

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁶
G01N 33/574

(45) 공고일자 2005년09월30일
(11) 등록번호 10-0473824
(24) 등록일자 2005년02월18일

(21) 출원번호	10-1998-0704242	(65) 공개번호	10-1999-0071952
(22) 출원일자	1998년06월05일	(43) 공개일자	1999년09월27일
번역문 제출일자	1998년06월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1996/005448	(87) 국제공개번호	WO 1997/21104
국제출원일자	1996년12월05일	국제공개일자	1997년06월12일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 오스트레일리아, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 헝가리, 이스라엘, 일본, 대한민국, 리투아니아, 라트비아, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 싱가포르, 슬로바키아, 터키, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄,

EA 유라시아특허 : 벨라루스, 카자흐스탄, 러시아,

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

(30) 우선권주장	195 45 472.3	1995년12월06일	독일(DE)
	196 15 074.4	1996년04월17일	독일(DE)

(73) 특허권자 베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하
독일 55216 인겔하임 빙거 슈트라쎈 173

포르슝스첸트룸 칼스루에 게엠베하
독일연방공화국, 데-76133 칼스루에, 베버슈트라쎈 5

(72) 발명자 하이더 칼-하인츠
오스트리아연방공화국 아-1120 빈 헤르비큐스가쎈 4/3/21

아돌프 쿤터
오스트리아연방공화국 아-1070 빈 스티프트가쎈 15-17/10

오스테르만 엘린보르그
오스트리아연방공화국 아-1140 빈 마우에르-바흐스트라쎈 56/6

페트젤트 에릭
오스트리아연방공화국 아-3002 퍼커스도르프 한스 부흐물러가쎈 8

스프롤 마르리에스
오스트리아연방공화국 아-1120 빈 스펠크가쎈 3

(74) 대리인 김석중
최규팔

심사관 : 신원혜

(54) 상피종의진단및치료방법

요약

본 발명은 분자 표적으로서 CD44-유전자의 변이체 엑손 v6의 발현에 기초하는 상피종의 진단 및 치료방법에 관한 것이다. 바람직한 태양에서, v6-특이적 항체 분자, 특히 단클론 항체 BIWA-1(VFF-18)을 이 목적을 위하여 사용한다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 CD44 유전자의 가변성 엑손의 발현에 기초한 상피종(squamous cell carcinomas)의 진단 및 치료방법, 이들 방법을 위한 약제 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

표면 당단백질 CD44의 변이체의 발현이 랫트의 비전이성 십이지장-선암(adenocarcinoma) 세포주 뿐만 아니라 랫트의 비전이성 섬유성육종(fibrosarcoma) 세포주에서 소위 자발적 전이 행동을 유발하는데 필요하고 충분하다는 것이 최근 밝혀졌다(군터 등, 1991). 최소 CD44-이소형(isoform), 표준형 CD44가 표피세포를 포함한, 일련의 상이한 조직에서 도처에서 발현되는 반면, CD44의 일정 스플라이스(splice) 변이체들(CD44v)은 표피세포의 하위그룹에서만 발현된다. CD44-이소형들은 CD44의 10개의 엑손(v1-v10) 서열들이 완전히 제거되지만, 더 큰 변이체들에서는 상이한 조합으로 나타날 수 있는 방식으로 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 제조된다(스크레아톤 등, 1992; 하이드 등, 1993; 호프만 등, 1991). 상이한 아미노산 서열들이 단백질의 세포외 부분의 특이적 위치에 삽입된다는 점에서 상기 변이체들은 상이하다. 그러한 변이체들은 인체 종양 세포 및 인체 종양 조직에서 검출된다. 따라서 결장 직장의 발암 과정 중 CD44-변이체의 발현이 최근 조사된 바 있다(하이드 등, 1993). 정상적인 인체 결장 표피에서는 CD44-변이체의 발현이 없고 공동(空洞)의 증식 세포에서 약간의 발현만을 검출할 수 있다. 종양의 진전, 예를 들면 선암에서 후기에는, 모든 악성 변성체들이 CD44 변이체를 발현한다. 더욱이, CD44-스플라이스 변이체들의 발현이 활성 림프구 및 비-호치킨 림프종(Hodgkin's lymphomas)에서 증명되었다(쿠프만 등, 1993).

진단 및 치료 목적을 위하여 종양 및 정상 조직에서 CD44-유전자의 변이 엑손의 차별적 발현을 이용하기 위하여 다양한 접근이 채택되어 왔다(WO 94/02633, WO 94/12631, WO 95/00658, WO 95/00851, EP 0531300).

상피종에서 변이성 CD44-분자의 발현이 또한 조사되었다. 살미 등(1993)은 v6-특이적 항체에 관하여, 정상 세포에 비하여 종양 세포에서 v6-발현이 감소하였음을 발견하였다. v6-특이적 항체 11.9에 관하여, 브룩스 등(1995)은 비인두(鼻咽頭) 암종의 이질적 염색을 얻었다. 강력한 염색은 2/12의 환자에서만 이루어졌으며, 대대수의 환자에서 국소의 v6-발현이 면역조직학에 의해 검출되었다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 상피종의 진단 및 치료를 위한 신규한 방법을 개발하고 그러한 방법을 위한 약제를 제공하고자 하는 것이다.

이 목적은 본 발명에 의해 성취되었다. 그것은 분자 마커나 표적으로서 CD44 유전자의 가변적 엑손 v6의 발현에 기초한 상피종의 진단 및 치료방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종래기술로부터 알려진 것과는 상반되게, 놀랍게도 검출된, 상피종에서 v6의 강력한 상동적 발현에 기초한 방법에 관한 것이다.

바람직한 방법은 아미노산 서열 QWFGNRWHEGYRQT, 더욱 바람직하게는 아미노산 서열 WFGNRWHEGYR을 인지하는 항체 분자를 사용하는 점을 특징으로 한다. 독일, 데-38124 브라운쉬바이크, 마쉬로더 베크 1베, DSM-도이체 잠룻 퀴르 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨톨렌 게엠바하에 기탁번호 DSM ACC2174로 1994년 6월 7일에 기탁된 하이브리도마 세포주(WO 95/33771)에 의해 분비되는 단클론 항체 BIWA-1(클론 VFF-18) 및 이 항체의 유도체가 특히 바람직하다.

본 발명의 다른 측면은 본 발명에 따른 과정에서 이 종류의 항체 분자의 용도 및 이들 방법을 수행하기 위한 약제이다.

CD44-유전자의 변이체 엑손 v6의 핵산 및 아미노산 서열은 공지되어 있다(스크레아톤 등, 1992, 톨그 등, 1993). 변성 또는 대립형질 변이체의 존재는 본 발명의 실행에 전혀 중요하지 않다; 그러한 변이체는 따라서 명백히 포함된다.

인체 CD44-유전자의 엑손 v6의 서열이다:

Q A T P S S T T E E T A T Q

TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG

K E Q W F G N R W H E G Y R Q

AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA

T P R E D S H S T T G T A

ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G.

본 발명은 엑손 v6에 의해 코딩되는 에피토프, 특히 아미노산 서열 QWFGNRWHEGYRQT내의 에피토프, 가장 바람직하게는 아미노산 서열 WFGNRWHEGYR내의 에피토프에 특이적인 다클론 또는 단클론 항체를 사용하여 수행할 수 있다. 공지된 아미노산 서열에 대한 항체의 제조는 그 자체로 알려진 방법에 따라 수행할 수 있다(캐티, 1989). 예를 들면, 이 서열의 펩티드는 합성에 의해 제조할 수 있고 면역 과정에서 항체로 사용할 수 있다. 또다른 방법은 이 서열을 코딩하는 핵산(합성에 의해, 또는 예를 들면, 적절한 탐침으로부터의 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 제조될 수 있는)을 발현 벡터에 삽입하고, 숙주 개체에서 융합 단백질을 발현시킴으로써 원하는 아미노산 서열을 함유하는 융합 단백질을 제조하는 것이다. 임의로 정제된, 그 융합 단백질은 그런 다음 면역 과정에서 항원으로 사용할 수 있고 그런 다음 삽입-특이적(insert-specific) 항체를 또는 단클론 항체의 경우, 삽입-특이적 항체를 발현하는 하이브리도마를 적당한 방법으로 선별할 수 있다. 이 종류의 방법은 당해 기술분야에서 공지이다. 하이터 등(1993, 1996a) 및 쿠프만 등(1993)은 CD44의 변이체 에피토프에 대한 항체의 제조를 기술하고 있다.

그러나 본 발명에 따른 방법에 대하여, 다- 또는 단클론 항체, 예를 들면 면역글로불린의 Fab- 또는 F(ab')₂-단편, 재조합 방법에 의해 제조된 단일쇄 항체(scFv), 키메라(chimeric) 또는 인체화된(humanised) 항체 및 엑손 v6에 의해 코딩되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 기타 분자들로부터 유래된, 다른 항체 분자를 사용하는 것도 가능하다. Fab- 또는 F(ab')₂-단편 또는 기타 단편들은 예를 들면, 항체 BIWA-1(VFF-18)의 완전한 면역글로불린 또는 기타 항체(크라이트만 등, 1993)로부터 생산할 수 있다. 당업자는 또한 재조합 v6-특이적 항체 분자를 생산할 수 있는 위치에 있다. 특히 항체 BIWA-1(VFF-18)의 아미노산 서열을 분석하고/하거나 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주, 특히 그곳에 함유된 유전적 정보를 사용한 후에, 그는 BIWA-1(VFF-18)과 동일한 이디오타입을 갖는 재조합 항체 분자, 즉 항체 BIWA-1(VFF-18)과 항원 결합 위치 부위(상보성-결정 부위, CDR)에서 동일한 아미노산 서열을 갖는 항체 분자를 생산할 수 있다. 그러한 과정은 당해 기술분야에서 공지이다. 이 종류의 재조합 항체 분자들은 예를 들면 인체화된 항체(선 등, 1989; 구소 및 시만, 1991), 이중특이적 즉 이관능적 항체(바이너 등, 1993; 굿윈, 1989, 페너스톤, 1996), 단일쇄 항체(scFv, 존슨 및 버드, 1991), 완전 또는 단편 면역글로불린(콜로마 등, 1992; 네스빗 등, 1992; 바바라 등, 1992) 또는 체인 셔플링(chain shuffling)(윈터 등, 1994)에 의해 생산된 항체일 수 있다. 인체화 항체는 예를 들면 CDR-그래프팅에 의해 제조될 수 있다(EP 0239400). 골격 부위는 또한 변형될 수 있다(EP 0519596; WO 9007861). 인체화 항체에 대하여, PCR과 같은 방법(예를 들면 EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075 참조) 또는 컴퓨터-모델링(예를 들면 WO 9222653 참조)이 근래 사용될 수 있다. 융합 단백질, 예를 들면 단일쇄 항체/독소 융합 단백질(샤우다리 등, 1990; 프리드만 등, 1993)을 제

조하고 사용하는 것 또한 가능하다. 용어 "항체" 및 "항체 분자"는 다클론 및 단클론 항체뿐만 아니라 면역글로불린으로부터 구조적으로 유래될 수 있고 그 자체로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있는 이 단락에서 논의된 모든 화합물을 포함하고 자 하는 것이다.

동일한 결합 특이성을 갖는 동등한 항체를 생산하는 것은 또한 에피토프를 알고 있는 통상의 지식을 갖는 자의 능력범위 내에 있다.

진단 목적을 위하여, 항체 분자들, 바람직하게는 BIWA-1 항체 분자, 그들의 단편 또는 동일한 이디오타입을 갖는 재조합 항체 분자들은 예를 들면 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 또는 방사성 화합물(라슨 등, 1991; 토마스 등, 1989; 스리바스타바, 1988)과 같은 방사성 동위원소, 형광 염료(존슨, 1989) 또는 바이오틴 분자(구에스돈 등, 1979)를 갖는, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제(캐티 및 레이쿤달리아, 1989)와 같은 효소와 연결될 수 있다. 치료 목적을 위하여 v6-특이적 항체 분자들, 바람직하게는 BIWA-1(VFF-18)-항체 분자 또는 VFF-18-유래 항체 분자, 예를 들면 그들의 단편 또는 동일한 이디오타입을 갖는 재조합 항체 분자들이 ^{90}Y , ^{131}I , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{177}Lu (콰드리 등, 1993; 레나드 등, 1985, 비리에센도르프 등, 1991; 월버 등, 1989, 마라베리아스 등, 1995a, 저르식 및 셰인버그 등, 1989)와 같은 방사성 동위원소, 독소(비테타 등, 1991; 비테타 및 토르페, 1991; 크라이트만 등, 1993; 튜에르 등, 1993), 세포성장억제제(쉬라페 등, 1992), 프로드러그(왕 등, 1992; 센터 등, 1989), 광활성 물질(헤밍 등, 1993), 상이한 특이성을 갖는 항체 분자 또는 방사성 화합물에 연결될 수 있다. 항체 분자는 또한 사이토카인 또는 일부 다른 면역조절성 폴리펩티드, 예를 들면 종양 괴사 인자, 림포톡신(레이스펠드 등, 1996) 또는 인터류킨-2(백커 등, 1996)에 연결될 수 있다. 항체 분자는 또한 예를 들면 스트렙타비딘 또는 바이오틴(굿윈, 1995)를 이용하는 예비표적 시스템에서 사용하기 위하여 변형될 수 있다.

우수하게도, 본 발명에 따른 진단방법은 상피종의 의혹이 있거나 진단이 이미 이루어졌으나 종양의 특성을 더욱 밝힐 필요가 있는 환자들로부터, 예를 들면, 생검으로부터의 표본을 조사하는데 사용될 수 있다. 변이체 엑손 v6에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 함유하는 변이체 CD44-분자의 검출은 항체를 사용하여 단백질 수준에서 또는 특이적 핵산 탐침 또는 중합효소 연쇄반응(PCR)용 프라이머를 사용하여 핵산 수준에서 수행될 수 있다. 결과적으로 본 발명은 또한 그러한 방법을 위한 탐침 또는 프라이머로 적합한 항체 분자 또는 핵산, 상피종의 진단 및 분석을 위한 이들 항체 및 핵산의 용도에 관한 것이다. 예를 들면 그 자체로 공지된 방법에 의해 항체를 이용하여 조직 단편을 면역조직화학적으로 검사할 수 있다. 조직 표본 또는 체액으로부터 채취한 추출물을 또한 항체를 이용한 기타 면역학적 방법, 예를 들면 웨스턴 블랏, 효소결합면역 흡착검사(ELISA, 캐티 및 레이쿤달리아, 1989), 방사성면역검사(RIA, 캐티 및 머피, 1989) 또는 관련된 면역검사에 의해 검사할 수 있다. 그 검사는 정성적, 반-정량적 또는 정량적일 수 있다.

인 비트로 진단과 별도로, 본 발명에 따른 특이성을 갖는 항체 분자는 또한 상피종의 인 비보 진단에도 적합하다. 항체 분자가 검출가능한 표지를 수반한다면, 그 표지는 진단 목적을 위하여, 예를 들면 인 비보에서 종양을 이미징(imaging)하거나, 예를 들면 방사성가이드(radioguided) 외과수술을 위하여 검출될 수 있다. 이뮤노스inti그래피(immunoscintigraphy)(이미징)용 방사성 동위원소와 결합된 항체를 사용하기 위하여, 예를 들면, 본 발명을 수행하는데 기초로서 당업자에 의해 사용될 수 있는 수많은 방법들이 있다(시카르디 등, 1989; 키만 등, 1987; 퍼킨스 및 펴, 1992; 콜커 등, 1987; 톰프슨 등, 1984).

따라서 변이체 CD44-에피토프 v6의 발현의 검출 및/또는 정량에 의해 수득한 데이터는 진단 및 예후에 사용할 수 있다. 기타 예후 지수, 예를 들면 종양 등급과 이들 데이터를 결합하는 것이 우수할 수 있다.

임의로 세포독성제와 결합된, 본 발명에 따른 특이성을 갖는 항체는 상피종의 치료에 우수하게 사용될 수 있다. 그것들은 전신 또는 국부로, 예를 들면 정맥 경로로(환괴(丸塊) 또는 연속적 침제(infusion)) 또는 복강내, 근육내, 피하, 또는 기타 주사/침제에 의해 투여될 수 있다. 결합 또는 비결합 항체(그것들은 완전한 면역글로불린, 단편, 재조합 인체화 분자 등이다)를 투여하는 방법은 당해 기술분야에서 공지이다(멜샤인 등, 1991; 라슨 등, 1991; 비에타 및 토르페, 1991; 비에타 등, 1991; 브레이즈 등, 1992, 1995; 프레스 등, 1989; 바이너 등, 1989; 차탈 등, 1989; 시어스 등, 1982). 그것들은 치료요법적으로, 예를 들면 항체 1.1ASML(세이터 등, 1993)과 동일한 방법으로 사용될 수 있다. 비변형 단클론 항체는 만약 그것들이 세포독성 효과, 예를 들면 보체-유도 또는 항체-유도 세포 독성(레이스플러 등, 1994)에 적합한 내부 효과기(effector) 기능을 갖는 경우 치료 목적으로 직접 사용될 수 있다. 이 출원을 위한 적합한 단클론 항체는 쥐 항체 이소타입 IgG2a 또는 인체 항체 IgG1-타입이다. 항-이디오타입 기작을 통하여 환자 자체의 항종양 반응을 유도하기 위하여 비변형 항체를 또한 투여할 수 있다(바움 등, 1993; 카잘레이 등, 1994).

치료적 적용의 바람직한 태양에 따라, 인체화된 v6-특이적 면역글로불린 또는 그것의 $F(ab')_2$ 단편은 ^{90}Y (콰드리 등, 1993; 브리에센도르프 등, 1995), ^{131}I (마라베이아스 등, 1995a, 1995b; 주이드 등, 1995; 프레스 등, 1995; 토마스 등, 캐티 1985, p. 230-239), ^{186}Re (브레이즈 등, 1992, 1995) 또는 또다른 적당한 방사성 동위원소와 연결되고 상피종의 방사성면역요법에 사용된다. 예를 들면, 항체 BIWA-1, BIWA-1의 인체화된 버전 또는 BIWA의 $F(ab')_2$ 단편 또는 인체화된 항체를 ITCB-DTPA(이소티오시아나토벤질-디에틸렌트리아민펜타아세테이트)와 같은 킬레이팅 링커를 이용하여 ^{90}Y 에 연결하여, 비활성 5-20mCi/mg, 바람직하게는 10mCi/mg의 비활성을 갖게 할 수 있다. 그런 다음 이 약제는 항원-양성 종양을 갖는 환자에게 0.1 내지 1mCi/kg 체중, 바람직하게는 0.3 내지 0.5mCi/kg 체중의 용량으로 환자에게 투여될 수 있다. 항체 분자가 ^{131}I 에 연결되어 있다면, 가능한 용량 계획은, 예를 들면 비활성 2mCi/mg을 위하여 6주 간격으로 $2 \times 150mCi$ 가 될 것이다. 당업자는 그 자체로 공지된 방법을 사용하여 최대 가능한 용량을 결정할 수 있다(마라베이아스 등, 1995a, 1995b). 투여될 단백질의 총량이 2 내지 5mg인 경우, 신속한 정맥내 환과 주사 형태로 투여될 수 있다. 더 많은 양의 단백질의 경우 침체가 더욱 적합한 투여방법일 수 있다. 단클론 항체의 경우 투여전에 약제를 과량의(예를 들면 10 배 물 과량) 비방사성 항체와 혼합하는 것이 필요하다; 이 경우, 그 약제를 예를 들면 15분에 걸쳐 정맥내 침체 형태로 투여하는 것이 더 낫다. 이것은 반복될 수 있다. 그 요법은 외부 방사성 요법과 결합될 수 있다. 그것은 또한 골수 이식술에 의해 보조될 수 있다; 이것은 치료중 골수에서 1.6Gy를 초과하는 용량에 도달할 때 특히 필요하다.

본 발명에 따른 항체 분자는 또한 CD34-양성 간(幹) 및 전구 세포 조제를 정제하기 위하여(이뮤노퍼징(immunopurging)) 엑스 비보에서 사용할 수 있다. 상피종의 방사선 또는 화학요법은 또한 자가 골수 이식수술로 보조될 수 있다. 따라서 투여된 조혈성 간 및 전구 세포들의 조제에는 종양 세포가 없어야 한다. 이것은 본 발명에 따른 항체 분자, 예를 들면 항체-독소 결합체(마클레부스트 등, 1994; DE P 196 48 209.7)로 배양함으로써 성취될 수 있다.

본 발명에 따른 항체 분자는 또한 재조합 작제물 형태로 T-림프구의 T-세포 수용체로 도입될 수 있다. 이런 종류의 재프로그래밍된 T-림프구는 항원-발현 종양 세포에 대해 선별적으로 결합하고 세포 독성 활성을 나타내어, 그 결과로 그것들은 상피종의 치료에 사용될 수 있게 된다(PCT/EP9604631; 알텐슈미트 등, 1996).

도면의 간단한 설명

도 1: 인체 CD44v6 서열로부터 유래된 합성 펩티드에 결합시키는 것에 의한 BIWA-1의 에피토프 특이성의 결정. 펩트 CD44v6의 상응 펩티드를 항체 1.1ASML로 시험하였다. 펩티드가 마이크로타이터 플레이트상에 고정되어 있는 EISA로 결합을 측정하였다(하이터 등, 1996b, 도 2 참조). -: 결합 안함, +/-: 약한 결합, +: 강한 결합.

도 2: CD44v6-특이적 단클론 항체 BIWA-1을 사용한 후두 상피종(a) 및 식도 암종의 간 전이(b)의 면역조직화학적 분석. 양 경우에 종양 세포의 막과의 항체의 반응성을 관찰할 수 있다. 실물 확대 40×, 대비염색 헤마톡실린.

도 3: 다양한 CD44v6-특이적 mAb들의 항원 결합의 비교. 4개의 상이한 CD44v6-특이적 mAb의 인체 SCC A-431-세포의 결합을 세포 ELISA에서 측정하였다. MAb BIWA-1은 다른 mAb 보다 종양 세포에 대해 더 높은 친화성을 나타낸다.

도 4: mAb BIWA-1의 상세한 에피토프 맵핑. CD44v6-코딩 부위의 아미노산 18-32에 걸치는 다양한 중복 합성 펩티드에 대한 BIWA-1의 결합을 경쟁적 ELISA에 의해 측정하였다. 최소 결합 서열(펩티드 v6(19-29))을 밑줄로 표시하였다.

도 5: A-431 외레이식 누드 마우스에서 ^{125}I -BIWA-1의 생체분포. 항체의 축적을 주사후 4, 24, 48, 120 및 168시간에 % ID/g(평균±SEM)으로 나타내었다.

실시예

실시예 1: 상피종에서 CD44v6의 발현

조직

파라핀-포매 종양 표본 총 126 케이스를 CD44v6의 발현에 대해 mAb BIWA-1(클론 VFF-18)을 사용하여 면역조직화학적으로 분석하였다. 상기 표본은 31 케이스의 원발성 상피종(15 케이스 후두, 16 케이스 피부), 91 케이스의 림프절 전이(후두, n=38; 폐, n=27; 식도, n=11; 구강, n=11; 편도선, n=4) 및 4 케이스의 간 전이(식도)를 포함하였다.

항체

CD44v의 HPKII 타입의 총 가변성 부위(호프만 등, 1991)를 인체 케라티노사이트-cDNA로부터 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하였다. 호프만 등에 의해 기재된 바 있는 두 개의 PCR 프라이머 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3', 위치 25-52, 및 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', LCLC97-변이체 부위의 위치 1013-984는 PCR 산물을 벡터 pGEX-2T(스미스 등, 1988)에 직접 클론하기 위하여 사용되는 EcoRI 인지 위치를 함유하였다. 그 결과 작제물(pGEX CD44v HPKII, v3-v10)은 *슈스토소마 자포니쿰* (*Schistosoma japonicum*)으로부터의 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 및 인체 CD44의 엑손 v3-v10로 이루어진 ~70kD의 융합 단백질(도 1; 하이다 등, 1993)을 코딩한다. 융합 단백질을 *E. coli*에서 발현시키고 그런 다음 글루타티온 아가로스에 대해 친화성 정제하였다(스미스 등, 1988).

암컷 Balb/c 마우스를 하기 계획에 따라 친화성-정제된 융합 단백질로 복강내로 면역시켰다:

제1 면역화: 완전 프로인트 애쥬번트내의 90 μ g의 융합 단백질

제2 및 제3 면역화: 불완전 프로인트 애쥬번트내의 50 μ g의 융합 단백질

면역화는 4주 간격으로 이루어졌다. 최종 면역으로부터 14일 후 동물을 3일 연속 PBS내의 10 μ g의 융합 단백질로 면역화시켰다. 그 다음날, 높은 항체 역가를 갖는 동물로부터의 지라 세포를 폴리에틸렌글리콜 4000을 이용하여 P3.X63-Ag8.653 마우스 골수종 세포와 융합하였다. 그 다음 그 하이브리도마 세포를 HAT-배지에서 마이크로타이터 플레이트에서 선별하였다(콜러 및 밀스타인, 1975; 키아니 등, 1979).

혈청내에서 항체 역가의 측정 또는 하이브리도마 상등액의 스크리닝은 EISA를 사용하여 수행하였다. 이 시험에서, 먼저 마이크로타이터 플레이트를 융합 단백질(GST-CD44v3-10)로 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제만으로 덮었다. 그런 다음 그것들을 혈청 표본 또는 하이브리도마 상등액의 연속 희석물로 배양시키고 특이적 항체를 마우스 면역글로불린에 대한 퍼옥시다아제-결합 항체를 사용하여 검출하였다. 글루타티온-S-트랜스퍼라아제와만 반응하는 모든 하이브리도마를 제거하였다. 잔류 항체의 특성을 도메인-특이적 융합 단백질(엑손 v3, 엑손 v5+v6, 엑손 v6+v7, 엑손 v8-v10)(쿠프만 등, 1993)을 이용한 ELISA에서 일차로 분석하였다. 그것들의 면역조직화학적 반응성을 인체 피부 절편상에서 시험하였다.

BIWA-1(VFF-18; 제조 및 성질에 대해서는 WO 95/33771 참조)은 엑손 v6에 의해 코딩되는 도메인을 함유하는 융합 단백질에만 결합하였다. 항체의 에피토프를 더욱 한정하기 위하여, v6 도메인의 일부를 나타내는 다양한 합성 펩티드를 ELISA 결합 분석에서 사용하였다(도 1). 14개 아미노산 펩티드 v6D가 가장 강력한 결합을 나타내었다. 결론적으로, BIWA-1의 에피토프는 전체적으로 또는 부분적으로 엑손 v6에 의해 코딩되는 도메인의 서열 QWFGNRWHEGYRQT내에 존재한다. 이 서열은 치료용 랫트 모델에 사용되고 랫트 CD44v6에 특이적인 항체 1.1ASML의 결합 에피토프와 상동적이다(도 1).

면역조직화학

일차 항체로 배양하기 전에, 로티히스톨(Rotihistol)(로스, 독일)내의 파라핀 절편(4 μ m)를 매회 10분간 3회 파라핀을 제거한 다음 알콜 시리즈에서 재수화시켰다. 그 절편을 증류수로 즉시 세척한 다음 마이크로파 오븐(샤프 모델 R-6270)에서 구웠다. 각 마이크로파 배양 후 그 절편을 20분간 냉각시켰다. 최종 냉각 단계 후 그 담체를 PBS에서 세척하고 정상 염소 혈청(PBS내 10%)으로 예비-배양하였다. PBS에서 3회 세척한 후 그 절편을 일차 항체(BIWA-1: 5 μ g/ml; 쥐 IgG(이소타입-상응 음성 대조구) 5 μ g/ml PBS/1% BSA)로 1시간 동안 배양하였다. 케라티노사이트로서 정상 인체 피부 절편으로 이루어진 염색 반응에 사용되는 양성 대조구는 v3-v10을 함유하는 CD44-이소형을 발현한다. 내생성 퍼옥시다아제를 PBS내의 0.3% H2O2로 차단하고, 그 절편을 바이오티닌화된 이차 항체(항-마우스 IgG-F(ab')2, DAKO Corp.)와 30분간 배양하였다. 염색을 현상하기 위하여, 그 절편을 스트렙타비딘-바이오티닌-퍼옥시다아제 복합체(DAKO Corp.)로서 바이오티닌에 결합된 호오스래디쉬 퍼옥시다아제와 30분간 배양하였다. 그런 다음 그 절편을 3,3'-아미노-9-에틸-카바졸 기질(시그마

이뮤노케미칼즈)에서 5-10분간 배양하였고, 그 반응을 H_2O 로 중지시키고 그 절편을 헤마톡실린으로 대비염색하였다. 제이스 악시오스콥 광학 현미경(Zeiss Axioskop Light Microscope)을 이용하여 그 염색을 측정하고 그 색상 강도를 하기와 같이 정량화하였다: +++, 강한 발현; ++, 중간 발현; +, 약한 발현; -, 불명확 또는 발현이 검출되지 않음. 깨끗한 막 염색을 갖는 종양 세포만이 양성으로 평가되었다. 각 절편의 양성 종양 세포의 비율을 대략적으로 측정하고 두 개의 군을 형성하였다: 국소 양성 종양(항체와 반응시킨 종양 세포의 10% 미만) 및 양성 종양(양성 종양 세포의 10% 이상). 만약 양성 세포에서 종양 세포의 80% 미만이 항체와 반응하였다면, 그 해당 비율을 나타내었다.

다양한 기원의 상피종 126 케이스를 CD44v6-특이적 단클론 항체 BIWA-1을 사용하여 분석하였다. CD44v6를 함유하는 이소형의 발현이 한 개의 종양 표본을 제외한 모두에서 관찰되었다. 대다수의 표본은 80-100%의 종양 세포에서 항원의 발현을 나타내었고 그 염색은 종양 세포의 막에 한정되었다. 스트로마(stroma) 조직, 림프구, 근육 세포 또는 내피에서는 어떠한 반응도 관찰되지 않았다.

이들 종양 세포에서 CD44v6-분자의 발현을 정량하기 위하여, 정상 인체 피부의 절편을 종양 절편과 병행하여 염색하였다. 정상 피부 케라티노사이트는 고수준의 Cd44-이소형을 발현하고 지금까지 기재한 바 있는 정상 세포의 CD44v6 중 가장 강력한 발현체이다. 결론적으로, 케라티노사이트 염색은 참조로 사용되고 우리의 측정 체계에서 "강력함"(+++)으로 분류된다. 검사된 대다수의 종양 표본에서, 종양 세포의 염색은 피부 케라티노사이트의 염색과 비교할만 하거나 더욱 강력하였고, 단지 몇몇 케이스만 약한 종양 염색(3 케이스의 림프절 전이) 또는 중간 종양 염색(2개의 원발성 암종, 10개의 전이)을 나타내었다. 그 염색 반응은 주어진 종양 절편내에서 매우 균질적이며 절편내 대다수의 종양 세포가 동일한 염색 강도를 가졌다. 원발성 종양 및 전이간에 CD44v6-발현 양식에서 어떠한 중대한 차이점도 관찰되지 않았다. 그 결과의 상세한 요약은 도 2에 나타낸 실시예들과 함께 표 1에 나타내었다.

표 1.

상피종에서 CD44v6의 발현

표본			종양 타입		BIWA-1 반응성
46937	86		원발성	후두	+++*
4687	90		원발성	후두	+++
8372	90		원발성	후두	+++
17427	90		원발성	후두	+++
27298	90		원발성	후두	+++
46908	90		원발성	후두	+++
51334	90		원발성	후두	+++
51402	91		원발성	후두	+++
60414	91		원발성	후두	+++
61733	91		원발성	후두	+++
12280	92		원발성	후두	+++
23140	92		원발성	후두	+++
31792	92		원발성	후두	+++
32214	92		원발성	후두	+++
10209	95		원발성	후두	+++
2366	86		원발성	피부	+++
2574	86		원발성	피부	+++
9916	86		원발성	피부	++/+++
2696	87		원발성	피부	+++
8906	87		원발성	피부	+++
8191	88		원발성	피부	+++
8354	88		원발성	피부	++50%
11963	88		원발성	피부	++
5590	90		원발성	피부	++/+++
530	92		원발성	피부	+++
2583	94		원발성	피부	+++
1134	94		원발성	피부	+++
10901	95		원발성	피부	+++

11557	95		원발성	피부	+++
11744	95		원발성	피부	+++
11917	95		원발성	피부	+++
4688	90	I	림프절 전이	후두	++/+++
4688	90	II	림프절 전이	후두	-
8374	90		림프절 전이	후두	+++
17428	90		림프절 전이	후두	+++
27300	90		림프절 전이	후두	+++
36942	90		림프절 전이	후두	+++
46909	90		림프절 전이	후두	++
51336	90		림프절 전이	후두	+++
41108	91		림프절 전이	후두	+++
51398	91		림프절 전이	후두	+++
60416	91		림프절 전이	후두	+++
61734	91		림프절 전이	후두	+++
1318	92	I	림프절 전이	후두	+++
1318	92	II	림프절 전이	후두	+++
1318	92	III	림프절 전이	후두	+++
1318	92	IV	림프절 전이	후두	+++
2863	92	I	림프절 전이	후두	+++
2863	92	II	림프절 전이	후두	+++
5745	92	I	림프절 전이	후두	+++
5745	92	II	림프절 전이	후두	+++
8969	92	I	림프절 전이	후두	+++
8969	92	II	림프절 전이	후두	+++
8969	92	III	림프절 전이	후두	++
8969	92	IV	림프절 전이	후두	+++
8969	92	2/I	림프절 전이	후두	+++
8969	92	2/II	림프절 전이	후두	+++
8969	92	2/III	림프절 전이	후두	++
8969	92	2/IV	림프절 전이	후두	+ / ++
9366	92		림프절 전이	후두	+++

9509	92		림프절 전이	후두	+++
9566	92		림프절 전이	후두	+++
12283	92		림프절 전이	후두	+++
14046	92		림프절 전이	후두	+++
31787	92		림프절 전이	후두	+++
49228	92		림프절 전이	후두	+++50%
29228	93		림프절 전이	후두	+++
29829	93		림프절 전이	후두	++
29804	95		림프절 전이	후두	++/+++
15293	91		림프절 전이	폐	+25%
1667	92		림프절 전이	폐	+20%
2757	92	I	림프절 전이	폐	+++
2757	92	II	림프절 전이	폐	+++
2757	92	III	림프절 전이	폐	+++
2757	92	IV	림프절 전이	폐	+++
4790	92		림프절 전이	폐	+++
6168	92	I	림프절 전이	폐	++50%
6168	92	II	림프절 전이	폐	+++
6168	92	III	림프절 전이	폐	+++
6168	92	IV	림프절 전이	폐	+++
7206	92		림프절 전이	폐	+++
7531	92	I	림프절 전이	폐	+++
7531	92	II	림프절 전이	폐	+++
7531	92	III	림프절 전이	폐	++/+++
7531	92	IV	림프절 전이	폐	+++
10324	92		림프절 전이	폐	+++
10519	92	II	림프절 전이	폐	+++
10519	92	RM II	림프절 전이	폐	+++
10958	92		림프절 전이	폐	+++
11425	92	I	림프절 전이	폐	+++
11425	92	II	림프절 전이	폐	+++

13055	92		림프절 전이	폐	+++
13055	92	II	림프절 전이	폐	국소+++
13055	92	III	림프절 전이	폐	+++
15663	92		림프절 전이	폐	+++
16713	92		림프절 전이	폐	+++
14980	91	I	림프절 전이	식도	+++
14980	91	II	림프절 전이	식도	+++
16641	91	I	림프절 전이	식도	+++
16641	91	II	림프절 전이	식도	+++
16641	91	III	림프절 전이	식도	+++
1059	92		림프절 전이	식도	+
1710	92	I	림프절 전이	식도	+++
1710	92	II	림프절 전이	식도	+++
1710	92	III	림프절 전이	식도	+++
11502	92	I	림프절 전이	식도	+++
11502	92	II	림프절 전이	식도	++
202	92		림프절 전이	구강	++60%
6030	92		림프절 전이	구강	+ / ++ / +++ 25%
7335	92	I	림프절 전이	구강	+++
7335	92	II	림프절 전이	구강	+++
15324	92	II	림프절 전이	구강	+++70%
16164	92	I	림프절 전이	구강	+++
16164	92	II	림프절 전이	구강	+++50%
16412	92		림프절 전이	구강	++ / +++
16836	92	I	림프절 전이	구강	+++
16836	92	II	림프절 전이	구강	+++
16836	92	III	림프절 전이	구강	+++
6228	92	I	림프절 전이	편도선	+++
6228	92	II	림프절 전이	편도선	+++
6618	92		림프절 전이	편도선	+++
11840	92		림프절 전이	편도선	++

14172	91	4	간 전이	식도	+++
14172	91	5	간 전이	식도	+++
4131	94	1	간 전이	식도	+ / ++
8438	94		간 전이	식도	국소++ / +++

80-100%의 종양 세포들이 BIWA-1과 양성적으로 반응하였다. 더 적은 수의 종양 세포들이 항체와 반응한 경우, 그 수득 비율을 나타내었다.

실시예 2: 신장 세포 암종, 전립선 암종 및 결장 암종의 간 전이에서의 CD44v6 의 발현

조직

신장 세포의 19 케이스(12 케이스의 투명 세포, 5 케이스의 호염성, 1 케이스의 험염성, 1 케이스의 호산선종), 전립선의 16개 원발성 선암 및 전립선 선암의 19 케이스의 림프절 전이, 및 결장 선암의 30 케이스의 간 전이를 분석하였다.

항체

BIWA-1 (실시예 1 참조).

면역조직화학

방법에 대하여 실시예 1 참조.

상피종과는 반대로, 검사된 대다수의 신장 세포 및 전립선 암종에서 CD44v6-이소형이 검출되지 않거나 국소적 발현만이 검출될 수 있었다. 전립선 암종에서 국소적 발현 이상인 경우, 정상 전립선 표피의 염색과 비교하여, 염색이 널리 퍼져 세포질성이며 약하거나 불균일한 것이 우세하였다. 검사된 결장 암종의 간전이의 50%에서, CD44v6 이소형의 국소적 발현 이상이 검출되었다. 대다수의 케이스에서 염색은 희미하거나 또는 중간 정도였지만, 일반적으로 표본 종양 세포의 100%보다 적은 수가 BIWA-1과 어떠한 염색을 나타내었다. 그 결과를 표 2에 요약하였다.

표 2.

전립선 선암, 신장 세포 암종 및 결장 암종의 간 전이에서 CD44v6의 발현

종양의 타입		n	BIWA-1 반응성		
			음성	국소 양성	양성
전립선 선암	원발성	16	8	3	5
전립선 선암	림프절 전이	19	15	2	2
신장 세포 암종	원발성	19	17	0	2
결장 암종	간 전이	30	7	8	15

실시예 3: CD44v6-특이적 항체의 특성화

세포주

인체 SCC 세포주 A-431(외음의 자발적 유표피종)을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(록웰 MD)으로부터 획득하고 제조자의 지시에 따라 배양하였다. CD44v6-함유 이소형의 표면 발현을 FITC-연결 mAb BIWA-1을 이용하여, FACS 분석에 의해 결정하였다.

역학적 상수의 분석

단클론 항체 CD44v6-상호작용의 친화성 및 역학을 BIAcore 2000 시스템(파마시아 바이오센서)을 이용하여, 서피스 플라스몬 레조넌스(Surface Plasmon Resonance)에 의해 결정하였다. 엑손 v3-v10(GST/CD44 v3-v10)에 의해 코딩되는 부위를 함유하는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제-CD44-융합 단백질을 CM5 센서 칩상에 고정시켜, 제조자의 지시에 따라 아민 커플링법을 수행하였다. HBS(10mM HEPES pH 7.4, 150mM 염화나트륨, 3.4mM EDTA, 0.05% BIA 코어 계면활성제 P20)내에 다양한 농도(8-132nM)의 항체를 유속 5 μ l/분으로 항원-특이적 표면에 주사하였다. 그 상호작용을 SPR 신호 변화로 기록하였다. 완충액 흐름(HBS)에서 5분간 항체의 해리를 관찰하였다. 단일 펄스의 15 μ l 30mM HCl로 칩 표면을 재생시켰다. 역학적 상수의 데이터 분석 및 계산을 파마시아 바이오센서 BIA 측정 소프트웨어, 버전 2.1을 사용하여 수행하였다.

이 방법으로, BIWA-1의 항원 친화성을 다른 CD44v6-특이적 mAb(VFF4, VFF7, BBA-13(IgG1, R&D 시스템, 애빙돈, U.K.))와 비교하였다. 다양한 항체의 역학 및 친화성 상수를 두 개의 독립적인 실험에서 결정하였다. 표 3은 4개의 mAb에 대하여 결합 속도(k_a), 해리 속도(k_d) 및 해리 상수(K_d)를 나타낸다.

표 3.

다양한 CD44v6-특이적 mAb의 역학 및 친화성 상수

항체	$K_A(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_d(M)$
VFF4	1.1×10^5	2.6×10^{-5}	2.4×10^{-10}
VFF7	1.1×10^5	1.2×10^{-4}	1.1×10^{-9}
BIWA-1	1.3×10^5	2.2×10^{-5}	1.7×10^{-10}
BBA-13	3.7×10^4	2.3×10^{-5}	6.2×10^{-10}

ELISA를 이용한 항체-단백질 상호작용의 분석

CD44v6를 발현하는 A-431 세포를 96-웰 플레이트(팔콘 마이크로테스트 III, 벡톤 디킨슨, 링컨 파크, NJ)에서 37°C에서 밤새 10% 송아지 태아 혈청을 갖는 RPMI 1640에서 웰당 5×10^4 의 수로 배양하였다. PBS/0.05% 트윈 20으로 세척한 후 세포를 1분 동안 빙냉 에탄올로 고정시키고, 이어서 세척 단계를 거쳤다. 일차 항체(분석 완충액: PBS/0.5% BSA/0.05% 트윈 20내에서, 각 경우에 VFF4, VFF7, BIWA-1, BBA-13, 1ng/ml 내지 600ng/ml)로의 배양을 1시간 동안 실온에서 실시하였고 3회 세척 단계를 거쳤다. 사용된 이차 항체는 래빗-항마우스-IgG 호오스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 항체(DAKO 코퍼레이션, 코펜하겐, 덴마크; 분석 완충액에 희석 1:6000)였다(상온에서 1 시간). 3회의 세척 단계 후, TMB 용액(카르케가드 및 페리, 게터스버그, USA)을 이용하여 색상을 현상하였다. 휴렛-팩커드 ELISA 판독기를 사용하여 소멸을 측정하였다.

도 3은 BIAcore 분석에 의해 결정된 항체의 상대적 친화성이 그것의 종양 세포와의 반응에 반영된다는 것을 나타내며, BIWA-1이 최고의 결합 친화성을 나타낸다.

CD44-엑손 v6에 의해 코딩되는 단백질 도메인은 45개 아미노산으로 이루어진다(도 4). BIWA-1에 의해 인지되는 에피토프를 더욱 정확하게 정의하기 위하여, 일련의 합성 펩티드를 ELISA 분석에 사용하였다. 예비 실험은 중앙에 위치한 14-머(14-mer)(아미노산 군 18-31; 도 4; 도 1을 또한 참조)에 결합하고 이 부위 밖의 펩티드에는 결합하지 않는다는 것을 보여주었다. 따라서 제2 시리즈의 펩티드를 합성하고 경쟁적 ELISA에서 시험하였다(도 4). 그 결과는 펩티드 19-29(WFGNRWHEGYR)이 고친화성 결합에 필요한 최소 구조임을 나타내었다. C-말단 아르기닌기의 제거는 10배 이상 약한 결합을 초래하였다.

실시예 4: 외레이식편-수반 누드 마우스에서 방사성-요오드화 CD44v6-항체의 생체분포

A-431-외레이식편 모델

8주된 암컷 Balb/c nu/nu 누드 마우스(B & K 유니버설, 렌튼, WA)에 5×10^6 배양 A-431 세포(외음의 인체 유표피종)를 좌측 정중선에 피하 주사하였다. 2주내의 A-431 종양을 수반하는 외레이식 동물을 생체분포 실험에 사용하였다(종양 중량: 40-50mg).

BIWA-1의 방사성-요오드화

이질이관능성 가교제 석신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트(succinimidyl 4-(N-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 사용하여 단백질 G-정제 mAb BIWA-1(쥐 IgG1)을 스트렙타비딘에 결합시켰다. 디티오프레이톨(dithiothreitol)로 항체를 예비처리함으로써 생산된 환원된 항체-시스테인릴 기에 스트렙

타비딘-라이실기가 연결되었다. 생체분포 실험을 위하여, p-요오도페닐 표지제(PIP; NEN 듀폰, 윌밍톤, DE)를 사용하여 BIWA-1/SA를 ^{125}I 를 갖는 라이신의 일차 아민으로 표지시키고 이어서 월버 등(1989)의 방법으로 처리하였다. BIWA-1의 SA 또는 ^{125}I 로의 표지는 마우스에서 항체의 면역반응성 또는 약물동력학에 영향을 미치지 않았다.

생체분포 실험

인체 A-431 종양으로 외래이식된 누드 마우스에 $50\mu\text{g}$ 의 mAb BIWA-1(비활성 0.1-0.14mCi/mg)상의 $5-7\mu\text{Ci}$ ^{125}I 를 링 꼬리혈관을 통하여 정맥내로 주사하였다. n=3 동물군에서 주사 후 4, 24, 48, 120 및 168 시간의 시각에 시간-생체분포 연구를 실시하였다. 선택된 시간에 마우스의 체중을 측정하고 혈액을 역-궤도 망상조직(retro-orbital plexus)으로부터 추출하고 그것들을 경부 전위(cervical discoloration)에 의해 도살하였다. 9개의 기관과 조직을 수집하여 중량을 측정하였다: 혈액, 꼬리, 폐, 간, 지라, 위, 신장, 소장 및 종양. 에너지 윈도우를 ^{125}I 에 대해 25-80keV로 셋팅시킨 감마-섬광계수기(액커드 인스트루먼트 컴파니, 메리덴, CT)에서 주사된 항체 조제 표준과 비교함으로써 조직에서의 방사성을 계수하였다. 조직 그램당 주사 용량의 비율을 계산하였다(% ID/g).

예비 실험은 BIWA-1이 쥐 CD44v6-항원과 교차반응하지 않음을 보여주었다. 표 4 및 도 5는 종양 및 정상 조직에서 방사성의 흡수를 나타낸다. 요오드화 BIWA-1은 48시간 후 18% ID/g 이상까지 증가하는 신속한 종양 흡수(주사로부터 4시간 후 7.6% 주사 용량/g)를 나타내었다. 주사로부터 7일후(168시간) 종양은 여전히 조직의 15.3% ID/g을 함유하였다. 종양:조직의 비율을 개개의 시간에 대해 계산하였고 이들을 도 4에 나타내었다. 주사로부터 24시간 후 종양:혈액 비율은 0.48이었고 7일에 3.16으로 증가하였다. 정상 조직에서의 이용은 낮고 아마도 그것은 조직 생검에서 혈액-플 백그라운드에 의해 유발되었을 것이다. ^{125}I -표지 BIWA-1을 갖는 누드 마우스에서 인체 SCC-외래이식편의 인 비보 타겟팅은 이 단클론 항체가 SCC 환자에서 진단 및 치료 용도의 타겟팅 비히클로서 높은 잠재능을 갖는다는 것을 나타낸다.

표 4.

주사후 다양한 시간대에 A-431-종양-수반 누드 마우스에서 ^{125}I -BIWA-1의 종양:조직 비율

~에 대한 종양의 비율	4h	24h	48h	120h	168h
혈액	0.22 ^a	0.48	1.31	2.60	3.16
꼬리	1.18	2.62	7.70	12.28	13.06
폐	0.40	1.03	2.65	7.04	4.82
간	0.94	1.18	2.28	3.57	3.24
지라	1.40	1.84	4.00	4.86	4.42
위	3.89	7.37	19.40	25.56	33.96
신장	0.82	1.31	2.72	2.79	2.53
소장	3.54	6.24	11.94	19.24	27.78

^a 평균값(n=3); SD는 <7%이다

실시예 5: 다수의 인체 종양에서의 CD44v6의 상이한 발현

더욱 광범위한 검사를 위하여, 단클론 항체 BIWA-1(클론 VFF-18)로 CD44v6 발현에 대하여 총 544개 종양 표본을 면역조직화학적으로 검사하였다. 표본들을 외과적 제거후 즉시 파라핀에 포매시키거나 액체 질소에서 동결시키고 필요할 때까지 -70°C에서 저장하였다. 하기 종양을 분석하였다: 기저세포암(n=16), 유방의 선암(n=55), 결장의 AC(n=83), 머리

및 목의 상피종(SCC)(n=125), 폐암(n=120), 전립선 AC(n=34), 신장 세포 암종(n=27), 피부의 SCC(n=15) 및 위의 AC(n=69). 통상적인 외과술 또는 생체해부에 의해 조직을 수득하였고 정상 조직을 종양 표본과 함께 수득하였다. 면역조직화학적 검사를 실시예 1과 같이 실시하였다.

표 5는 mAb BIWA-1을 이용한 397개의 상이한 타입의 종양의 면역조직화학적 분석의 요약을 나타낸다.

표 5.

인체 종양에서 CD44v6의 발현

타입		총 수	양성 케이스*	
			n	%
기저암세포	원발성 종양	16	10	62
유방 AC	원발성 종양	17	15	88
	림프절 전이	34	31	91
	간 전이	4	4	100
결장 AC	림프절 전이	51	21	41
	간 전이	26	13	50
	뇌 전이	6	6	100
후두 AC	림프절 전이	18	18	100
폐 AC	원발성 종양	35	15	43
폐 SCC	원발성 종양	9	9	100
식도 SCC	원발성 종양	20	20	100
전립선 AC	원발성 종양	16	5	31
	림프절 전이	18	0	0
RCC	원발성 종양	27	5	18
SCLC	원발성 종양	31	7	23
위 AC	원발성 종양	22	15	68
	림프절 전이	43	16	37
	간 전이	4	4	100
총 수		397		
*; 종양세포의 $\geq 10\%$ 이 양성				
AC: 선암; RCC: 신장 세포 암종				
SCLC: 소세포 폐암; SCC: 상피종				

소세포 폐암, 신장 세포 암종 및 전립선의 AC에서, 반응이 관찰되지 않거나 단지 약간의 반응만이 관찰되었다. 검사된 모든 다른 타입의 종양은 가변적인 정도로 CD44-v6-함유 이소형을 발현하였다. 다수의 유방 AC가 BIWA-1과 반응성을 나타내었고 시험된 SCC(후두, 폐 및 식도)가 100%의 모든 케이스에서 CD44v6를 발현하였다.

다양한 타입 및 분류의 185개의 부가적인 케이스를 BIWA-1과의 반응성에 대해 검사하였다. 이것들은 67 케이스의 원발성 SCC(후두, n=15; 구강, n=16; 구인두, n=3; 피부, n=15), 77개 표본의 림프절 전이(후두, n=12; 폐, n=27; 식도, n=11; 구강, n=6; 구인두, n=7; 하인두, n=10; 편도선, n=4), 및 3개 표본의 간 전이(식도)를 포함하였다. 표 6은 검사된 모든 SCC 표본의 면역조직화학적 분석을 요약한다.

표 6.

상피종에서 CD44v6의 발현

타입		총 수	음성		국소 양성		양성	
			n	%	n	%	n	%
하인두	LNM	10	0	0	0	0	10	100
구인두	PT	3	0	0	0	0	3	100
	LNM	7	0	0	0	0	7	100
후두	PT	15	0	0	0	0	15	100
	LNM	30	1	3	0	0	29	97
폐	PT	18	2	11	0	0	16	89
	LNM	27	0	0	1	4	26	96
식도	PT	20	0	0	1	5	19	95
	LNM	11	0	0	0	0	11	100
	LM	3	0	0	0	0	3	100
구강	PT	16	0	0	0	0	16	100
	LM	6	0	0	0	0	6	100
피부	PT	15	0	0	0	0	15	100
편도선	LNM	4	0	0	0	0	4	100
총 수		185						
국소 양성:<10%의 종양 세포가 양성; LNM: 림프절 전이; PT: 원발성 종양; LM: 간 전이								

D44v6 포함 이소형의 발현은 3개의 종양 표본을 제외한 모두에서 발견되었다(한 케이스의 후두, 2 케이스의 폐). 대다수의 표본은 단일 절편내 100%의 종양 세포에서 발현을 나타내었고, 그 염색은 종양 세포의 막에서 주로 농축되었다. 가장 균질적인 염색 양식은 후두, 식도 및 하인두의 암종에서 확인되었고, 절편내의 대다수의 종양 세포들은 동일한 염색 강도를 가졌다.

문헌

문헌[Altenschmidt U, Kahl R, Morits D, Schnierle BS, Gerstmayer B, Wels W, Groner B. Cytoplysis of tumor cells expressing the neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes. *Clinical Cancer Res.* 2: 1001-1008(1996).]

문헌[Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebedee S L, Persson M A A, Nara P L, Norrby E, Burton D R. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9339-9343(1992).]

문헌[Baum RP, Noujaim AA, Nanci A, Moebus V, Hertel A, Niesen A, Donnerstag B, Sykes T, Boniface G, Hor G. Clinical course of ovarian cancer patients under repeated stimulation of HAMA using MAb OC125 and B43.13. *Hybridoma* 12(5): 583-589(1993).]

문헌[Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 93:

7826-7831(1996).]

문헌[Breitz H B, Weiden P L, Vanderheyden J-L, Appelbaum J W, Bjorn M J, Fer
M F, Wolf S B, Ratcliff B A, Seiler C A, Foisie D C, Fisher D R, Schroff R W,
Fritzberg A R, Abrams P G. Clinical experience with rhenium-186-labeled
monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. *J.*
Nucl. Med. 33: 1099-1112(1992).]

문헌[Breitz H B, Durham J S, Fisher D R, Weiden P L, DeNardo G L, Goodgold H
M, Nelp W B. Pharmacokinetics and normal organ dosimetry following
intraperitoneal rhenium-186-labeled monoclonal antibody. *J. Nucl. Med.* 36:
745(1995).]

문헌[Brooks, L., Niedobitek, G., Agathangelou, A., Farrell, P.J. The
expression of variant CD44 in nasopharyngeal carcinoma is unrelated to
expression of LMP-1. *Am. J. Pathol.* 146(5): 1102-12(1995).]

문헌[Catty, D(Hrsg). *Antibodies Vols. Iund II*. IRL Press Oxford(1989).]

문헌[Catty, D., Raykundalia, C. ELISA and related immunoassays. In: Catty,

D(Ed.). *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford (1989), 97-152, see pages 105-109.]

문헌[Catty, D., Murphy, G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty, D(Ed.). *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford (1989), 77-96.]

문헌[Chatal J-F, Saccavini J-C, Gestein J-F, Thedrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibe D, Fumoleau P, Guillard Y. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 49: 3087-3094(1989).]

문헌[Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as singlechain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1066(1990)

문헌[Colcher D, Esteban J, Carrasquillo J A, Sugarbaker P, Reynolds J C, Bryant G, Larson S M, Schlom J. Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with

carcinoma. *Cancer Res.* 47: 4218-4224(1987).]

문헌[Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L, Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J. Immunol. Methods* 152: 89-104(1992).]

문헌[Featherstone C. Bispecific antibodies: the new magic bullets. *Lancet* 348: 536(1996).]

문헌[Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53: 334-339(1993).]

문헌[Gerretsen M, Visser GWM, Brakenhoff RH, van Walsum M, Snow GB, van Dongen GAMS. Complete ablation of small squamous cell carcinoma xenografts with ¹⁸⁶Relabeled monoclonal antibody E48. *Cell Biophysics* 24/25: 135-141(1994).]

문헌[Goodwin D A. A new approach to the problem of targeting specific monoclonal antibodies to human tumors using anti-hapten chimeric antibodies.

J. Nucl. Med. Biol. 16: 645(1989).]

문헌[Goodwin DA. Tumor pretargeting: almost the bottom line. *J. Nucl. Med.* 36(5): 876-879(1995).]

문헌[Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M.; Haubmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24(1991).]

문헌[Guesdon, J. I., Ternynck, T., Avrameas, S. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131 (1979).]

문헌[Gussow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* 203: 99-121(1991):]

문헌[Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T.A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233(1993).]

문헌[Heider, K.-H., Mulder, J.-W. R., Ostermann, E., Susani, S., Patzelt, E., Pals, S.T., Adolf, G.R. Splice variants of the cells surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. *Eur. J. Cancer* 31A: 2385-2391(1995).]

문헌[Heider K H, Ratschek M, Zatloukal K, Adolf G R. Expression of CD44 isoforms in human renal cell carcinomas. *Virchows Arch.* 428: 267-273(1996a).]

문헌[Heider KH, Sproll M, Susani S, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann E, Ahorn H, Adolf GR. Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.*: in press. 1996.]

문헌[Hemming AW, Davis NL, Finley RJ. Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma: an evaluation of an anti-EGFR monoclonal antibody-prophyrin conjugate. *Society of Surgical Oncology, 46th Annual Cancer Symposium*. March 18-21, 1993, Los Angeles, CA, p. 67]

문헌[Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich P., and

Gunthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 5292-5297(1991).]

문헌[Johnson, G. D. Immunofluorescence. In: Catty, D(Hrsg), *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford (1989), 179-200, s. S. 180-189.]

문헌[Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98(1991).]

문헌[Jurcic JG, Scheinberg DA. Recent Developments in the radioimmunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology* 6: 715-721(1994).]

문헌[Juweid M, Sharekey R M, Markowitz A, Behr T, Swayne L C, Dunn R, Hansen H J, Shevitz J, Leung S-O, Rubin A D, Herskovic T, Hanley D, Goldenberg D M. Treatment of Non-Hodgkins's lymphoma with radiolabeled murine, chimeric, or humanized LL2, an anti-CD22 monoclonal antibody. *Cancer Res. (Suppl.)* 55: 5899s-5907s(1995).]

문헌[Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548(1979).]

문헌[Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A, Reynolds J C, Foon K A et al. Immunolymphoscintigraphy and the dose dependence of ¹¹¹In-labeled T101 monoclonal antibody in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res.* 47: 6093-6099(1987).]

문헌[Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J. Immunother.* 15: 42-52(1994).]

문헌[Kohler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 265: 495(1975)]

문헌[Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904(1993).]

문헌[Kreitman R J, Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res.* 53: 819-825(1993).]

문헌[Larson S M, Cheung N-K V, Leibel S A. Radioisotope Conjugates. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Ed.). *Biologic therapy of cancer*. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 96-511(1991).]

문헌[Lenhard R E, Order S E, Spunberg J J, Asbell S O, Leibel S A. Isotopic immunoglobulin. A new systemic therapy for advanced Hodgkin's Disease. *J. Clin. Oncol.* 3: 1296-1300(1985).]

문헌[Maraveyas A, Myers M, Stafford N, Rowlinson-Busza G, Stewart J S W, Epenetos A A. Radiolabeled antibody combined with external radiotherapy for the treatment of head and neck cancer: Reconstruction of a theoretical phgantom of the larynx for radiation dose calculation to local tissues. *Cancer Res.* 55: 1020-1027(1995a).]

문헌[Maraveyas A, Stafford N, Rowlinson-Busza G, Stewart J S W, Epenetos A A. Pharmacokinetics, biodistribution, and dosimetry of specific and control radiolabeled monoclonal antibodies in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 55: 1060-1069(1995b)

문헌[Mulshine J L, Magnani J L, Linnoila R I: Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors. *In*: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Ed.). *Biologic therapy of cancer*. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 563-588(1991).]

문헌[Myklebust AT, Godal A, Juell S, Pharo A, Fodstad O. Comparison of two antibody based methods for elimination of breast cancer cells from human bone marrow. *Cancer Res.* 54: 209-214(1994).]

문헌[Nesbit M, Fu Z F, McDonald-Smith J, Steplewski Z, Curtis P J. Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system. *J. Immunol. Methods* 151: 201-208(1992).

문헌[Perkins A C, Pimm M V. A role for gamma scintigraphy in cancer

immunology and immunotherapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 19: 1054-1063(1992).]

문헌[Press O W, Eary J F, Badger C C, Martin P J, Appelbaum F R, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D. Treatment of refractory Non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody. *J. Clin. Oncol.* 9: 1027-1038(1989).]

문헌[Press O W, Eary J F, Appelbaum F R, Martin P J, Nelp W B Glenn S, Fisher D J, Porter B, Matthews D C Gooley T, Bernstein I D. Phase II trial of ¹³¹I-B1(anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas, *Lancet* 346: 336-340(1995).]

문헌[Quadri S M, Vriesendorp H, M, Leichner P K, Williams J R. Evaluation of indium-111 and yttrium-90 labeled linker immunoconjugates in nude mice and dogs. *J. Nucl. Med.* 34: 938-945(1993).]

문헌[Reisfeld RA, Gillies SD, Mendelsohn J, Varki NM, Becker JC. Involvement of B lymphocytes in the growth inhibition of human pulmonary melanoma metastases in athymic nu/nu mice by an antibody-lymphotoxin fusion protein.

Cancer res. 56: 1707-1712(1996).]

문헌[Riethmuller G, Schneider-Gadicke C, Schlimok G, Schmiegel W et al.
Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected
Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* 343: 1177-1183(1994).]

문헌[Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H., Jalkanen
S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man:
Downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular
origin. *J. Cell Biol.* 122: 431-442(1993).]

문헌[Sambrook, J., Fritsch E.E., Maniatis I., *Molecular cloning*. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).]

문헌[Schrapppe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppl G A, Markowitz D
D, Muller B M, Reisfeld R A. Long-term growth suppression of human glioma
xenografts by chemo-immunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxy
hydrazide and monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Res.* 52: 3838-3844(1992).]

문헌[Screaton, G.R., Bell, M. V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U. ,

and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12160-12164(1992).]

문헌[Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Hayry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet* 1982(1): 762-765(1982).]

문헌[Seiter, S., Arch R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., Zoller, M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* 177: 443-455(1993).]

문헌[Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellstrom K E, Hellstrom I. Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates. *Cancer Res.* 49: 5789-5792(1989).]

문헌[Shin S-U, Morrison S L. Production and properties of chimeric antibody molecules. *Methods Enzymol.* 178: 59-476(1989).]

문헌[Siccardi A G, Buraggi G L, Callegaro L, Colella A C, DeFilippi P G et al. Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled F(ab')₂ fragments of an anti-carcino-embryonic antigen monoclonal antibody: a multicenter study. *Cancer Res.* 49: 3095-31.3(1989).]

문헌[Smith, D.B., Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31(1988).]

문헌[Srivastava S C (Ed). Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy. *Life Sciences Series A 152*, Plenum New York (1988).]

문헌[Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.* 21: 1225-1229(1993).]

문헌[Theuer C P, Kreitman R J, FitzGerald D J, Pastan I. Immunotoxins made with a recombinant form of *pseudomonas* exotoxin A that do not require proteolysis for activity. *Cancer Res.* 53: 340-347(1993).]

문헌[Thomas, G. D., Dykes, P. W., Bradwell, A. R. Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling. In: Catty, D. (Ed.). *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford, 223-244(1989).]

문헌[Thompson C H, Stacker S A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T. Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer. *Lancet* **1984** (2): 1245-1247(1984).]

문헌[Vitetta E S, Thorpe P E. Immunotoxins. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Ed.) *Biologic therapy of cancer*. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482-495(1991)]

문헌[Vitetta E S, Stone M, Amolt P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, Ghetie V, Uhr J W, Thorpe P E. Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* **51**: 4052-4058(1991).]

문헌[Vriesendorp H M, Germack M A, Klein J L, Leichner P K, Loudenslager D, M, Order S E. Phase I-II studies of yttrium-labeled antiferritin treatment for end stage Hodgkin's disease, including Radiation Therapy Oncology Group 87-01, *J. Clin Oncol.* **9**: 918-928(1991).]

문헌[Vriesendorp H M, Morton J D, Quadri S M. Review of five consecutive studies of radiolabeled immunoglobulin therapy in Hodgkins's Disease. *Cancer Res. (Suppl.)* 55: 5888s-5892s(1995).]

문헌[Wang S-M, Chern J-W, Yeh M-Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R. Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res.* 52: 4484-4491(1992).]

문헌[Weiner L M, O'Dwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Kopnrad M S, Groves E S. Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. *Cancer Res.* 49: 4062-4067(1989).]

문헌[Wilbur, D. S., Hadley, S. W., Hylarides, M. D., Abrams, P. G., Beaumier, P. A., Morgan, A. C., Reno, J.M., Fritzberg, A.R. Development of a stable radioiodinating agent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer. *J. Nucl. Med.* 30: 216-226(1989).]

문헌[Winter, G., Griffith, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. Marking antibodies by phage display technology. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 433-455(1994).]

【서열목록】

(1) 일반 데이터

(i) 출원인:

(A) 명칭: 베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠바하

(B) 거리: 레인스트라쎄

(C) 도시: 인겔하임

(E) 국가: 독일연방공화국

(F) 우편번호: 55216

(G) 전화번호: +49-(0)-6132-772770

(H) 팩스: +49-(0)-6132-774377

(A) 명칭: 포르숨젠트럼 칼스루헤 게엠바하

(B) 거리: 포스트파크 3640

(C) 도시: 칼스루헤

(E) 국가: 독일연방공화국

(F) 우편번호: 76021

(A) 명칭: 하이더, 칼-하인쯔

(B) 거리: 헤르비큐스가쎄 4/3/21

(C) 도시: 비엔나

(E) 국가: 오스트리아

(F) 우편번호: 1120

(A) 명칭: 아돌프, 쿤터

(B) 거리: 스티프트가쎄 15-17/10

(C) 도시: 비엔나

(E) 국가: 오스트리아

(F) 우편번호: 1070

(A) 명칭: 오스테르만, 엘린보르그

(B) 거리: 마우에르바흐스트르. 56/6

(C) 도시: 비엔나

(E) 국가: 오스트리아

(F) 우편번호: 1140

(A) 명칭: 패트젤트, 에릭

(B) 거리: 한스-부흐플러-가쎄 8

(C) 도시: 퍼커스도르프

(E) 국가: 오스트리아

(F) 우편번호: 3002

(A) 명칭: 스프롤, 마르리에스

(B) 거리: 스텐크가췌 3

(C) 도시: 비엔나

(E) 국가: 오스트리아

(F) 우편번호: 1120

(ii) 발명의 명칭: 상피종의 진단 및 치료방법

(iii) 서열의 수: 16

(iv) 컴퓨터-판독 버전:

(A) 데이터 운반체: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환성

(C) 작동 시스템: PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어: 패턴트인 릴리스 #1.0, 버전 #1.30(EPO)

(2) 서열 번호: 1에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 129 염기쌍

(B) 성질: 뉴클레오티드

(C) 쇠 형태: 양형태

(D) 토폴로지: 양형태

(ii) 분자의 성질: 게놈 DNA

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: 엑손

(B) 위치: 1..129

(C) 기타 데이터:/산물="CD44"

/표지=v6

/노트="진뱅크 데이터 베이스 등록 No. L05411"

/인용=([1])

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 3..128

(x) 공개 정보:

(A) 저자: 스크레아톤, GR, 벨, MV, 잭슨, DG, 코넬리스, FB, 거스,
U, 벨, JI

(B) 명칭: 림프구 호밍 수용체 CD44를 지정하는 DNA의 게놈 구조는
적어도 12개의 선택적 스플라이스 엑손을 나타낸다.

(C) 잡지: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

(D) 볼륨: 89

(F) 페이지: 12160-12164

(G) 날짜: 1992-12월

(K) 서열 번호: 1의 중요 그룹: 1 내지 129

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE196 15 074.4

(I) 출원일: 1996 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 1:

```

TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG AAG 47
Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys
1           5           10           15

GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA ACA CCC 95
Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro
20           25           30

AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G 129
Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
35           40
  
```

(2) 서열 번호: 2에 관련된 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 42 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 단백질

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 2:

Gln	Ala	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Lys	Glu
1				5				10					15		
Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Arg	Trp	His	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Arg
			20					25					30		
Glu	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala						
			35				40								

(2) 서열 번호: 3에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특징:

- (A) 길이: 14 아미노산
- (B) 성질: 아미노산
- (C) 쇠 형태: 1본쇄
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 3:

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr

1 5 10

(2) 서열 번호: 4에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 27 염기쌍

(B) 성질: 뉴클레오티드

(C) 채 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 기타 핵산

(A) 기재: /desc = "PCR 프라이머"

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 4:

CAGGCTGGGA GCCAAATGAA GAAAATG

(2) 서열 번호: 5에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 성질: 뉴클레오티드

(C) 채 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 기타 핵산

(A) 기재: /desc = "PCR 프라이머"

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 5:

TGATAAGGAA CGATTGACAT TAGAGTTGGA

(2) 서열 번호: 6에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 11 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 6:

Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg

1 5 10

(2) 서열 번호: 7에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 43 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 7:

Gln	Ala	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Lys	Glu
1				5				10					15		
Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Arg	Trp	His	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Arg
			20					25					30		
Glu	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala					
			35				40								

(2) 서열 번호: 8에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 11 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 쇠 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 8:

Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys

1 5 10

(2) 서열 번호: 9에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 10 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 9:

Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp

1 5 10

(2) 서열 번호: 10에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 11 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 쇄 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 10:

Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn

1 5 10

(2) 서열 번호: 11에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 14 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 11:

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr

1 5 10

(2) 서열 번호: 12에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 11 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 12:

Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro

1 5 10

(2) 서열 번호: 13에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 11 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 13:

Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg Glu Asp Ser

1 5 10

(2) 서열 번호: 14에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 10 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 14:

Thr Pro Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Gly

1 5 10

(2) 서열 번호: 15에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 42 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 채 형태: 1본채

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 15:

Trp	Ala	Asp	Pro	Asn	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Lys	Glu
1				5				10					15		
Lys	Trp	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Asn	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser
			20				25						30		
Glu	Asp	Ser	His	Val	Thr	Glu	Gly	Thr	Thr						
			35				40								

(2) 서열 번호: 16에 관련한 데이터:

(i) 서열의 특성:

(A) 길이: 14 아미노산

(B) 성질: 아미노산

(C) 쇠 형태: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 성질: 펩티드

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 195 45 472.3

(I) 출원일: 1995. 12. 6.

(x) 공개 정보:

(H) 문서 번호: DE 196 15 074.4

(I) 출원일: 1996. 4. 17.

(x i) 서열 기재: 서열 번호: 16:

Lys	Trp	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				10					

(57) 청구의 범위

청구항 1.

유전자 CD44의 가변적 엑손 v6에 의해 코딩되는 아미노산 서열 WFGNRWHEGYR을 인지하는 항체를 포함하는 상피종의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 항체 분자가 기탁번호 DSM ACC2174의 하이브리도마 세포주에 의해 형성되는 단클론 항체 BIWA-1(VFF-18)임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 항체 분자가 단클론 항체, 면역글로불린의 Fab- 또는 F(ab')₂-단편, 재조합 방법에 의해 제조된 항체, 재조합 방법에 의해 제조된 키메라 또는 인체화 항체, 이관능성 또는 단일쇄 항체(scFv)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 항체 분자가 방사성 동위원소, 광활성 화합물, 방사성 화합물, 효소, 형광 염료, 바이오틴 분자, 독소, 세포성장억제제, 프로드러그, 상이한 특이성을 갖는 항체 분자, 사이토카인 또는 또다른 면역조절성 폴리펩티드에 연결되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5.

유전자 CD44의 가변적 엑손 v6에 의해 코딩되는 아미노산 서열 WFGNRWHEGYR을 인지하는 항체를 포함하는 상피종 치료제.

청구항 6.

유전자 CD44의 가변적 엑손 v6에 의해 코딩되는 아미노산 서열 WFGNRWHEGYR을 인지하는 항체 또는 기탁번호 DSM ACC2174의 하이브리도마 세포주에 의해 형성되는 단클론 항체 BIWA-1(VFF-18)을 이용하여 제 1항 또는 제 2항에 따른 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 항체 분자가 기탁번호 DSM ACC2174의 하이브리도마 세포주에 의해 형성되는 단클론 항체 BIWA-1(VFF-18)임을 특징으로 하는 치료제.

청구항 8.

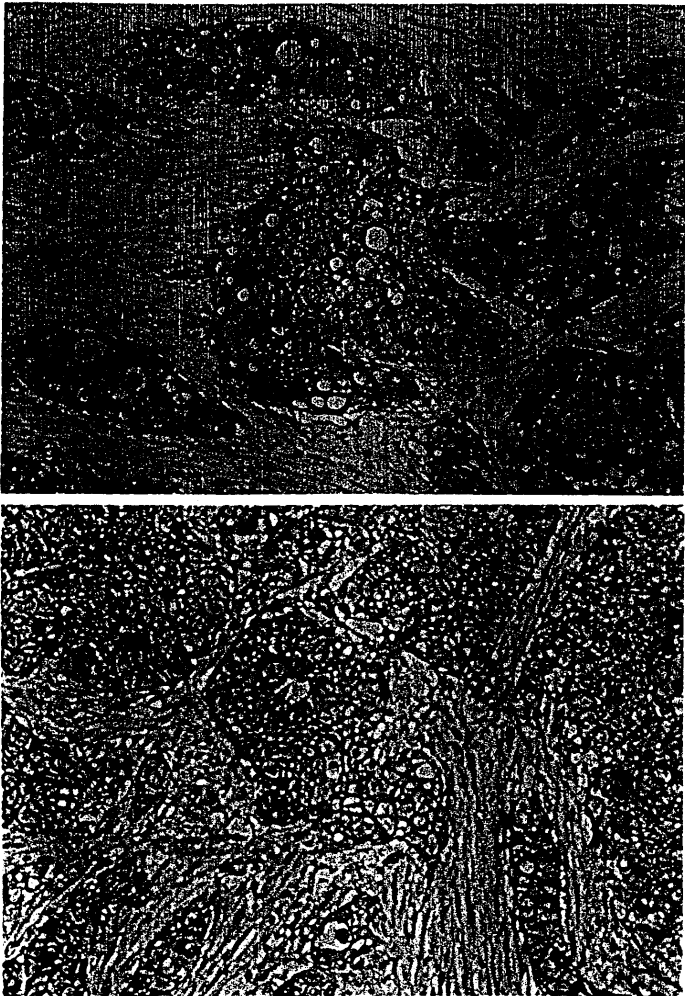
제 5 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 항체 분자가 단클론 항체, 면역글로불린의 Fab- 또는 F(ab')₂-단편, 재조합 방법에 의해 제조된 항체, 재조합 방법에 의해 제조된 키메라 또는 인체화 항체, 이관능성 또는 단일쇄 항체(scFv)인 것을 특징으로 하는 치료제.

도면

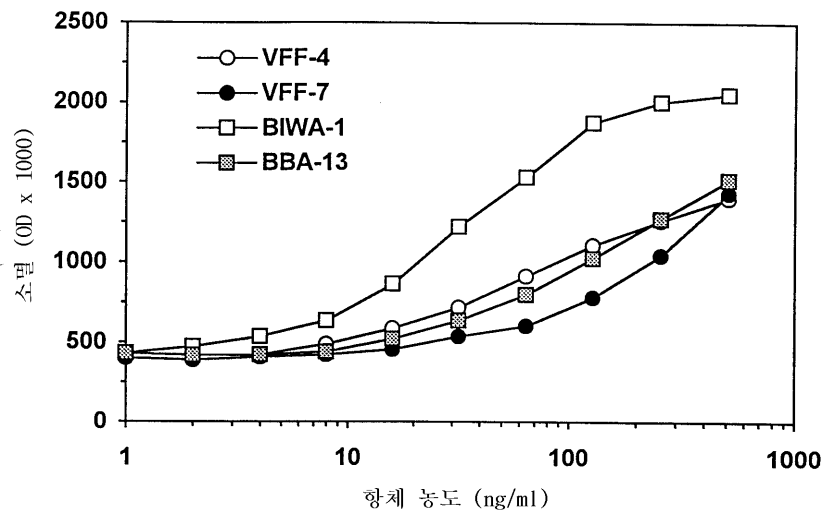
도면1

웹터드	서열	결합
인체:		
v6	QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTGTAA	
		BIWA-1
v6A	SSTTEETATQK	-
v6B	EETATQKEQW	-
v6C	TATQKEQWFGN	+/-
v6D	QWFGNRWHEGYRQT	+
v6E	NRWHEGYRQTP	-
v6F	EGYRQTPREDS	-
v6G	TPREDSHSTG	-
랫트:		
v6	WADPNSTTEEAATQKEKWFENEWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T	
		1.1ASML
	KWFENEWQGKNPPT	+

도면2



도면3



도면4

캡티드	서열
v6 (18-31)	QWF GNRWH EGYRQ T
v6 (18-29)	QWF GNRWH EGYR
v6 (19-30)	WF GNRWH EGYRQ
v6 (19-29)	<u>WF GNRWH EGYR</u>
v6 (19-28)	WF GNRWH EGY
v6 (20-29)	F GNRWH EGYR
v6 (21-29)	GNRWH EGYR
v6 (22-29)	NRWH EGYR
v6 (22-32)	NRWH EGYRQ TP
v6	IQATP SSTTE ETATQ KE <u>QWF GNRWH EGYRQ</u> TPRED SHSTT GTAAA

도면5

