 안드로겐 비의존성 전립선암 또는 안드로겐 의존성 전립선암과 같은 전립선암을 치료하는데 사용된다. 치료되는 암이 안드로겐 비의존성 또는 의존성 전립선암인 경우, 안드로겐(예를 들면, 안드로스테론 또는 테스토스테론)의 발현 및/또는 종양 내에서의 이의 동계 수용체를, 예를 들면 상기에서 설명한 바와 같이 이용가능한 다양한 분석법 중 어느 것을 사용하여 평가할 수 있다. 선택적으로 또는 추가적으로, 환자는 그들이 더 이상 항-안드로겐 치료에 반응하지 않는 안드로겐 비의존성 전립선암에 걸린 것으로 진단될 수 있고, 안드로겐 의존성 전립선암에 걸린 것으로 진단된 환자가 항-안드로겐 치료에 반응하는 환자일 수도 있다. 암은 일반적으로 ErbB2-발현 세포를 포함하여, 항-ErbB2 항체가 거기에 결합할 수 있다. 암은 ErbB2 수용체의 과발현으로 특징지어질 수 있지만, 본 출원은 ErbB2-과발현 암인 것으로 생각되지 않는 암을 치료하는 방법을 더 제공한다. 암에서 ErbB2 발현을 확인하기 위하여, 다양한 진단/예후 분석법을 이용할 수 있다. 일 실시형태에서, ErbB2 과발현은 예를 들면 HERCEPTEST[®](Dako)를 사용하여, IHC에 의해 분석될 수 있다. 종양 생체조직편의 파라핀함침 조직절편을 IHC 분석하고 다음과 같은 ErbB2 단백질 염색 강도 기준을 따랐다:

스코어 0 염색이 관찰되지 않거나 종양세포의 10% 미만에서 막염색이 관찰된다.

스코어 1+ 희미한/겨우 감지할 수 있는 막염색이 종양세포의 10% 이상에서 검출된다. 세포는 그 막의 일부만 염색된다.

스코어 2+ 약하거나 중간정도의 완전한 막염색이 종양세포의 10% 이상에서 관찰된다.

스코어 3+ 중간정도에서 강한 완전한 막염색이 종양세포의 10% 이상에서 관찰된다.

ErbB2 과발현 평가에 대해 0 또는 1+ 스코어를 가진 종양들은 ErbB2를 과발현하지 않는 것으로 특정될 수 있는 반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 가진 종양은 ErbB2를 과발현하는 것으로 특정된다.

선택적으로, 또는 추가적으로, 포르말린-고정, 파라핀-함침 종양조직에 대해 INFORMTM(*Ventana, Arizona가 판매) 또는 PATHVISIONTM(Vysis, Illinois)과 같은 FISH 분석을 행하여 종양에서의 ErbB2 과발현의 정도(만일 존재한다면)를 확인할 수 있다.

본 명세서에서 치료되는 전립선암은 EGFR과 같은 ErbB 수용체의 과도한 활성화로 특징지어지는 것일 수 있다. 그러한 과도한 활성화는 ErbB 수용체의 또는 ErbB 리간드의 과발현 또는 증가된 생산에 기여할 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 환자의 암이 ErbB 수용체의 과도한 활성화에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여 진단 또는 예후 분석을 행할 것이다. 예를 들면, 암에서의 ErbB 유전자 증폭 및/또는 ErbB 수용체의 과발현을 확인할 수 있다. 그러한 증폭/과발현을 확인하기 위한 다양한 분석은 당해 기술분야에서 이용할 수 있고, 그 예로는 상기 설명한 IHC, FISH 및 유출 항원분석이 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 종양내 또는 종양과 관련된, TGF- α 와 같은, ErbB 리간드 수준은 공지의 절차에 따라 확인

할 수 있다. 그러한 분석은 시험되는 시료 중에서 그것을 암호화하는 핵산 및/또는 단백질을 검출할 수 있다. 일 실시형태에서, 종양 내의 ErbB 리간드 수준은 면역조직화학(IHC)을 이용하여 확인할 수 있다(예를 들면, Scher *et al. Clin. Cancer Research* 1:545-550(1995) 참조). 선택적으로, 또는 추가적으로, FISH, 서던 블랏팅, 또는 PCR기술을 통해 시험되는 시료 내의 ErbB 리간드-암호화 핵산의 수준을 평가할 수 있다.

또한, ErbB 수용체 또는 ErbB 리간드 과발현 또는 증폭은 예를 들면, 검출되는 분자에 결합하고 검출가능한 표지(예를 들면, 방사선 동위원소)로 표지된 (항체와 같은) 분자를 투여하고 표지의 위치에 대해 외부에서 환자를 스캐닝함으로써 생체 내 진단분석을 이용하여 평가할 수 있다.

어떤 실시형태에서는, 세포독성제와 접합된 항-ErbB2 항체를 포함하는 면역접합체를 환자에게 투여한다. 바람직하게는, 면역접합체 및/또는 그것에 결합한 ErbB2 단백질은 그것이 결합한 암세포를 사멸시키는데 면역접합체의 치료효능을 증가시킨다. 바람직한 실시형태에서, 세포독성제는 암세포에서 핵산을 표적으로 하거나 핵산을 방해한다. 그러한 세포독성제의 예로는 마이탄시노이드, 칼리치마이신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제가 포함된다.

항-ErbB2 항체 또는 면역접합체는 정맥과 또는 일정기간동안 연속주입에 의한 정맥투여, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 포막내, 경구, 국부, 또는 흡인투여와 같은 같은 공지의 방법에 따라 인간환자에게 투여한다. 항체의 정맥 또는 피하투여가 바람직하다.

다른 치료법을 항-ErbB2 항체의 투여와 조합할 수 있다. 조합된 투여에는 별도의 조성 또는 단일 약학적 조성을 이용하여 공동투여하는 것, 및 양(또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘할 수 있는 시간에 순서대로 연속투여하는 것이 포함된다.

바람직한 일 실시형태에서, 환자를 2가지 다른 항-ErbB2 항체로 치료한다. 예를 들면, 환자는 성장저해성인 제2 항-ErbB2 항체(예를 들면, HERCEPTEST[®]) 또는 ErbB2-과발현 세포의 세포자멸사를 유도하는 항-ErbB2 항체(예를 들면, 7C2, 7F3, 또는 이들의 인간화된 변형체)뿐 아니라 ErbB 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 제1 항-ErbB2 항체로 또는 모노클로날 항체 2C4의 생물학적 특성을 가지는 항체로 치료할 수 있다. 그러한 조합치료는 상승적 치료효과를 가져오는 것이 바람직하다.

항-ErbB2 항체 또는 항체들의 투여를 다른 종양관련항원에 대한 항체의 투여와 조합하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우 예를 들면, 다른 항체는 EGFR, ErbB3, ErbB4 또는 혈관내피성장인자(VEGF)에 결합할 수 있다.

일 실시형태에서, 본 발명의 치료는 항-ErbB2 항체(또는 항체들) 및 하나 이상의 화학요법제 또는 성장저해제의 조합된 투여를 포함할 수 있고, 다른 화학요법제의 카테일의 공동투여가 포함된다. 바람직한 화학요법제에는 타산(파클리탁셀 및 도세탁셀 등) 및/또는 안트라사이클린 항생제가 포함된다. 그러한 화학요법제에 대한 제제 및 투여계획은 제조자 지시에 따르거나 기술자가 실험적으로 확인한 바와 같이 사용할 수 있다. 그러한 화학요법에 대한 제제 및 투여계획은 문헌에도 기재되어 있다(Chemotherapy Service Ed. M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)).

항체는 타목시펜과 같은 항-에스트로겐 화합물; 오나프리스톤과 같은 항-프로게스테론(EP 616 812 참조); 또는 플루타미드와 같은 항-안드로겐 등의 항-호르몬성 화합물과 그러한 분자에 대해 공지된 투여량으로 조합될 수 있다. 치료되는 암이 안드로겐 비의존성 암인 경우, 환자는 항-안드로겐치료를 받았을 수 있고, 암이 안드로겐 비의존성이 된 후, 항-ErbB2 항체(및 선택적으로 본 명세서에 개시된 다른 약제)를 환자에게 투여할 수 있다.

때로는, 환자에게 (치료와 관련된 심근기능부전을 방지하거나 감소시키기 위하여) 심장보호제 또는 하나 이상의 사이토카인을 공동투여하는 것이 바람직할 수도 있다. 상기 치료법 외에도, 환자에게 암세포의 외과적 제거 및/또는 방사선치료를 할 수도 있다. 상기 공동투여된 약제 중 어느 것에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되는 것이고, 약제와 항-ErbB2 항체의 조합작용(상승)으로 인해 낮아질 수도 있다.

질병의 예방 또는 치료를 위하여, 항체의 적당한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료되는 질병의 형태, 질병의 심각도 및 진행, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 이전 치료, 환자의 임상병력 또는 항체에 대한 응답, 및 참가하는 의사의 재량에 따라 다를 것이다. 항체는 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여되는 것이 적합하다. 질병의 형태 및 심각도에 따라, 1회 이상의 별도의 투여, 또는 연속주입에 의해 환자에게 투여하기 위한 초기투여량은 약 1 μ g/kg 내지 15mg/kg(예를 들면, 20mg/kg)의 항체이다. 일반적인 일일투여량은 상기 인자들에 따라, 약 1 μ g/kg 내지 100mg/kg 이상

이다. 7일 이상의 반복된 투여를 위해, 병에 따라, 질병징후가 원하는 정도로 억제될 때까지 치료를 계속한다. 바람직한 투여법은 항-ErbB2 항체를 약 4mg/kg의 초기 로딩 투여량을 투여한 후 약 2mg/kg의 매주 유지투여량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여법도 이용할 수 있다. 이 치료의 진행은 통상의 기술 및 분석에 의해 쉽게 관찰된다.

환자에게 항체를 투여하는 것을 별도로 하고, 본 출원은 유전자치료에 의해 항체를 투여하는 것을 고려한다. 항체를 암호화하는 핵산을 투여하는 것은 "치료적으로 유효한 양의 항체를 투여한다"는 표현에 포함된다(예를 들면, 세포내 항체를 생성하기 위한 유전자치료의 사용에 관한 1996년 3월 14일 공개된 WO96/07321). 환자의 세포에 핵산(선택적으로 벡터 내에 함유된 것)을 넣기 위한 2가지 주요한 접근방식이 있다: 생체 내 및 생체 외. 생체 내 전달을 위해서, 핵산은 일반적으로 항체가 필요한 위치에서 환자에게 직접 주입된다. 생체 외 치료를 위해서, 환자의 세포를 제거하고, 핵산을 이들 분리된 세포에 도입하고, 변형된 세포를 직접 투여하거나 환자에게 이식된 다공성 막 내에 캡슐화시킨다(예를 들면, 미국특허 제 4,892,538호 및 제5,283,187호 참조). 핵산을 생육가능세포 속으로 도입하는데 이용할 수 있는 기술은 다양하다. 이러한 기술은 핵산이 원하는 숙주의 세포 중의 시험관 내 또는 생체 내에서 배양된 세포 속으로 전이되는지 여부에 따라 다양하다. 핵산을 시험관 내에서 포유동물 세포 속으로 전이하는데 적합한 기술로는 리포솜 사용, 일렉트로포레이션, 미세주입, 세포융합, DEAE-덱스트란, 칼슘 포스페이트 침전법 등이 포함된다. 유전자의 생체 외 전달을 위해 흔히 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

현재 바람직한 생체내 핵산 전이 기술에는 바이러스 벡터(아데노바이러스, 단순포진 I 바이러스, 또는 아데노-관련 바이러스 등)를 이용한 트랜스фек션 및 지질계 시스템(지질-매개 유전자전달에 필요한 지질은 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol 등)이 포함된다. 어떤 상황에서는, 핵산공급원에 세포표면 단백질 또는 표적세포에 특이적인 항체, 표적세포 상의 수용체에 대한 리간드와 같은 표적세포를 표적으로 하는 약제를 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜을 사용하는 경우, 특정세포형태에 반응하는 캡시드 단백질 또는 이의 단편, 순환하는 동안 내부화되는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 위치를 표적으로 하고 세포내 반감기를 증진시키는 단백질 등의 흡수를 촉진 및/또는 표적화하기 위하여 엔도사이토시스와 관련된 세포표면 막단백질에 결합하는 단백질을 사용할 수 있다. 수용체-매개 엔도사이토시스의 기술은 문헌에 설명되어 있다(예를 들면, Wu *et al.*, *J. Bio. Chem.* 262:4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)). 현재 공지된 유전자표지 및 유전자치료 프로토콜의 검토를 위해서는 문헌{Anderson *et al.*, *Science* 256:808-813 (1992)}을 참조. WO93/25673 및 본 명세서에서 인용된 다른 인용문헌들도 참조.

V. 제품

본 발명의 다른 실시형태에서, 전립선암의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 용기와 관련되거나 용기 상의 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 용기는 병을 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고 멸균 접근포트를 가질 수 있다(예를 들면, 용기는 피하주사바늘에 의해 구멍을 뚫을 수 있는 마개를 가진 바이알 또는 정맥주입용액 주머니일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성제는 항-ErbB2 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 전립선암, 안드로겐 비의존성 전립선암, 또는 안드로겐 의존성 전립선암을 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 또한, 제품은 (a) ErbB2에 결합하여 ErbB2를 과발현하는 암세포의 성장을 저해하는 제1항체를 포함하는 조성물이 함유된 제1용기; 및 (b) ErbB2에 결합하여 ErbB 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 제2항체를 포함하는 조성물이 든 제2용기를 포함한다. 본 발명의 이 실시형태에서의 제품은 제1 및 제2 항체 조성물이 전립선암을 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 나타내는 패키지 삽입물을 더 포함할 수 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 제품은 주입용 정균수(bacteriostatic water for injection, BWFI), 인산완충염수, 링거액 및 텍스트로즈용액과 같은 약학적으로 허용가능한 버퍼를 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 또한, 다른 버퍼, 희석액, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수도 있다.

VI. 물질의 기탁

하기 하이브리도마 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA)에 기탁하였다.

항체명칭 ATCC번호 기탁일

7C2 ATCC HB-12215 1996년 10월 17일

7F3 ATCC HB-1221 1996년 10월 17일

4D5 ATCC CRL 10463 1990년 5월 24일

2C4 ATCC HB12697 1999년 4월 8일

본 발명의 보다 상세한 내용의 하기의 비제한적 실시예에 의해 설명된다. 명세서 중의 모든 인용문헌은 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.

실시예

(실시예 1)

모노클로날 항체 2C4의 생산 및 특성화

ErbB2의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 쥐의 모노클로날 항체 2C4, 7F3 및 4D5를 문헌{Fendly *et al.*, *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)}에 기재된 바와 같이 생산하였다. 이를 요약하면, 문헌{Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84:7158-7163 (1987)}에 기재된 바와 같이 생산된 (대략 1×10^5 ErbB2분자/세포를 발현하는) NIH3T3/HER2-3₄₀₀ 세포를 25mM EDTA를 함유하는 인산완충염수(phosphate buffered saline, 이하 "PBS"라 함)로 모아서 BALB/c 마우스를 면역화시키는데 사용하였다. 0, 2, 5 및 7주에 0.5ml PBS 중의 10^7 세포를 마우스에 복강내 주입하였다. 9주 및 13주에 밀의 맥아 아글루티닌-세파로즈(WGA) 정제된 ErbB2 막추출물을 ^{32}P -표지 ErbB2를 면역침전시키는 항혈청을 가진 마우스에 복강내 주입하였다. 그 다음에 ErbB2 제제 0.1ml를 정맥주사하고, 비세포(splenocyte)를 마우스 골수종 세포주 X63-Ag8.653과 융합시켰다. ELISA 및 방사선면역침전법을 사용하여 하이브리도마 상등액을 ErbB2-결합에 대하여 스크리닝하였다.

모노클로날 항체 4D5, 7F3 및 2C4가 결합하는 ErbB2 에피토프를 경쟁결합분석{Fendly *et al.*, *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)}에 의해 확인하였다. 형광을 정량하기 위한 PANDEXTM 스크린장치를 사용하여 완전한 세포에 대한 직접 형광에 의해 항체 상에서 교차차단연구를 행하였다. 공지의 절차{Wofsy *et al. Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W. J. Freeman Co. (1980)}를 사용하여, 각 모노클로날 항체를 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 접합시켰다. NIH3T3/HER2-3₄₀₀ 세포의 융합성 단일층들을 트립신처리하고, 1회 세척하고, 0.5% 우혈청알부민(bovine serum albumin, 이하 "BSA"라 함)과 0.1% NaN_3 를 함유하는 냉각 PBS 내에서 1.75×10^6 세포/ml로 재현탁하였다. 최종농도 1% 라텍스입자(IDC, Portland, OR)를 PANDEXTM 플레이트 막의 장애물을 줄이기 위해 첨가하였다. 현탁액 20 μl 중의 세포, 및 20 μl 의 정제된 모노클로날 항체(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 PANDEXTM 플레이트 조에 첨가하고 얼음 위에서 30분동안 배양하였다. 20 μl 중의 FITC-표지 모노클로날 항체의 소정의 희석액을 각 조에 첨가하고, 30분동안 배양하고, 세척하고, PANDEXTM에 의해 형광을 정량하였다. 모노클로날 항체는 각 항체가 다른 항체의 결합을 관련없는 모노클로날 항체 대조구에 비해 50% 이상으로 차단한다면 하나의 에피토프를 공유하는 것으로 생각하였다. 이 실험에서, 모노클로날 항체 4D5, 7F3 및 2C4를 각각 에피토프 I, G/F 및 F로 정하였다.

모노클로날 항체 2C4, 7F3 및 4D5의 성장저해특성은 유방암 세포주 SK-BR-3 {Hudziak *et al.*, *Molec. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)}을 사용하여 평가하였다. 이를 요약하면, SK-BR-3 세포를 0.25%(부피/부피) 트립신을 사용하여 분리하고 4×10^5 세포/ml의 농도로 완전배지에 현탁하였다. 100 μl 의 분획(4×10^4 세포)을 96조 미세회석 플레이트에 도말하여 세포들이 부착하도록 한 후, 배지 단독 또는 모노클로날 항체를 함유하는 배지(최종농도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 100 μl 를 첨가하였다. 72시간 후, 플레이트를 PBS(pH 7.5)로 2회 세척하고, 크리스탈 바이올렛(메탄올 중의 0.5%)으로 염색하고, 문헌{Sugarman *et al. Science* 230:943-945 (1985)}에 기재된 바와 같이 상대세포증식에 대해 분석하였다. 모노클로날 항체 4D5가 약 56% 저해한 것에 비해, 모노클로날 항체 2C4 및 7F3는 SK-BR-3 상대세포증식을 각각 약 20% 및 약 38% 저해하였다.

모노클로날 항체 2C4, 4D5 및 7F3를 MCF7 세포의 전세포 용해물로부터 Mr 180,000 범위 내인 단백질의 HRG-자극 티로신 인산화를 저해하는 능력에 대해 평가하였다{Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)}. MCF7 세포는 모든 공지된 ErbB 수용체를 발현하지만 비교적 낮은 수준으로 발현하는 것으로 보고되고 있다. ErbB2, ErbB3 및 ErbB4는 거의 동일한 분자크기를 가지기 때문에, 웨스턴 블랏 분석에 의해 전세포 용해물을 평가할 때 어느 단백질이 티로신 인

산화되는지 식별하는 것은 불가능하다. 그러나, 외부적으로 첨가된 HRG 없이, 사용된 분석조건들 하에서, M_r 180,000 범위 내의 티로신 인산화 단백질을 검출할 수 없는 수준으로 낮게 나타내기 때문에 이들 세포는 HRG 티로신 인산화분석을 위해서는 이상적이다.

MCF7 세포를 24조 플레이트에 도말하고 ErbB2에 대한 모노클로날 항체를 각 조에 첨가하여 실온에서 30분간 배양하였다: 그 다음에 최종 농도 0.2nM이 되도록 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄를 각 조에 첨가하고, 8분동안 계속 배양하였다. 각 조로부터 배지를 조심스럽게 흡인해 내고, 100 μ l의 SDS 시료버퍼(5% SDS, 25mM DTT, 및 25mM Tris-HCl, pH 6.8)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 각 시료(25 μ l)를 4-12% 구배겔(Novex) 상에서 전기영동한 후 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막으로 전기영동으로 옮겼다. 항포스포티로신(4G10, UBI사, 1 μ g/ml로 사용) 면역블랏을 전개시키고, M_r ~ 180,000에서 우세한 반응성 밴드의 강도를 문헌{Holmes *et al. Science* 256:1205-1210 (1992); Sliwowski *et al. J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994)}에 기재된 바와 같이 반사율 농도계로 정량하였다.

모노클로날 항체 2C4, 7F3, 및 4D5는 M_r 180,000에서 HRG-유도된 티로신 인산화신호의 생성을 상당히 저해하였다. HRG가 없는 경우, 이들 항체중 어느 것도 M_r 180,000 범위 내인 단백질의 티로신 인산화를 자극하지 못했다. 또한, 이들 항체는 EGFR{Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558(1990)}, ErbB3, 또는 ErbB4와 교차반응하지 않는다. 항체 2C4 및 7F3은 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 대조군의 25% 미만까지 상당히 저해하였다. 모노클로날 항체 4D5는 티로신 인산화의 HRG 자극을 ~50%까지 차단할 수 있었다. 도 2a는 반사율 농도계에 의해 확인된 바와 같이 p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 2C4 또는 7F3 저해에 대한 투여량-반응 곡선을 나타낸다. 4-파라미터 표준적합도를 사용한 이들 저해곡선의 평가결과, 2C4 및 7F3에 대한 IC₅₀은 각각 2.8 ± 0.7 nM 및 29.0 ± 4.1 nM이었다.

항-ErbB2 항체를 사용한 MCF7 유방암 세포주에 대한 HRG결합 저해는 얼음 위에서 24-조 플레이트 형태에서 단일층 배양으로 행해졌다{Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)}. 항-ErbB2 모노클로날 항체를 각 조에 첨가하고 30분 동안 배양하였다. ¹²⁵I-표지 rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄(25pm)을 첨가하고, 4 내지 16시간 동안 계속 배양하였다. 도 2b는 MCF7 세포에 대한 HRG 결합의 2C4 또는 7F3 저해에 대한 투여량-반응 곡선을 나타낸다. 2C4 또는 7F3의 농도를 변화시키면서 ¹²⁵I-표지 rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄의 존재 하에 MCF7 세포를 사용하여 배양하고, 저해곡선을 도 2b에 나타낸다. 이들 데이터를 분석한 결과, 2C4 및 7F3에 대한 IC₅₀은 각각 2.4 ± 0.3 nM 및 19.0 ± 7.3 nM이었다.

MCF7세포에서 관찰된 항-ErbB2 항체의 효과가 일반적인 현상인지 여부를 확인하기 위하여, 인간 종양세포주를 2C4 또는 7F3와 함께 배양하고, 특이적 ¹²⁵I-표지 rHRG β 1 결합을 확인했다{Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)}. 이 연구의 결과를 도 3에 나타내고 있다. ErbB2를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 것으로 보고된 유방암 세포주 MDA-MB-468을 제외하고 모든 세포주에서 ¹²⁵I-표지 rHRG β 1의 결합은 2C4 또는 7F3에 의해 상당히 저해될 수 있었다. 나머지 세포주들은 세포주에 따라 다양한 발현수준으로 ErbB2를 발현하는 것으로 보고된다. 사실, 시험된 이들 세포주에서 ErbB2 발현의 범위는 2차수 이상의 크기로 변화한다. 예를 들면, BT20, MCF7, 및 Caov3은 $\sim 10^4$ ErbB2 수용체/세포를 발현하는 한편, BT-474 및 SK-BR-3는 $\sim 10^6$ ErbB2 수용체/세포를 발현한다. 이들 세포에서의 광범위한 ErbB2 발현 및 상기와 같은 데이터를 생각하면, ErbB2 및 ErbB3 또는 ErbB4 사이의 상호작용이 플라즈마 막의 표면에서 일어나는 고친화성 상호작용 자체라고 결론을 지을 수 있었다.

외인성 rHRG β 1의 존재 및 부재 하에서 MDA-MB-175 및 SK-BR-3세포에 대한 모노클로날 항체 2C4 및 4D5의 성장저해효과를 평가하였다{Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)}. MDA-MB-175 세포에서 ErbB2 수준은 정상적인 유방상피세포에서 발현되는 수준보다 4-6배 높고, ErbB2-ErbB4 수용체는 MDA-MB-175 세포 내에서 구성적으로 티로신 인산화된다. MDA-MB-175 세포에 항-ErbB2 모노클로날 항체 2C4 및 4D5(10 μ g/ml)를 4일 동안 처리하였다. 크리스탈 바이올렛 염색 분석에서, 2C4와 함께 배양하면 이 세포주에 대한 강한 성장저해효과를 나타내었다(도 4a). 외인성 HRG는 이러한 저해를 그다지 역전시키지 못했다. 한편, 2C4는 ErbB2 과발현 세포주 SK-BR-3에 대한 저해효과를 전혀 나타내지 않았다(도 4b). 모노클로날 항체 2C4는 외인성 HRG의 존재 및 부재 하 모두에서 모노클로날 항체 4D5보다 훨씬 많이 MDA-MB-175 세포의 세포증식을 억제할 수 있었다. 4D5에 의한 세포증식의 저해는 ErbB2 발현수준에 의존한다{Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)}. SK-BR-3 세포에서의 최대저해가 66%인 것을 확인하였다(도 4b). 그러나, 이 효과는 외인성 HRG에 의해 극복될 수 있었다.

(실시예 2)

ErbB2와 ErbB3의 HRG 의존성 결합은 모노클로날 항체 2C4에 의해 차단된다.

ErbB3의 ErbB2와의 결합능을 공동면역침전 실험에서 시험하였다. 1.0×10^6 MCF7 또는 SK-BR-3 세포를 10% 우태아 혈청(BS) 및 10mM HEPES, pH 7.2를 함유하는 50:50 DMEM/Ham의 F12배지(성장배지)에서 6조 조직배양 플레이트에 접종하고, 밤새 부착시켰다. 실험을 시작하기 전에 혈청을 추가하지 않은 성장배지에서 2시간 동안 세포들을 단식시켰다.

세포들을 PBS로 짧게 세척한 후 10mM HEPES, pH 7.2와 함께 0.2%(w/v) BSA, RPMI 배지(결합버퍼) 내에서 희석된 상기 항체 100nM로, 또는 결합버퍼만(대조구)으로 배양하였다. 실온에서 1시간 후, 조의 반(+)에 최종 농도 5nM로 HRG를 첨가하였다. 유사한 부피의 결합버퍼를 나머지 조(-)에 첨가하였다. 약 10분동안 계속 배양하였다.

흡인에 의해 상등액을 제거하고, 세포를 0.2mM PMSF, 10 μ g/ml 류펩틴, 10 TU/ml 아프로피닌을 함유하는 RPMI, 10mM HEPES, pH 7.2, 1.0% v/v TRITON X-100TM, 1.0% w/v CHAPS(용해버퍼)에서 용해시켰다. 용해물을 원심분리하여 불용성물질을 제거하였다.

친화성 겔(Affi-Prep 10, Bio-Rad)에 공유결합된 모노클로날 항체를 사용하여 ErbB2를 면역침전시켰다. 이 항체(Ab-3, Oncogene Sciences)는 세포질 도메인 에피토프를 인식한다. 약 8.5 μ g의 고정된 항체를 함유하는 10 μ l의 겔 슬러리를 각 용해물에 첨가하여 면역침전을 시키고, 시료를 실온에서 2시간 동안 혼합하였다. 그 다음에 겔을 원심분리에 의해 모았다. 용해버퍼를 사용하여 겔을 배치식으로 3회 세척하여 미결합물질을 제거하였다. 그 다음에 SDS 시료버퍼를 첨가하고, 시료를 비등수형 반응조에서 짧게 가열하였다.

상등액을 4-12% 폴리아크릴아미드 겔에서 전개시켜 니트로셀룰로오스 막위로 전기블랏시켰다. 이의 세포질 도메인 에피토프(c-17, Santa Cruz Biotech)에 대한 폴리클로날 항체와의 블랏을 조사하여 ErbB3의 존재를 평가하였다. 화학발광기질(ECL, Amersham)을 사용하여 블랏을 가시화하였다.

각각 MCF7 및 SK-BR-3 세포에 대한 도 5a 및 5b의 대조구 라인에서 알 수 있는 바와 같이, ErbB3는 세포가 HRG로 자극되는 경우에만 ErbB2 면역침전에 존재하였다. 세포가 모노클로날 항체 2C4로 먼저 배양되면, ErbB3 신호는 MCF7세포에서 없어지거나(도 5a, 라인 2C4+) SK-BR-3세포에서는 실질적으로 감소하였다(도 5b, 라인 2C4+). 도 5a와 5b에서 알 수 있는 바와 같이, 모노클로날 항체 2C4는 MCF7 및 SK-BR-3 세포 모두에서 ErbB3의 ErbB2와의 헤레굴린 의존성 결합을 HERCEPTIN[®] 보다 실질적으로 더 효과적으로 차단한다. HERCEPTIN[®]으로 전배양하면 MCF7 용해물에서 ErbB3 신호가 감소되지만, SK-BR-3 용해물로부터 공동침전된 ErbB3의 양에는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않았다. EGF 수용체에 대한 항체(Ab-1, Oncogene Sciences)를 사용하여 전배양하면 어느 세포주에서도 ErbB3의 공동면역침전하는 능력에 영향을 미치지 않았다.

(실시예 3)

인간화된 2C4 항체 및 친화성 성숙 2C4 항체 변형체

먼저 쥐의 모노클로날 항체 2C4의 가변 도메인을 벡터에 클로닝하여 쥐/인간 키메라 Fab 단편을 생산하게 하였다. 총 Stratagene RNA 추출 키트를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 하이브리도마 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. RT-PCR에 의해 가변 도메인을 증폭시키고, 겔 정제하여, 상기 설명된 바와 같이{Carter *et al.* PNAS(USA) 89:4285 (1992); 및 미국특허 제5,821,337호} 인간 카파 불변 도메인 및 인간 C_H1 도메인을 함유하는 pUC119계 플라스미드의 유도체 속으로 삽입하였다. Fab 단편을 발현시키기 위하여 생성된 플라스미드를 대장균주 16C9에 형질전환시켰다. 배양물의 성장, 단백질 발현의 유도, 및 Fab 단편의 정제는 이미 설명된 바와 같았다{Werther *et al.* J. Immunol. 157:4986-4995 (1996); Presta *et al.* Cancer Research 57:4593-4599 (1997)}. MCF 세포에 대한 ¹²⁵I-HRG 결합을 저해하고 MCF7 세포에서 p180 티로신 인산화의 rHRG 활성화를 저해하는 능력에 대하여, 정제된 키메라 2C4 Fab 단편을 쥐의 모항체 2C4와 비교하였다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 키메라 2C4 Fab 단편은 인간 유방암세포주 MCF7에 대한 고친화성 ErbB2-ErbB3 결합부위의 형성을 중단시키는데 매우 효과적이다. 완전한 쥐의 2C4에 대해 계산한 상대 IC₅₀ 값은 4.0 ± 0.4 nM인 반면, Fab 단편에 대한 값은 7.7 ± 1.1 nM이다. 도 6b에서 나타난 바와 같이, 1가 키메라 2C4 Fab 단편은 HRG-의존성 ErbB2-ErbB3 활성화를 중단시키는데 매우 효과적이다. 완전한 쥐의 2C4에 대해 계산한 IC₅₀ 값은 6.0 ± 2 nM인 반면, Fab 단편에 대한 값은 15.0 ± 2 nM이다.

키메라 클론의 DNA서열을 확인하여 CDR 잔기를 확인하였다(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 올리고뉴클레오타이드 위치특이적 돌연변이유발을 이용하여, 이미 설명한 바와 같이 플라스미드 VX4 상에 함유된 이들 6개의 CDR 영역 모두를 완전한 인간외곽구조(V_L 카파 서브그룹 I 및 V_H 서브그룹 III)에 도입하였다(Presta *et al. Cancer Research* 57:4593-4599 (1997)). 생성된 "CDR-교환"으로부터의 단백질을 상기와 같이 발현시켜 정제하였다. 결합연구는 2가지 형태를 비교하여 행하였다. 이를 요약하면, NUNC MAXISORP™ 플레이트를 4℃에서 밤새 50mM 탄산염 버퍼, pH 9.6에서 ErbB2 세포외 도메인(ECD; WO90/14357에 기재된 바와 같이 생산됨) 1 μ g/ml로 코팅한 후, 실온에서 1시간 동안 ELISA 희석제 (0.5% BSA, 0.05% 폴리소르베이트 20, PBS)로 차단하였다. ELISA 희석제로 연속 희석한 시료를 플레이트에서 2시간동안 배양하였다. 세척 후, 결합된 Fab 단편을 비오틴화된 쥐의 항-인간 카파 항체(ICN 634771)를 사용한 후 스트렙타비딘(streptavidin)-접합 서양고추냉이 퍼옥시다제(Sigma)로, 기질로서 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 사용하여 검출하였다. 450nm에서의 흡광도를 판독하였다. 도 8a에 나타난 바와 같이, CDR-교환 인간 Fab 단편의 구성에서는 모든 결합이 소실되었다.

인간화된 Fab의 결합을 회복시키기 위하여, 주형으로 CDR-교환의 DNA를 사용하여 돌연변이를 구성하였다. 컴퓨터생성 모델을 사용하여(도 9), 이들 돌연변이는 그 변화가 CDR 형태 또는 항체-항원 접촉면에 영향을 미칠 수 있는 위치에서 인간 외곽구조 영역 잔기를 쥐의 대응부로 바꾸도록 디자인하였다. 돌연변이를 표 2에 나타낸다.

[표 2]
인간화된 2C4 FR 돌연변이의 지정

돌연변이 번호	외곽구조영역(FR) 치환
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

다양한 돌연변이에 대한 결합곡선이 도 8a 내지 8c에 나타나 있다. 변화 ArgH71Val, AspH73Arg 및 IleH69Leu를 가진 인간화된 Fab 574형은 원 키메라 2C4 Fab 단편에 비해 결합이 회복된 것으로 나타난다. L2, L54, L55, L56, H35 및/또는 H48과 같은 추가적인 FR 및/또는 CDR 잔기는 인간화된 항체의 결합을 더 정제하거나 증진하기 위하여 변형될 수도 있다(예를 들면, 다음과 같이 치환 - IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser; 및 ValH48Ile). 선택적으로 또는 부가적으로, 인간화된 항체는 이의 친화력 및/또는 다른 생물학적 활성을 더 개선하거나 정제하기 위하여 (상기와 같이) 친화성 성숙될 수 있다.

인간화된 2C4 574형은 파지(phage)-디스플레이법을 사용하여 친화성 성숙되었다. 이를 요약하면, 인간화된 2C4.574 Fab를 유전자 III 융합과 같은 파지 디스플레이 벡터속에 클로닝하였다. M13KO7 헬퍼 파지로 감염시켜 파지입자를 유도하면, 이 융합에 의해 Fab가 파지 꼬리-섬유 단백질인 유전자 III의 N-말단에 디스플레이된다(Baca *et al. J Biol Chem.* 272:10678 (1997)).

상기 확인된 6 CDR 각각에 대하여 개별적인 라이브러리를 구성하였다. 이들 라이브러리에서, ErbB2에 대한 결합에 있어서 잠재적으로 중요하기 때문에 컴퓨터 생성모델(도 9)을 사용하여 확인한 CDR 내의 아미노산을 그들의 코돈으로서 "NNS"를 함유하는 올리고를 사용하여 임의추출하였다. 그 다음에 라이브러리들을 모든 차단용액 대신 사용된 0.2% TWEEN 20®(MPBST)를 가진 PBS에서 3% 분유가 있는 NUNC MAXISORP™ 플레이트에 코팅된 ErbB2 ECD에 대해 도말하였다. 3, 4 및 5회 도말에서 2C4.574보다 높은 친화성을 가진 파지를 선택하기 위하여, 경쟁자로서 세척단계동안 가용성 ErbB2 ECD 또는 가용성 Fab 2C4.574를 첨가하였다. 세척시간을 실온에서 1시간까지 연장하였다.

5회 도달한 후, 개별적인 클론을 파지-ELISA에 의해 다시 분석하였다. 개별적인 클론을 Costar 96-조 U-바닥 조직배양 플레이트에서 배양하고, 헬퍼 파지를 추가하여 파지를 유도하였다. 밤새 성장시킨 후, 대장균을 펠렛화하고, 파지-함유 상등액을 96-조 플레이트로 옮겨, 실온에서 1시간 동안 MPBST로 파지를 차단하였다. ErbB2 ECD로 코팅된 NUNC MAXISORP™ 플레이트도 상기와 같이 MPBST로 차단하였다. 차단된 파지를 플레이트에서 2시간동안 배양하였다. 세척 후, 결합된 파지를 MPBST에서 1:5000 희석된 서양고추냉이-퍼옥시다제-접합된 항-M13 모노클로날 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01)를 사용하고, 기질로서 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘에 의해 검출하였다. 흡수도는 450nm에서 관독하였다.

최고 신호를 나타내는 각 라이브러리 중 48클론의 DNA서열을 확인하였다. 그 서열이 가장 흔히 나타나는 클론을 상기 벡터에 서브클로닝하여 가용성 Fab를 발현시켰다. 이들 Fab를 유도하고, 단백질을 정제하고, 정제된 Fab를 상기와 같이 ELISA에 의해 결합을 분석하여, 그 결합을 출발형인 인간화된 2C4.574형의 결합과 비교하였다.

각 CDR에서의 관심있는 돌연변이를 동정한 후, 이들을 다양하게 조합한 추가 돌연변이를 구성하여 상기와 같이 시험하였다. 574와 관련하여 개선된 결합을 나타내는 돌연변이를 표 3에 나타낸다.

[표 3]
2C4.574의 친화성 성숙으로부터 유도된 돌연변이의 지정

돌연변이명	574로부터의 변화	돌연변이/574*
H3.A1	serH99trp, methH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, theH30ser, methH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, methH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, methH34leu	0.215
654	serL50trp, methH34leu	0.176
655	methH34ser	0.542
659	serL50trp, methH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0.175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	theH28gln, theH30ser, methH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, methH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0.141

*Erb2-ECD ELISA에서의 표준곡선의 중간-0D를 나타내는데 필요한 574의 양에 대한 표준곡선의 중간-0D를 나타내는데 필요한 돌연변이 양의 비. 1.0 미만의 수는 돌연변이가 574가 결합하는 것보다 더 잘 Erb2에 결합한다는 것을 나타낸다.

다음의 돌연변이도 구성하였고, 현재 평가중이다.

659.L3.G6	serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
659.L3.G11	serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
659.L3.29	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
659.L3.36	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn

L2F5.L36	serL50trp, tyrL53gly, meth34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL99pro
L2F5.L3G6.655	serL50trp, tyrL53gly, meth34ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11.655	serL50trp, tyrL53gly, meth34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29.655	serL50trp, tyrL53gly, meth34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36.655	serL50trp, tyrL53gly, meth34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

상동성 스캔에 의해 제시된 다음의 돌연변이는 현재 구성중이다.

678	thrH30ala
679	thrH30ser
680	lysH64arg
681	leuH96val
682	thrL97ala
683	thrL97ser
684	tyrL96phe
685	tyrL96ala
686	tyrL91phe
687	thrL56ala
688	glnL28ala
689	glnL28glu

H34에서 바람직한 아미노산은 메티오닌일 것이다. 이 위치에서 산화가 일어난다면, 류신으로 변할 수 있다.

asnH52와 asnH53은 결합에 가장 바람직한 것으로 나타났다. 이들 잔기를 알라닌 또는 아스파르트산으로 변화시키면 결합이 크게 감소하였다.

인간 IgG1 중쇄 불변영역과 함께 인간화된 Fab 574형을 포함하는 완전한 항체가 제조되었다(미국특허 제5,821,337호 참조). 완전한 항체는 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO)세포로 생산하였다.

(실시예 4)

모노클로날 항체 2C4는 MAPK의 EGF, TGF- α 또는 HRG 매개 활성화를 차단한다.

많은 성장인자 수용체들은 마이토젠-매개 단백질 키나아제(MAPK)경로를 통해 신호를 전달한다.

이들 이중 특이성 키나아제는 궁극적으로 암세포가 분열하도록 하는 신호전달경로에서 중요한 말단 중 하나이다. 모노클로날항체 2C4 또는 HERCEPTIN[®]이 MAPK의 EGF, TGF- α 또는 HRG 활성화를 저해하는 능력은 다음의 방식으로 평가된다.

MCF7세포(10^5 세포/조)를 12조 세포배양 플레이트 중에 배지를 함유하는 혈청 내에 도말하였다. 다음날, 세포배지를 제거하고, 0.1% 혈청을 함유하는 신선한 배지를 각 조에 첨가하였다. 다음날 이 절차를 반복하고, 분석하기 전에 배지를 무혈청 결합버퍼로 대체하였다{Jones *et al.*, *Biol. Chem.* 273:11667-74(1998); and Schaefer *et al.*, *Biol. Chem.* 274:859-66(1999)}. 실온에서 세포들을 평형이 되도록 한 후 0.5ml의 200nM HERCEPTIN[®] 또는 모노클로날 항체 2C4로 30분 동안 배양하였다. 세포들을 1nM EGF, 1nM TGF- α 또는 0.2nM HRG로 10분동안 처리하였다. 세포배지를 흡인한 후 1% DTT를 함유하는 0.2ml SDS-PAGE 시료버퍼를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이전에 설명한 바와 같이 항-활성 MAPK항체(Promega)를 사용하여 웨스턴 블랏팅에 의해 MAPK 활성화를 평가하였다{Jones *et al.*, *Biol. Chem.* 273:11667-74(1998)}.

도 10에 나타난 바와 같이, 모노클로날 항체2C4는 HERCEPTIN[®] 보다 훨씬 크게 MAPK에 대한 EGF, TGF- α 및 HRG 매개 활성화를 차단했다. 이들 데이터는 모노클로날 항체 2C4가 EGFR 또는 ErbB3와의 결합에 사용되는 ErbB2의 표면에 결합하여 신호수용체복합체의 형성을 방지한다는 것을 나타낸다.

(실시예 5)

안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 인간 전립선암의 증식에 대한 HERCEPTIN®의 효과

안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 전립선암 이종이식편모델에서 HERCEPTIN® 단일치료 및 HERCEPTIN®과 파클리탁셀(paclitaxel)의 조합의 효과를 인간 전립선암의 증상이 나타나기전 모델에서 연구하였다. 안드로겐 의존성 CWR22 및 LNCaP 인간 전립선암 이종이식편 모델과 안드로겐 의존성 서브라인인 CWR22를 사용하였다{Nagabhushan *et al.*, *Cancer Res.* 56:3042-3046(1996); Wainstein *et al.*, *Cancer Res.* 54:6049-6052(1994); and Srearns *et al.* *Prostate* 36:56-58(1998)}.

재료 및 방법

동물연구. 국립암학회-프레드릭 암센터(National Cancer Institute-Frederick Cancer Center)에서 4 내지 6주령 누드 무흉선 BALB/c 암컷 및 수컷 마우스를 얻어 슬로안-케터링 연구소(Sloan-Kettering Institute)에서 가압 환기 우리에 두었다. 안드로겐 의존성 CWR22로부터 저민 종양조직 또는 1×10^6 LNCaP 세포로 수컷 동물에 피하 접종하고, 암컷에는 안드로겐을 중지한 후 종양을 재성장 및 증가된 혈청 PSA를 위하여 선택함으로써 얻어진 안드로겐 비의존성 서브라인 CWR22R, 또는 CWR22SA1, CWRSA4, CWRSA6을 주입하였다. 모든 라인에 이미 설명한 바와 같은 재구성된 기저막(Matrigel; Collaborative Research, Bedford, MA)을 함께 주입하였다{Nagabhushan *et al.* *Cancer Res.* 56:3042-3046(1996); Wainstein *et al.* *Cancer Res.* 54:6049-6052(1994); and Sato *et al.* *Cancer Res.* 57:1584-1589(1997)}. 혈청 테스토스테론 수준을 유지하기 위하여, 종양세포를 접종하기 전수컷 마우스에 12.5mg 지속배출 테스토스테론 펠렛(Innovative Research of America, Sarasota, FL)을 피하 이식하였다. 치료는 PBS 중의 20mg/kg HERCEPTIN®을 3주 이상동안 매주 2회씩 복강내 주입 및/또는 멸균식염수 중의 저투여량(6.25mg/kg s.c., 5x/주×3주) 또는 고투여량(12.5mg/kg s.c., 5x/주×2주) 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol Myers-Squibb Company, Princeton, NJ) 피하주입으로 구성된다. 대조구 마우스는 비히클만 주었다. 버니어 캘리퍼스를 사용하여 매 3-4일마다 종양을 측정하고, 종양부피를 하기 식에 의해 계산하였다.

$$p/6 \times \text{큰 직경} \times (\text{작은 직경})^2$$

부피가 65mm³ 이상인 명백하게 확립된 종양을 가진 동물을 치료그룹으로 지정하였다.

이종이식편의 *ErbB2* 상태의 확인. DAKO *ErbB2* 키트(HERCEPTEST®, DAKO Corporation, Carpinteria, CA)를 사용하여 면역조직화학에 의해 이종이식편의 *ErbB2* 발현에 대해 분석하였다. 시료들을 DAKO 키트 표준 내의 표준 대조구와 비교하여 무작위로 평가하고 다음과 같이 채점하였다: 0 (무염색, 또는 종양세포의 10% 미만에서 막염색), 1* (종양세포의 10% 이상에서 희미한 막염색), 2* (세포의 >10%에서 약하거나 중간정도의 완전한 막염색), 또는 3* (세포의 >10%에서 중간정도 내지 강한 완전한 막염색). 0 또는 1*의 점수는 *ErbB2* 과발현에 대해 부정적으로 생각된 반면, 2* 또는 3*은 *ErbB2* 과발현을 나타내었다. FISH 분석은 Oncor 키트(INFORM® *ErbB2* 유전자검출 시스템, Oncor Inc., Gaithersburg, MD)를 사용하여 행하였다. 각 종양에서 최소 100 종양세포를 핵 *ErbB2* 유전자 복제수에 대해 평가하였다{Ross *et al.* *Hum. Pathol.* 28:827-833 (1997)}.

혈청 PSA값의 결정. 등의 꼬리 정맥을 표면절개하여 마이크로테이너 혈청 분리기 튜브(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 모은 수컷 마우스의 혈액시료(~50ml)를 치료전, 치료 9일째 및 21일째에 채취하였다. 그 다음에 Tandem-R PSA 면역복사계 분석(Hybritech, San Diego, CA)을 사용하여 혈청으로부터 PSA값을 결정하였다.

통계분석. 치료그룹의 종양부피들 사이의 페어식 차이를 순열테스트를 사용하여 시간에 따라 비교하였다. 이 테스트의 가정은 치료가 시간에 따라 종양부피에 차등적 효과를 나타내지 않는다는 것이다. 상기 가설을 시험하기 위해 사용된 통계는 모든 시점에 대해 합한 평균 종양부피 간의 차이의 제곱의 합이었다.

$$SS_DEV = \sum_{i=1}^k (x_i - \bar{y}_i)^2$$

SS_DEV는 각 시점에서 치료그룹간 평균차이를 얻는데 사용하였다. 이 통계는 2개의 치료그룹의 평균 종양부피의 곡선이 다른 양을 나타낸다.

결과

전립선 이종이식편의 *ErbB2* 면역조직화학 염색 및 *ErbB2* 유전자복제수. 안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 전립선 이종이식편의 *ErbB2* 발현패턴을 면역조직화학(immunohistochemistry, IHC) 및 FISH에 의해 조사하였다. 모체 안드로겐 의존성 CWR22 종양은 2⁺ *ErbB2* 염색을 나타내었고, LNCaP는 3⁺ *ErbB2* 염색을 나타내었다. CWR22의 안드로겐 비의존성 서브라인은 *ErbB2*에 대해 2⁺(CWRSA1), 3⁺(CWRSA4), 2⁺(CWRSA6) 및 1⁺(CWR22R) 염색을 나타낸다. 모든 종양은 FISH에 의해 2-4 *ErbB2* 유전자복제(정상범위) 수를 가졌다.

확립된 전립선암 이종이식편에 대한 HERCEPTEST®의 효과. 잘 확립된 안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 전립선암 이종이식편에서 HERCEPTEST®의 효능을 평가하기 위하여 동물실험을 하였다. CWR22, LNCaP, CWR22R 및 CWRSA6 모델을 실험에 사용했는데, 이들이 재생가능한 성장곡선을 제공하기 때문이다. HERCEPTEST®은 이종이식편이 확립된 후 매주 2회 20mg/kg의 투여량으로 복강내 투여하였다. 대조구와 비교하였을 때, 안드로겐 비의존성 종양 중 어느 것에서도 종양성장에 대한 HERCEPTEST®의 효과는 관찰되지 않았다(CWR22R, p=0.60, n=10, 도 11a; CWRSA6, p=0.63, n=10, 도 11b). 마우스의 항-*ErbB2* 항체인 4D5도 CWR22R 안드로겐 비의존성 라인에서 종양증식에 효과를 나타내지 못했다(p=0.21, n=10). 이와 반대로, HERCEPTEST®은 안드로겐 의존성 이종이식편 모델인 CWR22(68% 성장저해; p<0.03, n=12, 도 11c) 및 LNCaP(89% 성장저해; p=0.002, n=12, 도 11d) 모두에서 상당한 성장저해를 나타내었다.

확립된 종양 이종이식편에 대한 TAXOL® 과 조합된 HERCEPTEST®의 효과. 파클리탁셀과 HERCEPTEST®을 동물에게 공동투여한 경우, 대조구에 비해 안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 종양 모두에 대한 종양부피에서 현저한 감소가 있었다(CWR22 98% 성장저해, p<0.01, 도 11e; CWR22R 92% 성장저해, p<0.01, 도 11g; LNCaP 94% 성장저해, p=0.006, 도 11f; CWRSA6 77% 성장저해, p<0.01, 도 11h). 각 약제를 단독으로 사용하는 경우에 비해 HERCEPTEST®과 파클리탁셀을 조합하면 안드로겐 의존성 이종이식편된 동물에서 치료기간 끝에서 성장저해가 증가하는 것으로 관찰되었다(도 11e 내지 11h): CWR22 그룹(평균종양부피, 각 그룹에서 n=6, 파클리탁셀 408mm³, HERCEPTEST® 520mm³, 파클리탁셀 및 HERCEPTEST® 76mm³; p<0.03 파클리탁셀 및 HERCEPTEST®에 대비한 파클리탁셀) 및 LNCaP 그룹(평균종양부피, 각 그룹에서 n=6, 파클리탁셀 233mm³, HERCEPTEST® 163mm³, 파클리탁셀 및 HERCEPTEST® 82mm³; p<0.03 파클리탁셀 및 HERCEPTEST®에 대비한 파클리탁셀). 또한 안드로겐 비의존성 이종이식편된 동물에서 치료기간 끝에서 각 약제 단독에 비해 HERCEPTEST®과 파클리탁셀의 조합에서 성장저해가 증가하였다(도 11e 내지 11h): CWRSA6 그룹(평균종양부피, 각 그룹에서 n=5, 파클리탁셀 1,496mm³, HERCEPTEST® 2,941mm³, 파클리탁셀 및 HERCEPTEST® 687mm³; p<0.001 파클리탁셀 및 HERCEPTEST®에 대비한 파클리탁셀) 및 CWR22R 그룹(평균종양부피, 각 그룹에서 n=5, 파클리탁셀 1,273mm³, HERCEPTEST® 3,811mm³, 파클리탁셀 및 HERCEPTEST® 592mm³; p=0.095 파클리탁셀 및 HERCEPTEST®에 대비한 파클리탁셀).

안드로겐 의존성 이종이식편된 치료동물에서 PSA 인덱스에 대한 HERCEPTEST®의 효과. 도 12a 및 12b에 나타낸 바와 같이, 대조구에 비해 HERCEPTEST®-처리된 안드로겐 의존성 그룹에서 전립선암 특이적 항원(PSA) 인덱스가 상당히 증가하였다(CWR22, 1864% 대 -4%, p<0.0001, 도 12a; LNCaP, 232% 대 -68%, p<0.0001, 도 12b). 처리전 값과 비교했을 때, HERCEPTEST®와 파클리탁셀로 조합치료한 후 PSA 인덱스도 증가하였다.

결론

이들 전립선암 모델계에서, HERCEPTEST® 단독으로는 안드로겐 의존성 종양에서만 임상활성을 나타내고, 파클리탁셀과 조합하여, 안드로겐의존성 및 안드로겐 비의존성 종양 모두에서 적어도 추가적인 효과를 나타낸다. HERCEPTEST®-처리된 그룹에서 PSA 인덱스가 현저하게 증가한 반면, 대조구그룹에서는 일정하게 유지되었기 때문에, HERCEPTEST®에 대한 반응은 PSA 수준과 연관되지 않았다.

(실시예 6)

안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 인간 전립선암의 성장에 대한 모노클로날 항체 2C4의 효과

인간의 전립선암에 대한, ErbB2 수용체의 리간드활성화를 차단하는 항체의 효과를 평가하였다. 특히, 상기 실시예 5에서 설명한 바와 같이, HERCEPTEST[®], 모노클로날 항체 2C4, 파클리탁셀 및 2C4/파클리탁셀 치료에 대한 이중이식편 종양의 반응을 안드로겐 의존성 종양 CWR22 및 안드로겐 비의존성 종양 CWR22R 및 CWRSA6에 대하여 확인하였다. 항체와 파클리탁셀을 실시예 5에서 설명한 바와 같이 투여하였다.

치료에 대한 안드로겐 의존성 종양 CWR22의 반응을 도 13 및 14에 나타낸다. 결과는 평균종양부피 $\pm$ SE로 나타낸다. 도 13에 도시된 동물의 종양부피는 HERCEPTEST[®]이 모노클로날 항체 2C4에서처럼, 이러한 안드로겐 의존성 모델에서 임상활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 모노클로날 항체 2C4 및 TAXOL[®]의 조합은 2C4 또는 TAXOL[®] 단독에 비해 성장저해가 증가한 것으로 나타난다(도 14; p=0.003).

HERCEPTEST[®], 모노클로날 항체 2C4, 파클리탁셀 또는 2C4/파클리탁셀처리를 사용한 치료에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWR22R 및 CWRSA6의 반응을 도 15 내지 18에 나타낸다. 결과는 평균종양부피 $\pm$ SE로 나타낸다. 도 15에 도시된 동물의 종양부피는 HERCEPTEST[®]가 이들 안드로겐 비의존성 모델에서 임상활성을 거의 또는 전혀 나타내지 않는 반면, 모노클로날 항체 2C4는 이들 모델에서 임상활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 모노클로날 항체 2C4와 TAXOL[®]의 조합은 모노클로날 항체 2C4 또는 TAXOL[®] 단독에 비해 성장저해가 증가한 것을 보여준다(도 16 및 18; p=0.002).

인용에 의해 본 명세서에 통합된 WO98/37200에 기재된 바와 같이 rhuMAB 2C4의 Fab' 단편을 대장균에서 발현시켜 20kD 분지된 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 접합시켰다. 마우스 2C4항체(20mg/kg), rhuMAB(20mg/kg), 및 PEG화된 Fab 단편(PEG-Fab; 20 또는 40mg/kg)의 안드로겐 비의존성 전립선암의 생체내 치료능을 상기 CWR22R 이중이식편을 이용하여 평가하였다. 모두 복강내 주입하였다(N=5). 이들 연구의 결과를 도 23에 나타낸다. 이들 데이터는 CWR22R 모델에서 2C4를 사용하여 나타난 종양저해는 완전한 이가 항체를 필요로 하지 않는다는 것을 나타낸다. 이들 Fab 단편은 Fc를 함유하지 않기 때문에, ADCC와 같은 면역학적 메커니즘이 유도될 수 있을 것이다. 이들 결과는 2C4 Fab의 시험관 내 시스템 및 키메라형을 이용하는 도 6에 나타난 결과와 일치한다. 2C4가 일가 단편으로서 종양성장을 저해한다는 관찰은 또한 이 저해가 ErbB2가 다른 ErbB계 구성원과 헤테로다имер를 형성하는 능력을 차단한 결과라는 생각에 신뢰성을 부여하고 따라서 하류의 신호전달개시를 저해한다.

투여량 반응연구는 CWR22R 및 MSKPC6에서 rhuMAB 4D5{Agus et al. Cancer Research 59:4761-4764(1999)} 안드로겐 비의존성 전립선암 이중이식편을 사용하여 행하였다. 동물에 대조구; 6mg/kg 로딩투여 후 매주 2회 3mg/kg ; 20mg/kg 로딩투여 후 매주 2회 10mg/kg; 또는 60mg/kg 로딩투여 후 매주 2회 30mg/kg로 복강내 투여하였다. 이들 연구의 결과를 도 24와 25에 나타낸다. 이들 데이터는 2C4가 투여량 의존성 방식으로 안드로겐-비의존성 종양 이중이식편의 성장을 억제한다는 것을 나타낸다. 또한, 이 결과는 이러한 종양성장의 저해가 실험적 인공물이 아니라 2C4 처리때문이라는 것을 확인해준다.

실시예 5 및 6에서의 연구로부터 얻은 대표적 결과에 대한 요약은 도 21에 나타낸다.

(실시예 7)

안드로겐 의존성 및 안드로겐 비의존성 인간 전립선암에서의 TGF- α 및 HB-EGF 수준

CWR22 세포(안드로겐 의존성) 및 CWR22R 세포(안드로겐 비의존성)에서 TGF- α 및 HB-EGF mRNA 수준을 본 실시예에서 평가하였다.

재료 및 방법

mRNA 제조. 퀴아젠(Qiagen) 프로토콜(Qiagen Maxi Kit #75163)에 따라 냉동된 종양조직을 처리하였다. 이를 요약하면, 15초 펄스를 사용한 후 30초 동안 중지하는 PT-DA 3012/2 TS 생성기가 장착된 브링크만 폴리트론(Brinkman Polytron)(Pt-3000) 호모지나이저를 사용하여 조직을 균질화하였다. 이 과정을 3회 반복하고 추출물을 퀴아젠 칼럼에 로딩하고 제조자의 설명서에 따라 세척하였다. 칼럼을 1ml의 RNase-무함유 물로 용출시키고 260nm에서의 흡수도에 의해 RNA 함량을 측정하였다. TGF- α 및 HB-EGF가 세포주 MDA-MB-231에서 발현되기 때문에, 이들 세포의 총 RNA를 TGF- α 및 HB-EGF 정량의 표준으로 사용하였다.

실시간 정량 PCR. TGF- α 및 HB-EGF mRNA를 상기 설명한 바와 같은 택맨(TaqMan) 기술 또는 실시간 정량 PCR을 이용하여 정량하였다{Gibson et al. Genome Research 6:986-994(1996); and Heid et al. Genomic Research 6:986-994(1996)}. 이 분석에 사용된 프라이머/탐침 세트의 서열을 다음에 나타낸다:

TGF- α

F 5'-GGACAGCACTGCCAGAGA-3' (SEQ ID NO:14)

R 5'-CAGGTGATTACAGGCCAAGTAG-3' (SEQ ID NO:15)

P 5'FAM-CCTGGGTGTGCCACAGACCTTCA-TAMRA-p-3' (SEQ ID NO:16)

HB-EGF:

F 5'-TGAAGTTACCTCCAGGTTGGT-3' (SEQ ID NO:17)

R 5'-AGACACATTCTGTCCATTTTCAA-3' (SEQ ID NO:18)

P 5'FAM-CAAGCTGCAAAGTGCCTTGCTCAT-TAMRA-p-3' (SEQ ID NO:19)

F와 R은 각각 전방 및 역 프라이머이고, P는 형광표지된 탐침이다.

β -액틴이 하우스키핑 유전자로 사용되었다. β -액틴에 대한 프라이머/탐침 세트는 다음과 같다:

β -액틴

F 5'-ATGTATCACAGCCTGTACCTG-3' (SEQ ID NO:20)

R 5'-TTCTTGGTCTCTTCCTCCTTG-3' (SEQ ID NO:21)

P 5'FAM-AGGTCTAAGACCAAGGAAGCACGCAA-TAMRA-p-3' (SEQ ID NO:22)

표준 96-조 플레이트 형태에서 택맨 분석을 행하였다. TGF- α 및 HB-EGF 분석을 위해 0.6 - 150ng의 mRNA 및 β -액틴에 대해 9.4 - 150 ng을 사용하여 표준곡선을 구성하였다. 각 희석액은 이중으로 만들었다. 종양시료에 대해, 분석된 모든 유전자는 100ng을 사용하였다.

결과

도 19 및 20에 나타난 바와 같이, 안드로겐 비의존성 전립선 종양세포주인 CWR22R이, 안드로겐 의존성 세포주인 CWR22에 비해, EGFR 리간드 TGF- α 및 HB-EGF를 상당히 더 높은 수준으로 발현하였다. 보다 구체적으로는, TGF- α 는 CWR22 종양에 비해 CWR22R 종양에서 8-9배 높은 수준으로 발현하였다. 유사한 방식으로, HB-EGF는 CWR22에 비해 CWR22R에서 ~19배 높게 발현되었다.

(실시예 8)

안드로겐-의존성 이중이식편을 가진 동물에서 PSA에 대한 2C4 또는 HERCEPTEST[®]의 효과

도 22에 나타난 바와 같이, 치료 마지막 쫓인 21일째 안드로겐-의존성 동물에서 PSA 인덱스(ng PSA/ml 혈청/mm³ 종양으로 정의됨)를 측정하였다. HERCEPTEST[®]-처리된, 안드로겐-의존성 동물에서 PSA 인덱스가 상당히 증가한 반면, 대조구동물은 PSA 인덱스가 감소하였다(LNCaP : 대조구= 처리전 값에 대해 0.6, HERCEPTEST[®] 그룹 = 21일째 처리전 값에 대해 2.35; CWR22: 대조구= 처리전 값에 대해 1.0, HERCEPTEST[®] 그룹 = 21일째 처리전 값에 대해 18). LNCaP 미처리 그룹에서 상대 PSA 인덱스가 감소하여, 2차적으로 종양 크기가 증가하면서 괴사가 증가했다. 이와 반대로, 대조구

에 비해 처리된 종양의 PSA 인덱스에 대해 2C4는 그다지 효과가 없었다. 어떤 한 설에 제한되지 않고, 이 현상에 대해 가능한 설명은 전립선암 세포에서의 ErbB2 활성화의 정도와 관련될 수 있다. ErbB2 활성화는 안드로젠 수용체 신호전달 경로와의 혼선에 의해 안드로젠-비의존성 성장을 일으킬 수 있다{Craft *et al. Nature Med.* 5:280-285(1999)}. 우리의 모델 시스템에서, ErbB2에 결합하는 HERCEPTEST®는 안드로젠-비의존성 방식으로 PSA의 세포성 분비를 증가시켰다{Agus *et al. Cancer Res.* 59:4761-4764(1999)}. 이 결과는 또한 ErbB2 및 안드로젠 수용체 신호도입 경로간의 혼선의 개념을 지지한다.

(실시예 9)

안드로젠 의존성 및 비의존성 이종이식편에 대한 7C2 항-ErbB2 항체의 효과

ErbB2 과발현세포의 세포자멸사를 유도하는 모노클로날 항체 7C2(ATCC HB-12215)의 효과를 안드로젠 의존성 CWR22 이종이식편의 모노클로날 항체 2C4의 효과와 비교하였다. 양 항체는 1주일에 2회 20mg/kg으로 투여하였다. 도 26에 나타낸 바와 같이, 2C4 및 HERCEPTEST®와 유사하게, 7C2도 안드로젠 의존성 전립선암을 치료하는데 효과적이다. 안드로젠 비의존성 전립선암에 대한 7C2의 효과는 CWR22R 이종이식편을 사용하여 평가하였다. 도 27은 7C2 단독으로는 이 모델에서 효과적이지 않지만 TAXOL®과 조합할 때 효과적이라는 것을 보여준다.

(실시예 10)

재발성 또는 난치성 전이 전립선암의 치료

rhuMAb 2C4는 ErbB2에 대한 전장의 인간화된 모노클로날 항체(CHO세포에서 생산됨)이다. rhuMAb 2C4는 ErbB2이 다른 ErbB2계 구성원과 결합하는 것을 차단하여 ErbB2 경로를 통한 세포내 신호전달을 저해한다. HERCEPTEST®에 비해, rhuMAb 2C4는 ErbB2 과발현 종양의 성장을 저해할 뿐만 아니라, ErbB2 리간드-의존성 신호전달을 요구하는 종양의 성장을 차단한다.

rhuMAb 2C4는 호르몬-난치성(안드로젠 비의존성) 전립선암 환자의 치료에 대한 단일약제로 표시된다. 단일약제로 사용되는 경우, 효능에 대한 1차 종료점에는 이용할 수 있는 최대의 간호(미토산트론/프레드니손)와 비교한 총 생존율, 및 안전성이 포함된다. 2차 효능 종료점에는 질병진행까지의 시간, 반응속도, 생활의 질, 고통 및/또는 반응의 지속시간이 포함된다. rhuMAb 2C4는 질병이 진행할 때까지 매주 또는 매 3주마다 각각 2 또는 4mg/kg으로 정맥투여된다. 항체는 다투여량 액체제제(20mg/kg 농도 또는 더 고농도로 채워진 20ml)로 공급된다.

rhuMAb 2C4는 호르몬-난치성 (안드로젠 비의존성) 전립선암 환자의 치료를 위한 화학요법과의 조합으로도 표시된다. 효능의 1차 종료점은 화학요법과 비교한 총 생존율, 및 안전성이 포함된다. 2차 효능 종료점에는 질병진행까지의 시간, 반응속도, 생활의 질, 고통 및/또는 반응의 지속시간이 포함된다. rhuMAb 2C4는 질병이 진행할 때까지 매주 또는 매 3주마다 각각 2 또는 4mg/kg으로 정맥투여된다. 항체는 다투여량 액체제제(20mg/kg 농도 또는 더 고농도로 채워진 20ml)로 공급된다.

전립선암을 치료하기 위하여 항-ErbB2 항체(ErbB2 수용체의 리간드 활성화를 차단함)와 조합될 수 있는 약제의 예로는 파네실 트랜스퍼라제 저해제; 항-혈관형성제(예를 들면, 항-VEGF 항체); EGFR-표적 약제(예를 들면, C225 또는 ZD1839); 다른 항-ErbB2 항체(HERCEPTEST®와 같은 성장저해성 항-ErbB2 항체, 또는 7C2 또는 7F3와 같은 세포자멸사를 유도하는 항-ErbB2 항체, 이의 인간화된 및/또는 친화성 성숙된 변형체를 포함); 사이토카인(예를 들면, IL-2, IL12, G-CSF 또는 GM-CSF); 항-안드로젠(플루타미드 또는 시프로테론 아세테이트 등); 류프롤리드; 수라민; 빈블라스틴, 에스트라무스틴, 미토산트론, 리아로졸(레틴산 대사-차단제), 사이클로포스파미드, 독소루비신, 탁산(예를 들면, 파클리탁셀 또는 도세탁셀) 또는 메소트레세이트와 같은 안트라사이클린 항생제, 또는 빈블라스틴/에스트라무스틴 또는 사이클로포스파미드/독소루비신/메소트레세이트와 같은 이들의 조합; 프레드니손; 하이드로코르티손; 또는 이들의 조합이 포함된다. 이들 다양한 약제에 대한 표준 투여량은 예를 들면 40mg/m²/wk 도세탁셀(TAXOTERE®); 6(AUC) 카보플라딘; 및 200mg/m² 파클리탁셀(TAXOL®)을 투여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 절단 돌연변이 분석 및 부위-지향 돌연변이유발에 의해 결정된 ErbB2(도 1에 나타낸 신호 서열을 포함하는 아미노산 서열; SEQ ID NO:13)의 세포외 도메인(ECD) 내의 잔기 22-645의 에피토프 지도화를 나타내는 도면이다

(Nakamura *et al.* *J. of Virology* 67(10):6179-6191(1993); 및 Renz *et al.* *J. Cell Biol.* 125(6):1395-1406(1994)). 중합 효소 연쇄반응법을 사용하여 cDNA로부터 다양한 ErbB2-ECD 절단 또는 점변이는 제조하였다. ErbB2 돌연변이는 포유류의 발현 플라스미드에서 gD 융합 단백질로서 발현되었다. 이 발현 플라스미드는 삽입된 cDNA의 하류에 위치한 폴리아데닐화 신호 및 SV40 종결과 함께 사이토메갈로바이러스 프로모터/증진제를 사용한다. 플라스미드 DNA는 293 세포들로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 후 다음 날, 밤새 메티오닌 및 시스테인-유리, 1% 투석된 우태아혈청 및 25 μ Ci의 ³⁵S 메티오닌 및 ³⁵S 시스테인을 각각 포함하는 낮은 포도당 DMEM에서 세포들을 대사 표지하였다. 상등액을 수집하고, 항-ErbB2 모노클로날 항체 또는 대조구 항체를 상등액에 첨가하고, 4℃에서 2-4시간 동안 배양하였다. 복합체를 침전시키고, 10-20% 트리신(Tricine) SDS 구배 겔에 적용하고, 100V에서 전기영동하였다. 이 겔을 막 상에 전기블롯하고, 방사선 사진으로 분석하였다. 도 1b에서 보는 바와 같이, 항-ErbB2 항체 7C2, 7F3, 2C4, 7D3, 3E8, 4D5, 2H11 및 3H4는 다양한 ErbB2 ECD 에피토프를 결합시킨다.

도 2a 및 2b는 MCF7 세포의 rHRG β 1 활성화에 대한 항-ErbB2 모노클로날 항체 2C4 및 7F3의 영향을 나타낸다. 도 2a는 티로신 인산화의 HRG 자극의 2C4 또는 7F3 억제에 대한 투여량-반응 곡선을 나타낸다. 도 2b는 2C4 또는 7F3에 의한 MCF-7 세포에 대한 ¹²⁵I-표지된 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 결합의 억제에 대한 투여량-반응 곡선을 나타낸다.

도 3은 항-ErbB2 모노클로날 항체 2C4 또는 7F3에 의한 인간 종양 세포주의 패널에 대한 특이적 ¹²⁵I-표지된 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 결합의 억제를 나타낸다. 모노클로날 항체-대조구는 rHRG 결합을 차단하지 않는 아이소타이프-대응한 쥐의 모노클로날 항체이다. 비특이적 ¹²⁵I-표지된 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 결합은 100nM rHRG β 1의 존재하에서 수행된 수평 배양으로부터 결정되었다. 비특이적 ¹²⁵I-표지된 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 결합에 대한 값은 시험한 모든 세포주에 대해 전체의 1% 미만이었다.

도 4a 및 4b는 MDA-MB-175(도 4a) 및 SK-BR-3(도 4b)의 증식에 대한 모노클로날 항체 2C4 및 4D5의 영향을 보여준다. MDA-MB-175 및 SK-BR-3 세포는 96 조 플레이트에 시드되어 2시간 동안 부착되었다. 1% 혈청을 함유하는 매질에서 실험하였다. 항-ErbB2 항체 또는 매질을 단독으로 첨가하고, 세포를 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 이어서, rHRG β 1(1nM) 또는 매질을 단독으로 첨가하고, 세포를 4일 동안 배양하였다. 단층을 세척하고, 0.5% 결정 바이올렛으로 착색/고정시켰다. 세포 증식을 측정하기 위하여, 540nm에서 흡수도를 측정하였다.

도 5a 및 5b는 낮은/보통 수준의 ErbB2(도 5a)를 발현하는 MCF7세포 및 고수준의 ErbB2(도 5b)를 발현하는 SK-BR-3 세포에서, ErbB3과 ErbB2의 결합에 따라 헤레글린(HRG)에 대한 모노클로날 항체 2C4, HERCEPTIN® 항체 또는 항-EGFR 항체의 영향을 나타내고; 이것은 실시예 2를 참조한다.

도 6a 및 6b는 온전한 쥐의 모노클로날 항체 2C4(mu 2C4) 및 키메라 2C4 Fab 단편의 활성을 비교하는 도면이다. 도 6a는 키메라 2C4 Fab 또는 온전한 쥐의 모노클로날 항체 2C4에 의한 MCF-7 세포로의 ¹²⁵I-HRG 결합의 억제를 나타낸다. MCF7 세포는 24-조 플레이트(1x10⁵ 세포/조)에 시드하고, 약 85% 융합으로 2일 동안 성장시켰다. 결합 실험은 문헌 {Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457-1465(1996)}에 기재된 대로 수행하였다. 도 6b는 문헌 {Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457-1465(1996)}에 기재된 대로 MCF-7 세포 중에서 p180 티로신 인산화의 rHRG β 1 활성화의 억제를 나타낸다.

도 7a 및 7b는 쥐의 모노클로날 항체 2C4의 가변 경쇄(V_L)(도 7a) 및 가변중쇄(V_H)(도 7b) 도메인(각각 SEQ ID Nos. 1 및 2); 인간화된 Fab 버전 574의 V_L 및 V_H 도메인(각각 SEQ ID Nos. 3 및 4); 및 인간 V_L 및 V_H 교감 외곽구조(hum κ 1, 경쇄 카파 하위그룹 I; humIII, 중쇄 하위그룹 III)(각각 SEQ ID Nos. 5 및 6)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 별표는 인간화된 Fab 574형과 쥐의 모노클로날 항체 2C4 사이의 차이 또는 인간화된 Fab 버전 574와 인간 외곽구조 사이의 차이를 분간한다. 상보성 결정 영역(CDRs)은 괄호 안에 있다.

도 8a 내지 8c는 실시예 3에서 ELISA로 측정한 ErbB2 세포의 도메인(ECD)에 대한 키메라 Fab 2C4(Fab.v1) 및 몇몇 인간화된 2C4 변형체의 결합을 나타낸다.

도 9는 화이트 CDR 백본(backbone) 표지된(L1, L2, L3, H1, H2, H3) 모노클로날 항체 2C4의 V_L 및 V_H 도메인의 리본 도면이다. 인간화 과정 동안(실시예 3, 표 2 참조) 돌연변이유발에 의해 평가된 V_H 측쇄도 나타내었다.

도 10은 마이토젠-활성화된 단백질 키나아제(MAPK)의 EGF, TGF- α , 또는 HRG-매개 활성화에 대한 모노클로날 항체 2C4 또는 HERCEPTIN[®]의 영향을 나타낸다.

도 11a 내지 h는 HERCEPTIN[®](H, ■), 대조구(C, ○), TAXOL[®](T, ▲) 및 재조합 HERCEPTIN[®]/TAXOL[®](H/T, ◇) 치료에 대한 이종이식편 종양의 반응을 나타낸다. HERCEPTIN[®] 및 대조구에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWR22R 및 CWRSA6(각각 도 11a 및 b) 및 안드로겐 의존성 종양 CWR22 및 LNCaP(각각 도 11c 및 d)의 반응이 나타나 있다. HERCEPTIN[®], TAXOL[®], HERCEPTIN[®]/TAXOL[®] 및 대조구에 대한 종양의 반응은 도 11e(CWR22); 도 11f(LNCaP); 도 11g(CWR22R); 및 도 11h(CWRSA6)에 나타난다. 결과들은 평균 종양 부피 $\pm$ SE로 주어진다.

도 12a 및 12b는 HERCEPTIN[®]으로 치료한 안드로겐 의존성 전립선암 이종이식편을 가진 동물의 상대적 전립선 특이적 항원(PSA) 지수를 나타낸다. 도 12a에서, PSA 지수는 치료하기 전 및 치료 시작 후 9일 및 21일째 되는 날의 LNCaP 이종 이식편 모델에서 측정하였고, 예비치료 수치와 비교하여 나타내었다. 도 12b에서, PSA 지수는 치료하기 전 및 치료 시작 후 9일 및 21일째 되는 날의 CWR22 이종이식편 모델에서 측정하였고, 예비치료 수치와 비교하여 나타내었다. 결과들은 평균 상대 PSA $\pm$ SE로 주어진다.

도 13은 대조구 항체(C, ▲), HERCEPTIN[®](H, ○) 또는 모노클로날 항체 2C4(2, ■)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 의존성 종양 CWR22의 반응을 나타낸다. 2C4 투여는 *로 표시하고; HERCEPTIN[®] 투여는 +로 표시하였다.

도 14는 TAXOL[®] 단독(T, ○), 모노클로날 항체 2C4 단독(2, ■) 또는 모노클로날 항체 2C4와 TAXOL[®]의 조합체(2/T, ▲)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 의존성 종양 CWR22의 반응을 나타낸다. 2C4 투여는 *로 표시하고; TAXOL[®] (6.25mg/kg) 투여는 +로 표시하였다.

도 15는 대조구 항체(C, ▲), HERCEPTIN[®](H, ○) 또는 모노클로날 항체 2C4(2, ■)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWR22R의 반응을 나타낸다. 모노클로날 항체 2C4 투여는 +로 표시하고, HERCEPTIN[®] 투여는 +로 표시하였다.

도 16은 TAXOL[®] 단독(T, ○), 모노클로날 항체 2C4 단독(2, ■) 또는 모노클로날 항체 2C4와 TAXOL[®]의 조합체(2/T, ▲)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWR22R의 반응을 나타낸다. 2C4 투여는 *로 표시하고; TAXOL[®] (6.25mg/kg) 투여는 +로 표시하였다.

도 17은 대조구 항체(C, ▲), HERCEPTIN[®](H, ○) 또는 모노클로날 항체 2C4(2, ■)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWRSA6의 반응을 나타낸다. 모노클로날 항체 2C4 투여는 +로 표시하고, HERCEPTIN[®] 투여는 +로 표시하였다.

도 18은 TAXOL[®] 단독(T, ○), 모노클로날 항체 2C4 단독(2, ■) 또는 모노클로날 항체 2C4와 TAXOL[®]의 조합체(2/T, ▲)를 사용한 치료에 대한 안드로겐 비의존성 종양 CWRSA6의 반응을 나타낸다. 2C4 투여는 *로 표시하고; TAXOL[®] (6.25mg/kg) 투여는 +로 표시하였다.

도 19는 실시간 정량 PCR(Real Time Quantitative PCR)로 측정한 CWR22R 또는 CWR22 세포에 의한 상대적 TGF- α mRNA 발현을 나타낸다.

도 20은 실시간 정량 PCR(Real Time Quantitative PCR)로 측정한 CWR22R 또는 CWR22 세포에 의한 상대적 HB-EGF mRNA 발현을 나타낸다.

도 21은 전립선암 이종이식편의 성장에 미치는 항-ErbB2 모노클로날 항체 치료의 효과를 나타낸다. 종양 성장은 대조구 동물을 치사시킬 때 각 실험의 말미에서 대조구 종양에 대해 표준화한다. 각 수치는 명백한 종양이 형성된 후 23일에 대응하는 CWR22; 51일에 LNCaP; 22일에 CWR22R; 33일에 CWR22SA6을 나타낸다.

도 22는 PSA 지수에 미치는 항-ErbB2 모노클로날 항체 치료 효과를 나타낸다. PSA 지수는 종양 부피로 표준화된 혈청 PSA의 양으로 정의된다.

도 23은 CWR22R 안드로겐 비의존성 전립선 이종이식편에 대한, 재조합 인간화된 모노클로날 항체 (rhuMAb 2C4), 이의 페길레이트된(pegylated) Fab 단편, 및 쥐의 2C4의 활성을 평가한 것이다.

도 24는 CWR22R 안드로겐 비의존성 전립선 이종이식편에 대한 rhuMAb 2C4의 투여량 반응을 나타낸다.

도 25는 MSKPC6 안드로겐 비의존성 전립선 이종이식편에 대한 rhuMAb 2C4의 투여량 반응을 나타낸다.

도 26은 안드로겐 의존성 전립선 이종이식편(CWR22)에서 2C4 및 7C2 투여량 반응을 나타낸다.

도 27은 TAXOL[®] 및 항-ErbB2 항체 2C4 및 7C2로 치료한 CWR22R 이종이식편의 종양 부피를 나타낸다.

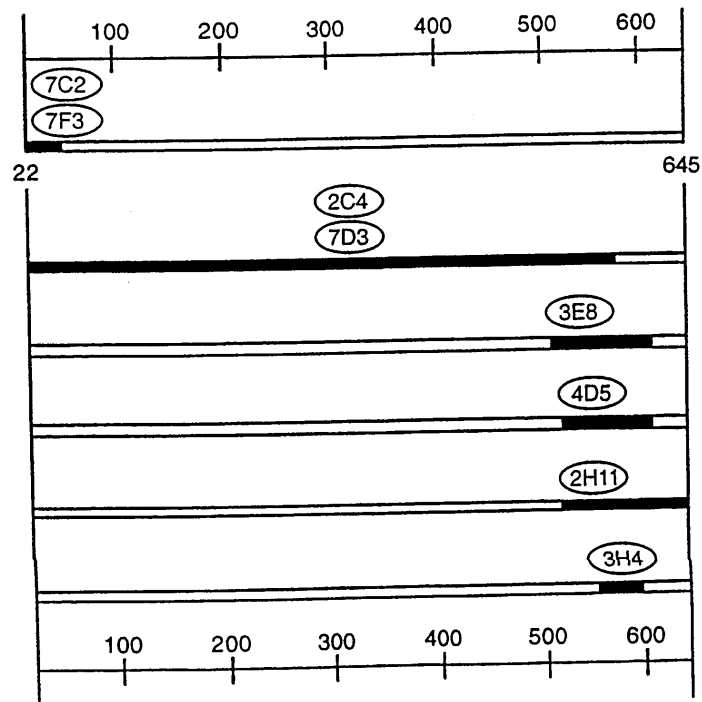
도면

도면1a

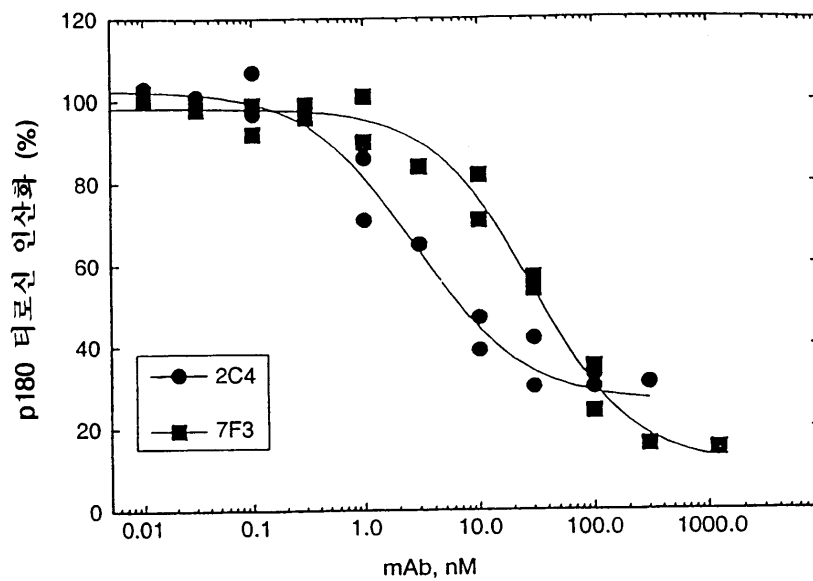
1 METALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKRLPASPE THLDMLRHLX QGQVVGQNL ETTYLPNTAS LSFLODIQEV QGYVLIANQ VRQVPLQRLR
101 IVRGTOLEP NVALAVLDNG DPLNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTIIMK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK
201 GSRMGESSE DQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLFNNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPGARYT FGASCVTACP
301 YNYLSTDVGS CTIVCPILNQ EYTAEDGTQR CEKSKPCAR VCYGLGHEHL REVRAYTSAN IQEFAQCKKI FGLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
401 ETLEETGYL YISMPDSL PLSVFQNLQV IGRILHNGA YSLTLQIGIGI SWLGLSLRE LSGGLALHH NTHLCFVHTV PMQDLFRNPH QALHTANRP
501 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WGPPTQCVN CSQFLRGQEC VEECEVLAQL PREYVNRHC LPCHPEQCPQ NGSVTCFGE ADQCVACAHY KDPFCVARG
601 PSGTKPDLST MPINKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (SEQ ID NO: 13)

도면1b

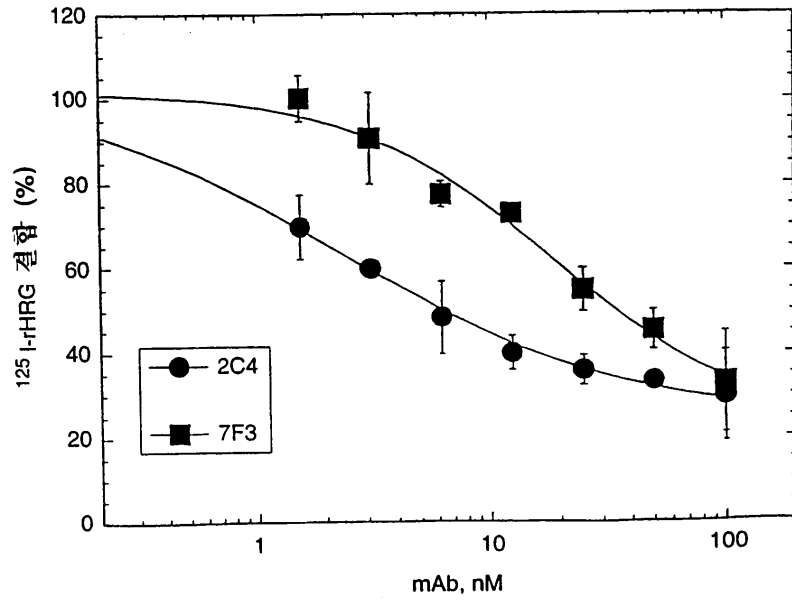
7C2	aa	22-53	(31 잔기)
7F3	aa	22-53	(31 잔기)
2C4	aa	22-584	(562 잔기)
7D3	aa	22-584	(562 잔기)
3E8	aa	512-625	(113 잔기)
4D5	aa	529-625	(96 잔기)
2H11	aa	529-645	(116 잔기)
3H4	aa	541-599	(58 잔기)



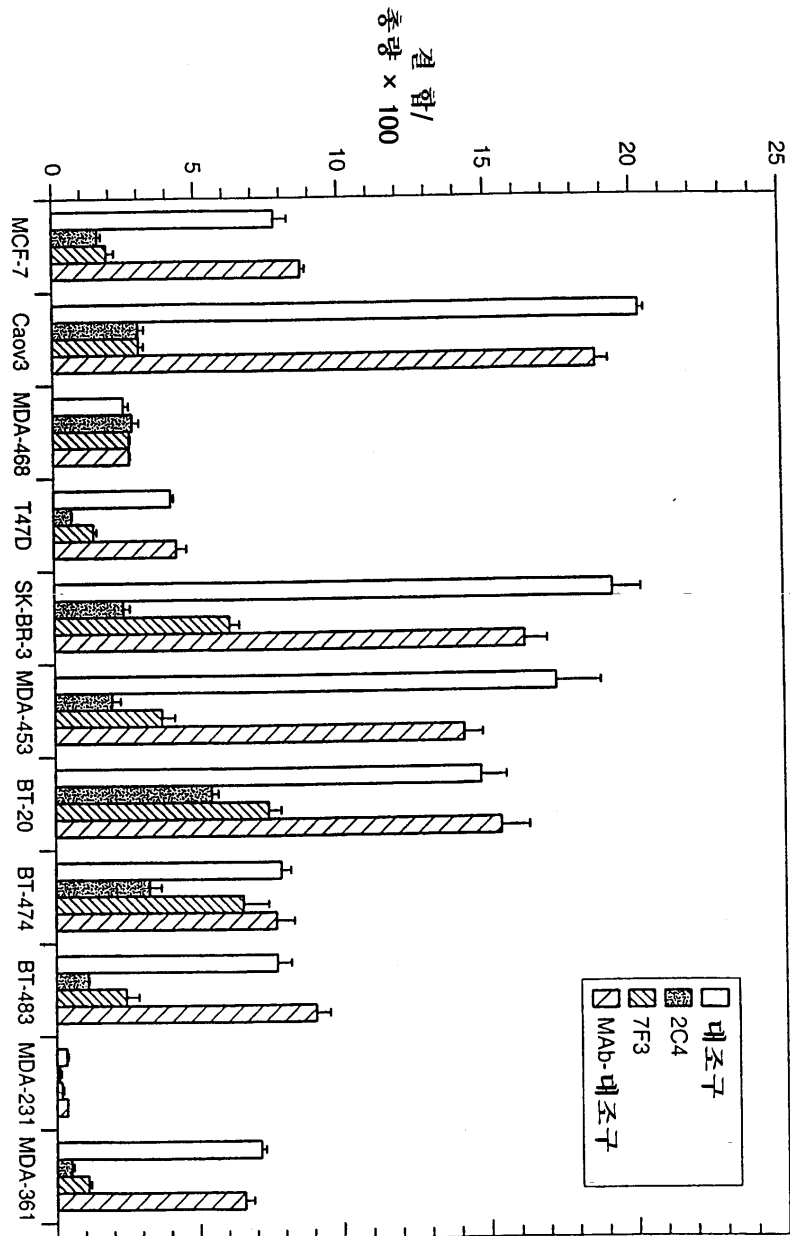
도면2a



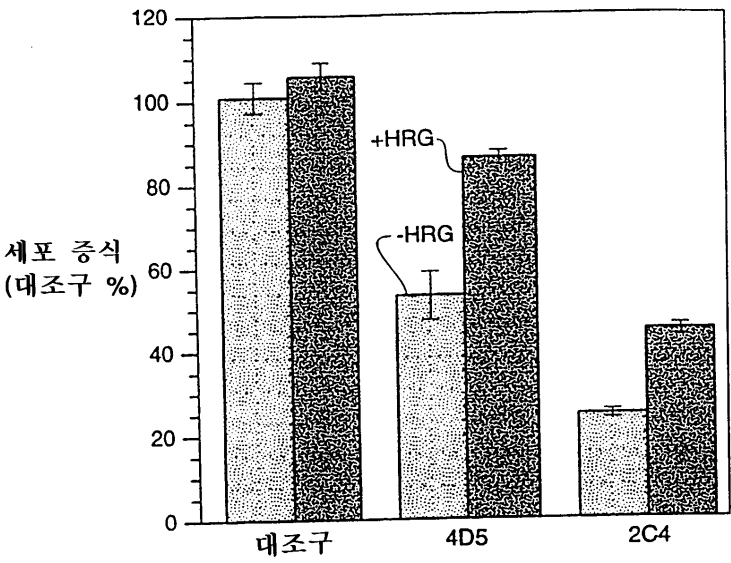
도면2b



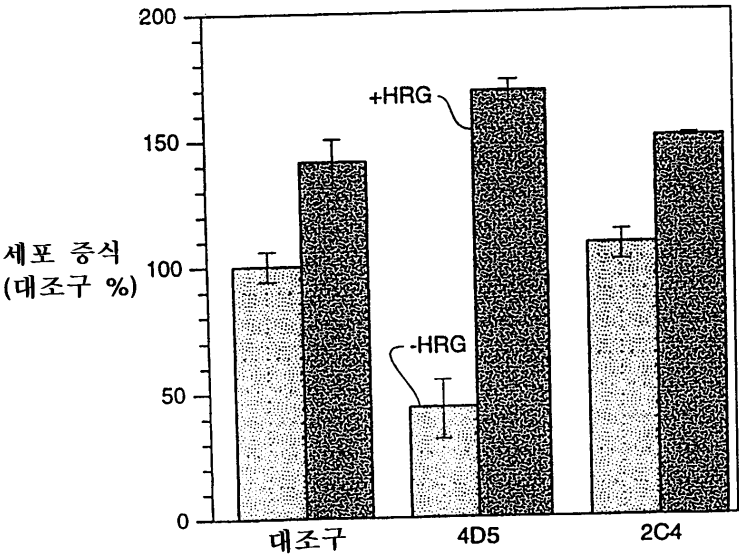
도면3



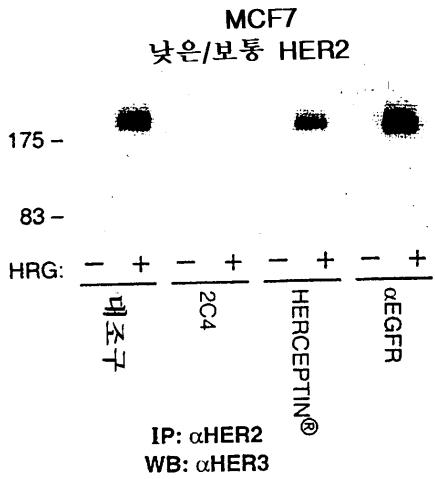
도면4a



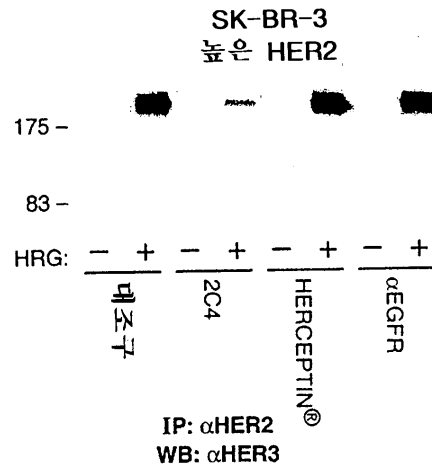
도면4b



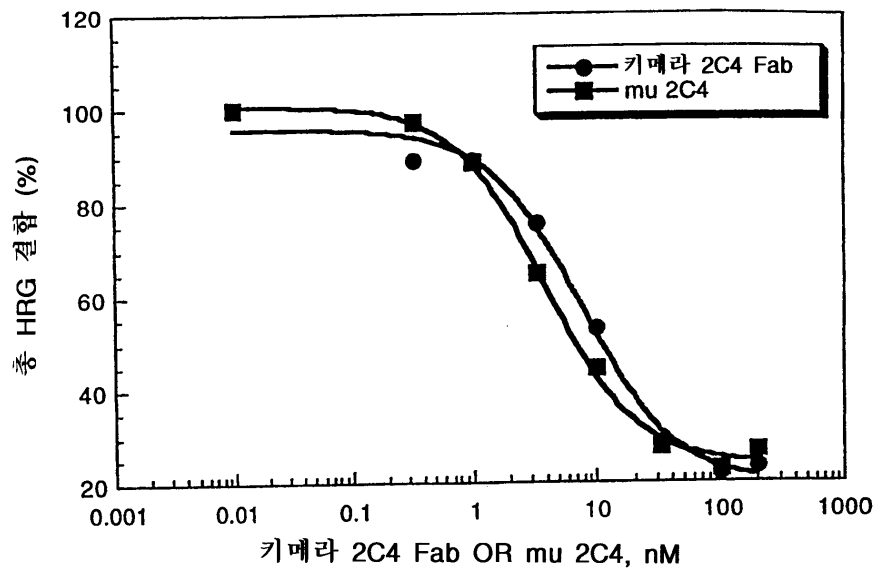
도면5a



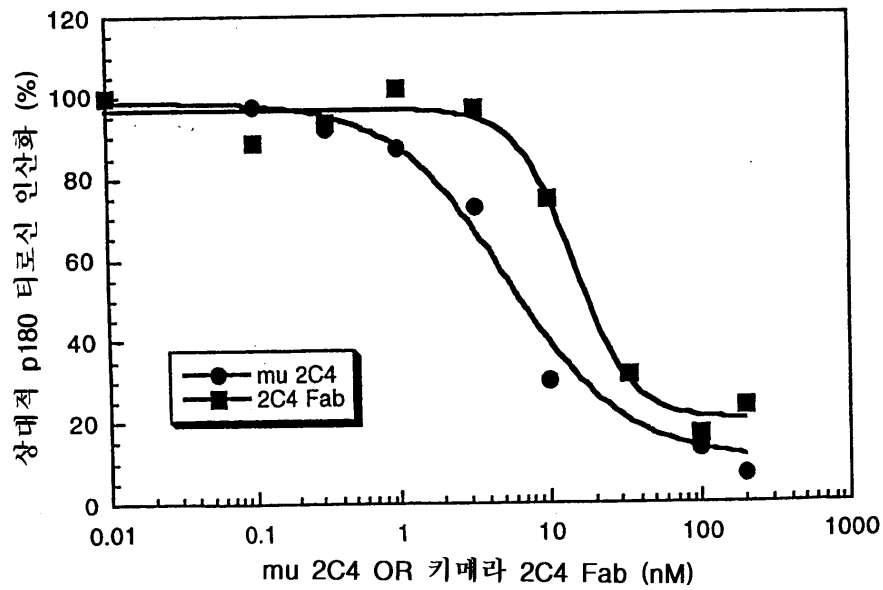
도면5b



도면6a



도면6b



도면7a

가변 경쇄

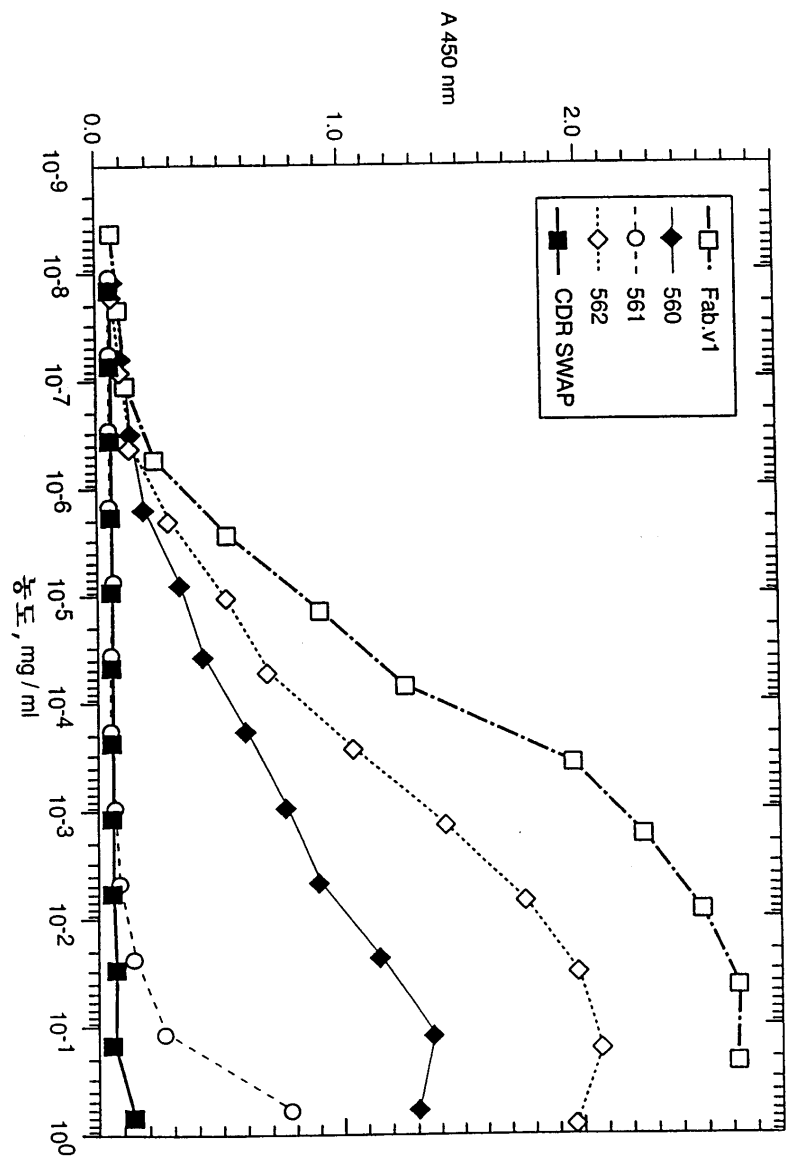
	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	**	*****	*	*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		*	**	***
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	*	*****		
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)		
	*	*	*	*
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)		
	*	***	*	*
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)		

도면7b

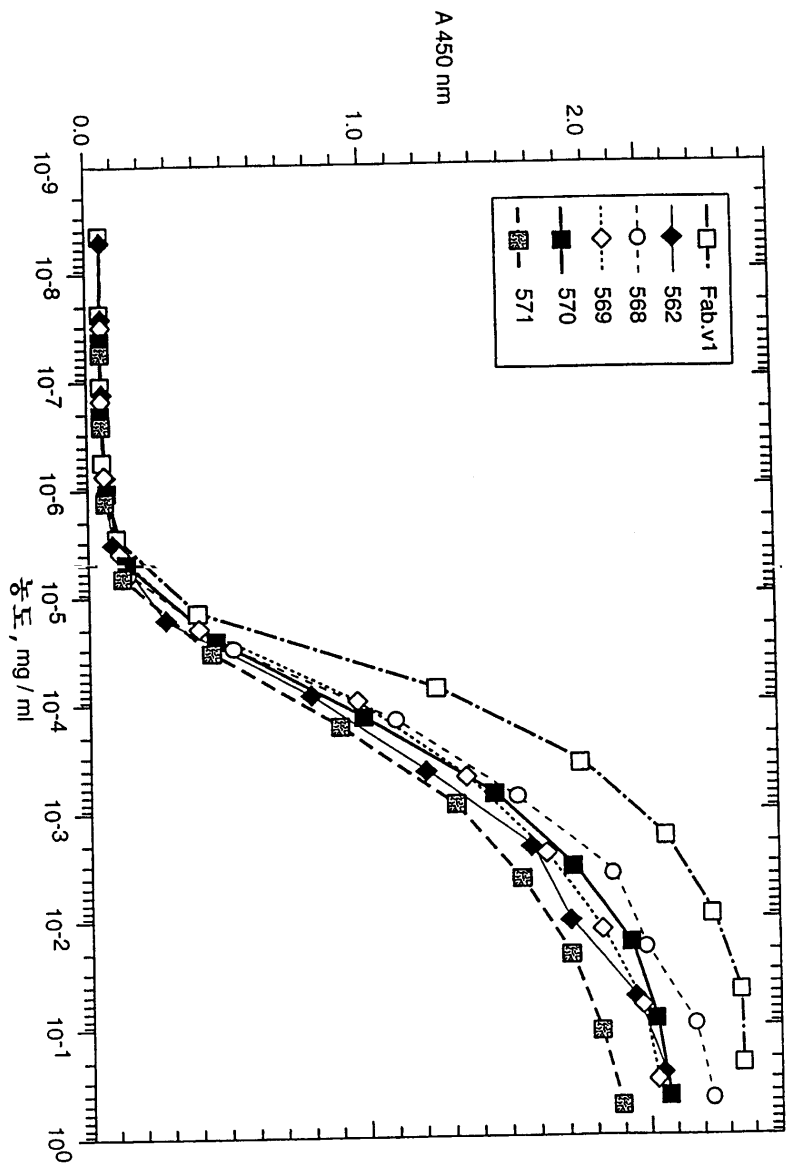
가변 중쇄				
	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISKAS	[GFTFTDYM]	WVKQS	
	** ** *	* ** *		**
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYM]	WVRQA	
			** ** *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM	
	* * **		*** *	*** *
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL	
	*****	*** **	* **	
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:2)
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:4)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:6)

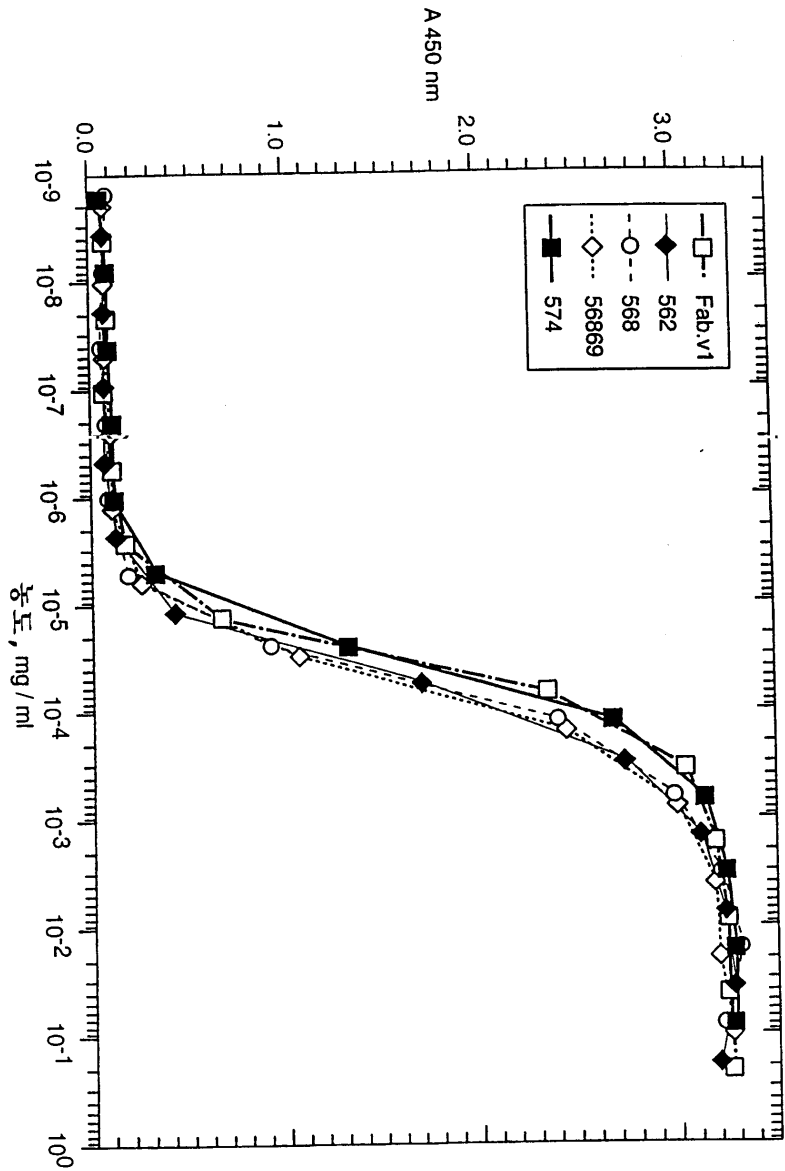
도면8a



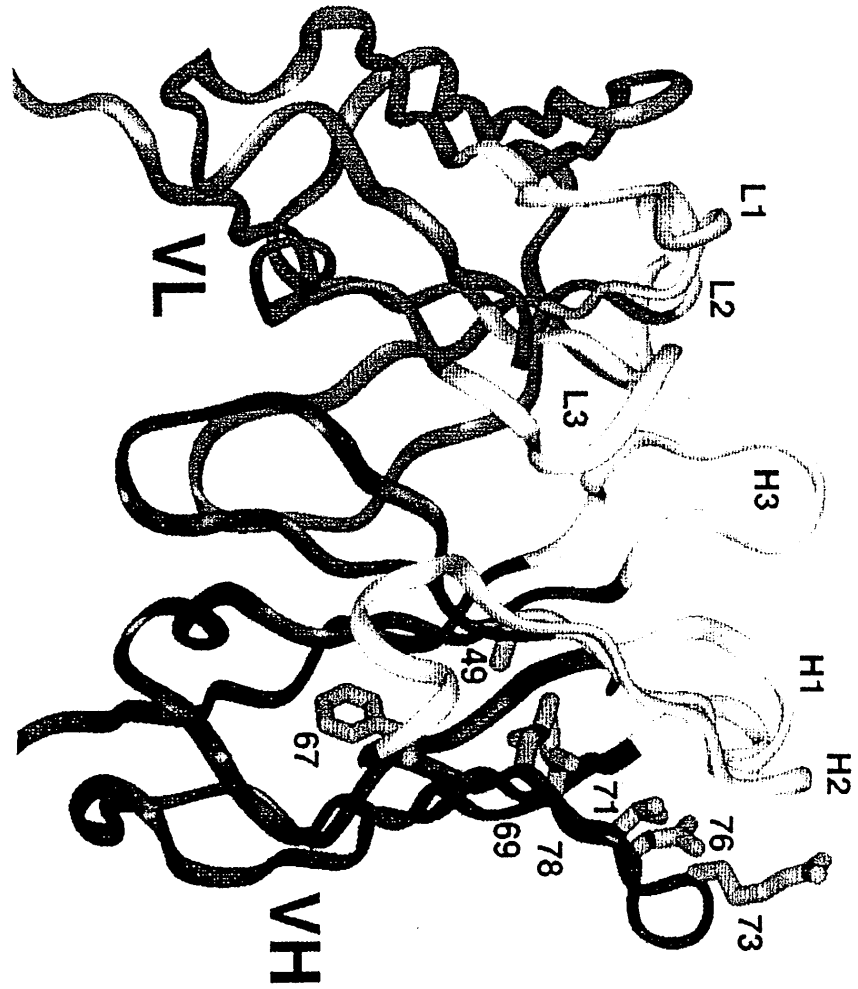
도면8b



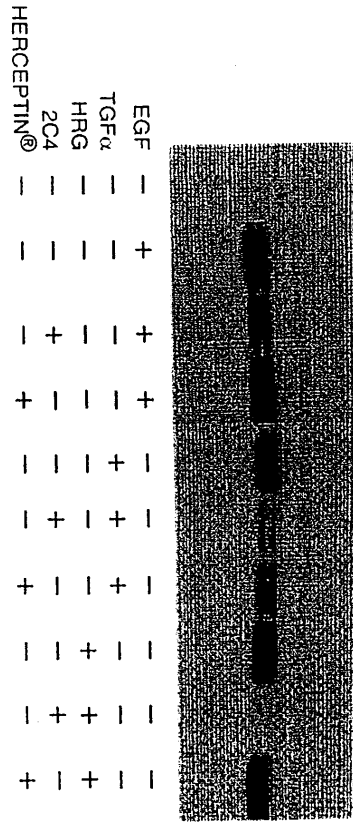
도면8c



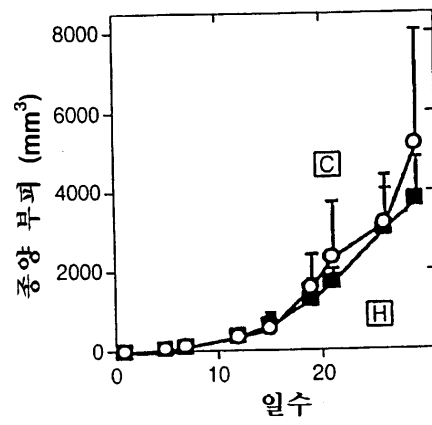
도면9



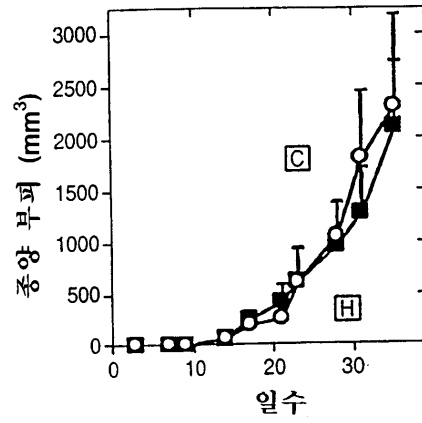
도면10



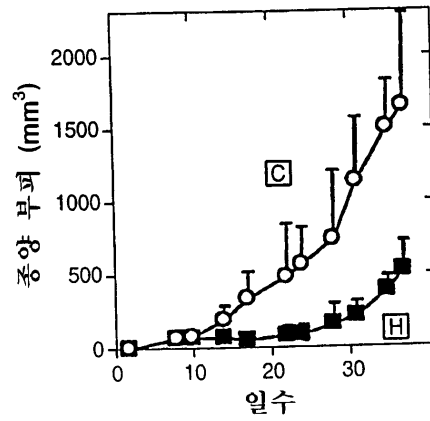
도면11a



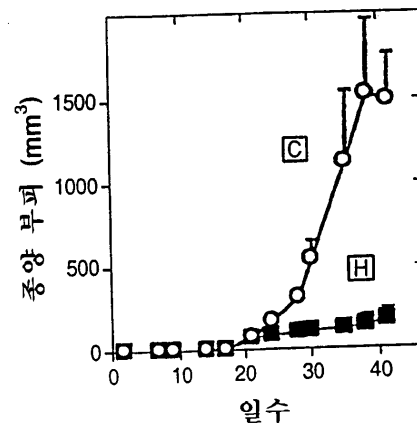
도면11b



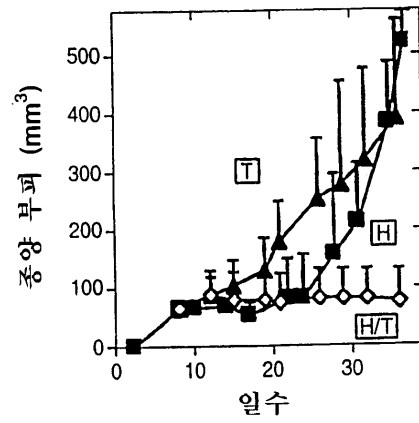
도면11c



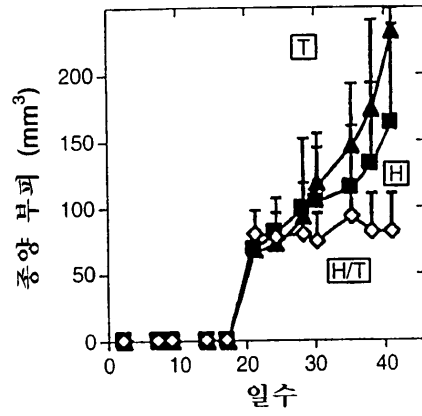
도면11d



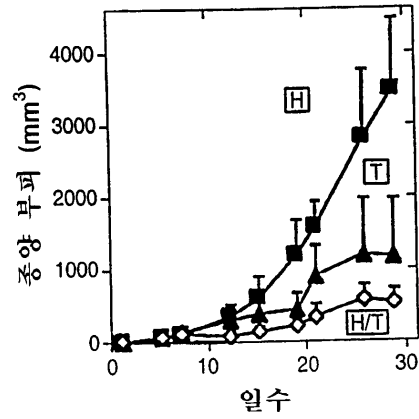
도면11e



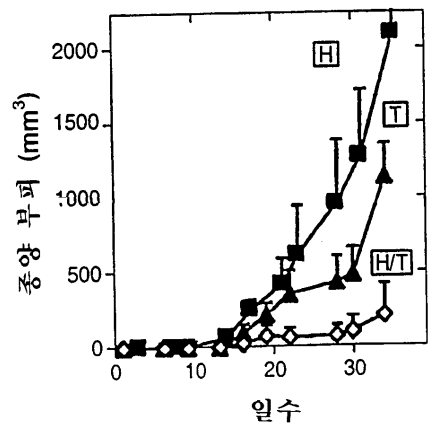
도면11f



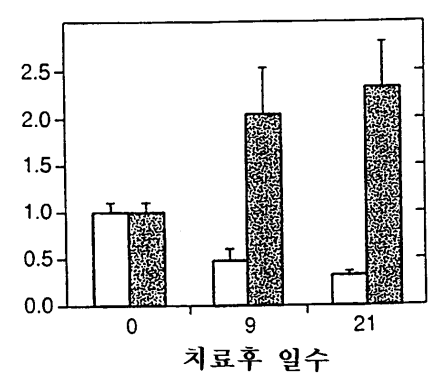
도면11g



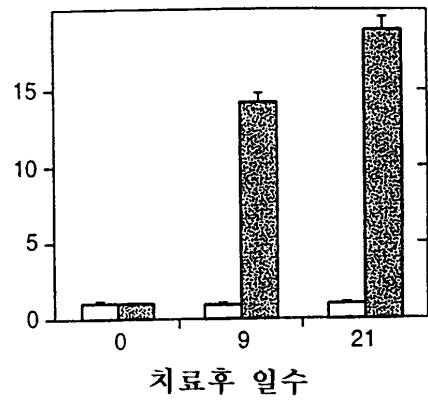
도면11h



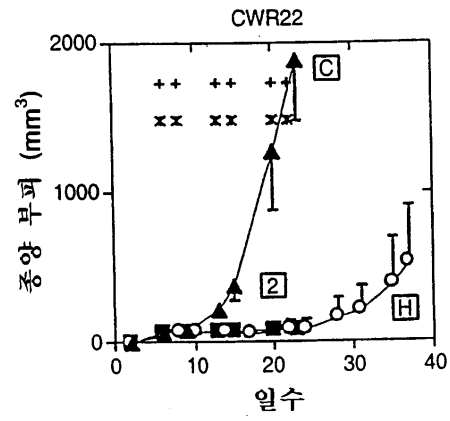
도면12a



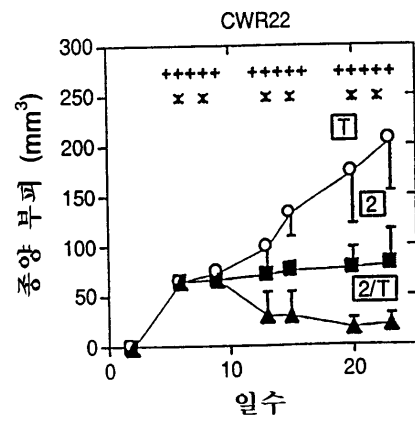
도면12b



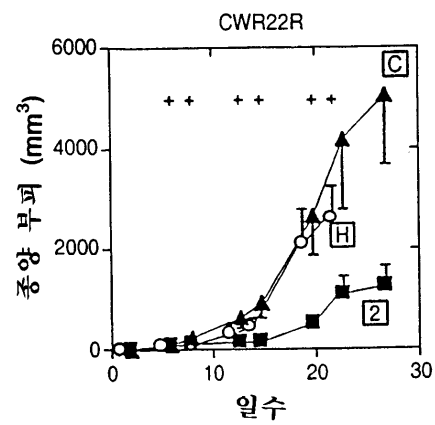
도면13



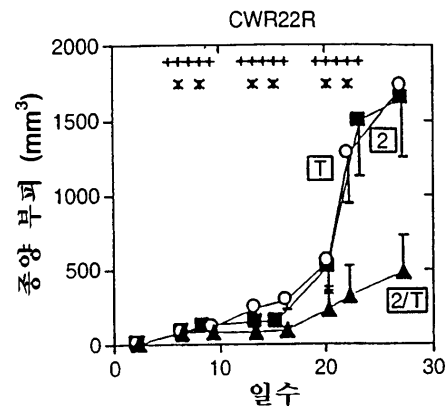
도면14



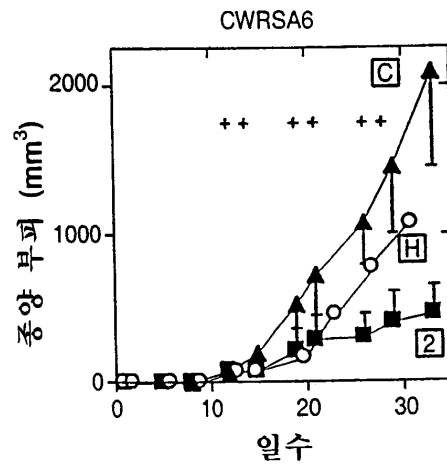
도면15



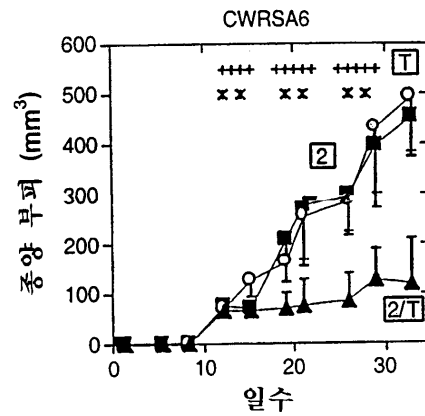
도면16



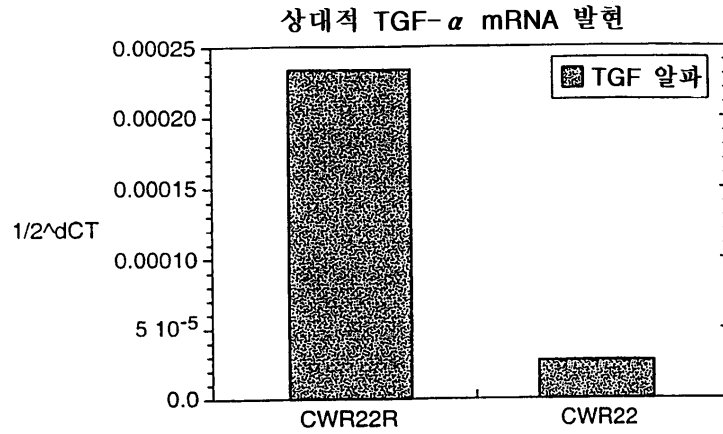
도면17



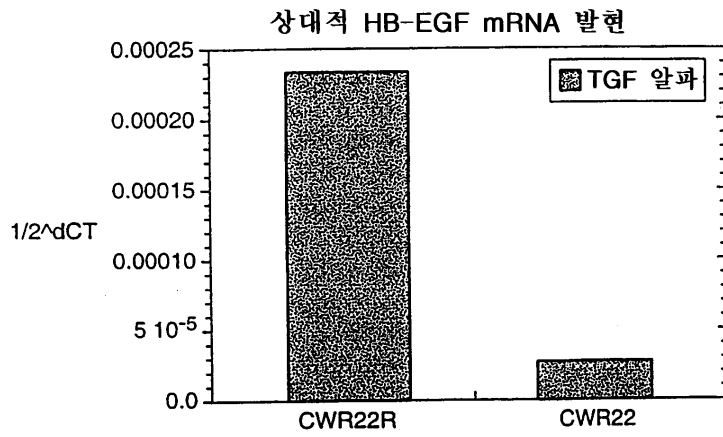
도면18



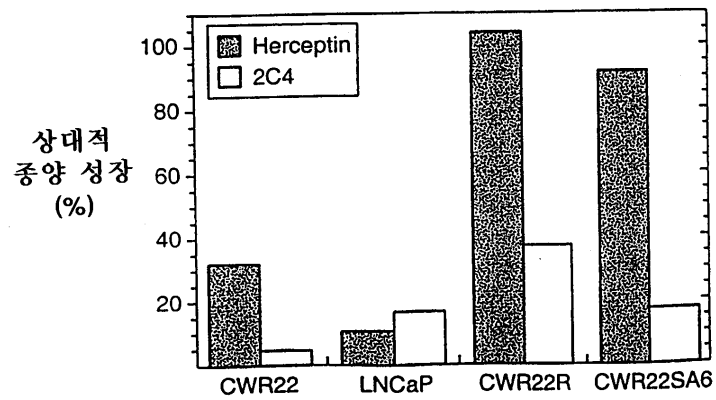
도면19



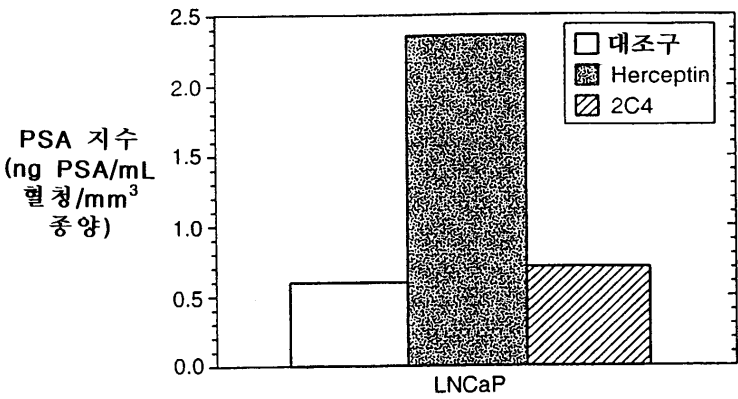
도면20



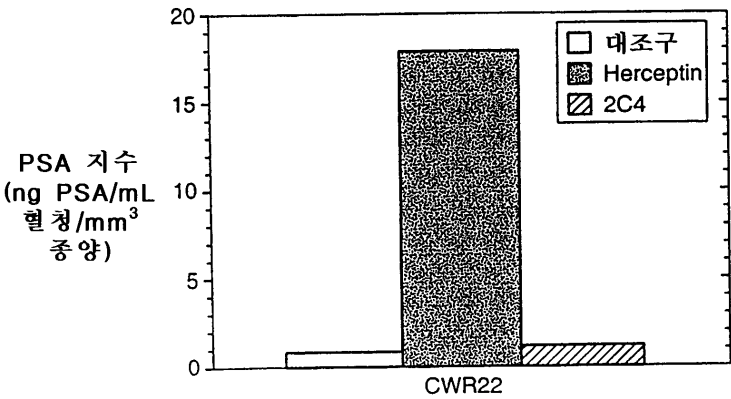
도면21



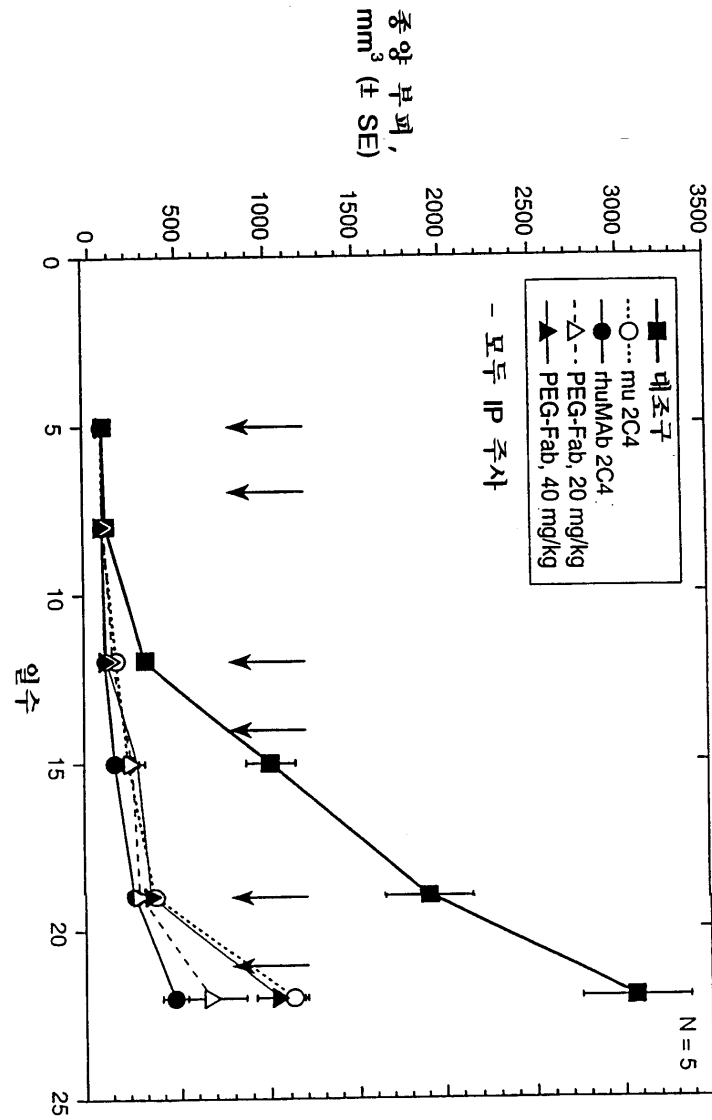
도면22a



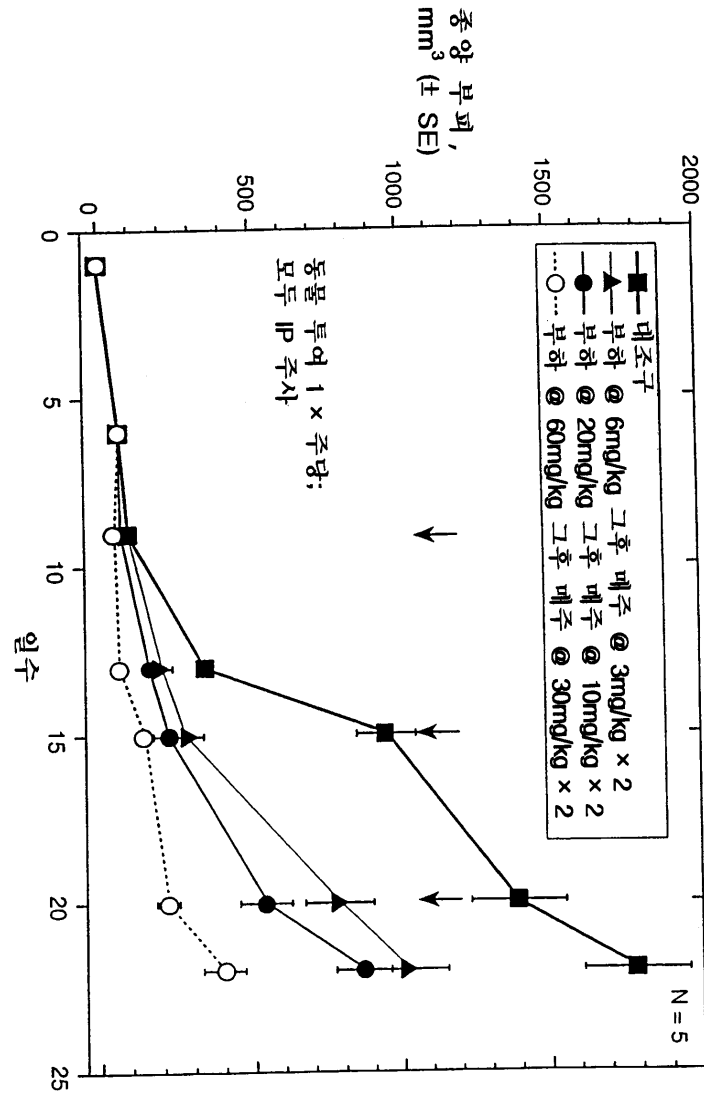
도면22b



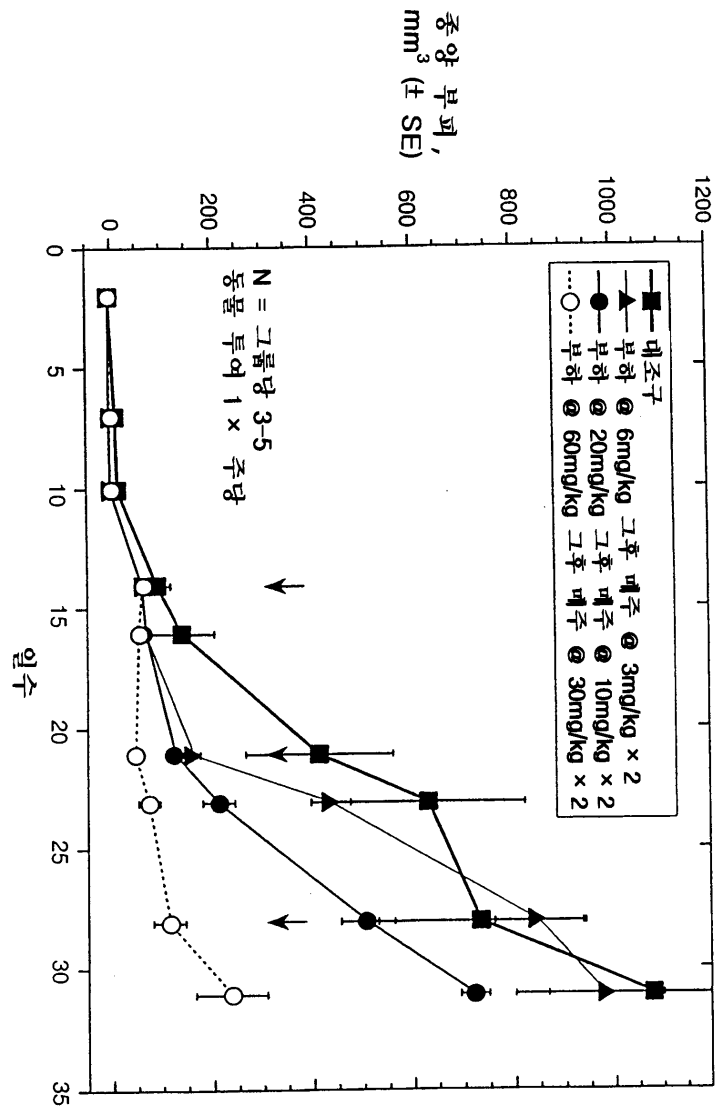
도면23



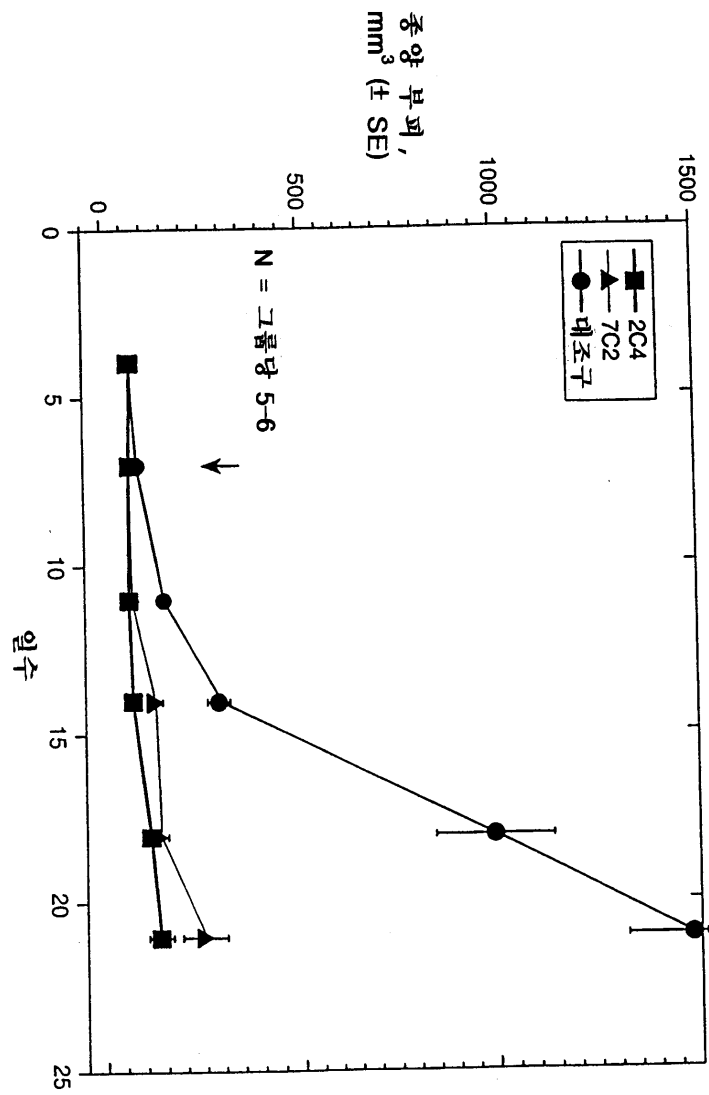
도면24



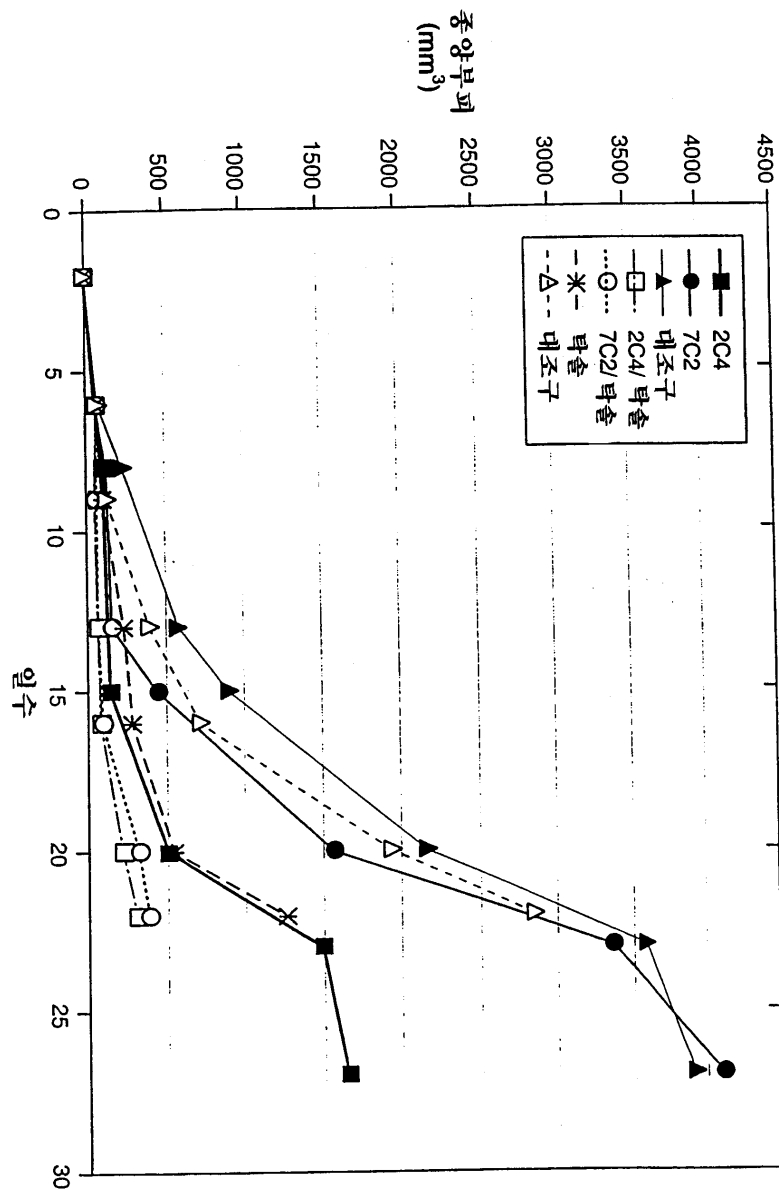
도면25



도면26



도면27



서열목록

<110> GENENTECH, INC.
SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

<120> TREATING PROSTATE CANCER WITH ANTI-ErbB2 ANTIBODIES

<130> 01-1237

<150> US60/141,315

<151> 1999-06-25

<160> 22

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg Ile Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> humanized VL sequence
 <400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> humanized VH sequence
<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> light chain consensus sequence
<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> heavy chain consensus sequence
<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> UNSURE
<222> (10)
<223> unknown amino acid
<400> 7
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 1 5 10
<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 8
Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15
Gly
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 1 5 10

```

```

<210>      11
<211>      7
<212>      PRT
<213>      Mus musculus
<220>
<221>      UNSURE
<222>      (5) .. (7)
<223>      unknown amino acid
<400>      11
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
  1              5
<210>      12
<211>      9
<212>      PRT
<213>      Mus musculus
<400>      12
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
  1              5
<210>      13
<211>      645
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
<400>      13
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
  1              5              10              15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
              20              25              30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
              35              40              45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
              50              55              60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
              65              70              75              80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
              85              90              95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
              100              105              110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
              115              120              125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
              130              135              140
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
              145              150              155              160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
              165              170              175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
              180              185              190
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
              195              200              205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
              210              215              220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys

```

225					230					235					240				
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu				
				245					250					255					
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val				
				260					265					270					
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg				
				275					280					285					
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu				
				290					295					300					
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln				
305					310					315					320				
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys				
				325					330					335					
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu				
				340					345					350					
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys				
				355					360					365					
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp				
				370					375					380					
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe				
385					390					395					400				
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro				
				405					410					415					
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg				
				420					425					430					
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu				
				435					440					445					
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly				
				450					455					460					
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val				
465					470					475					480				
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr				
				485					490					495					
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His				
				500					505					510					
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys				
				515					520					525					
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys				
				530					535					540					
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys				
545					550					555					560				
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys				
				565					570					575					
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp				
				580					585					590					
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu				
				595					600					605					
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln				
				610					615					620					
Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys				
625					630					635					640				
Gly	Cys	Pro	Ala	Glu															

645

<210>	14	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	14	
ggacagcact gccagaga		18
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	15	
caggtgatta caggccaagt ag		22
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	16	
cctgggtgtg ccacagacct tca		23
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	17	
tgaagttacc tccaggttgg t		21
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	18	
agacacattc tgtccatddd caa		23
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	19	
caagctgcaa agtgccttgc tcat		24
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	20	
	atgtatcaca gcctgtacct g	21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	21	
	ttcttggtct cttcctcctt g	21
<210>	22	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	22	
	aggtctaaga ccaaggaagc acgcaa	26