



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0013870
(43) 공개일자 2015년02월05일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>C07K 16/32</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/335</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7035850(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 1998년12월10일
 심사청구일자 2015년01월16일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2013-7005286
 원출원일자(국제) 1998년12월10일
 심사청구일자 2013년03월29일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년12월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US1998/026266</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 1999/31140
 국제공개일자 1999년06월24일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/069,346 1997년12월12일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자
 샤크, 스티븐
 미국 94010 캘리포니아주 버링게임 캠브리지 로드
 1133
 패튼, 버지니아, 이.
 미국 94606 캘리포니아주 오우크랜드 하돈 로드
 510</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|---|--|

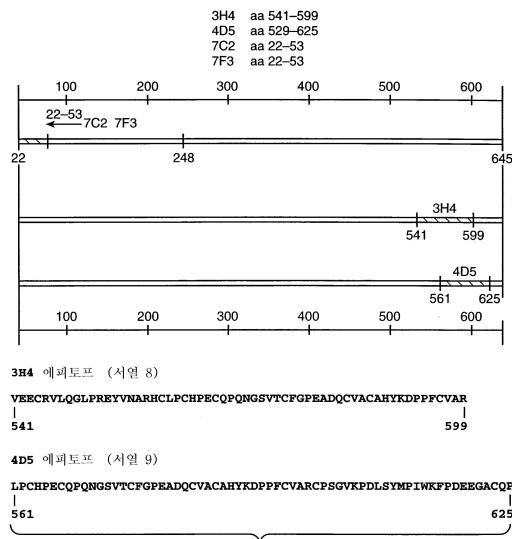
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 항-ErbB2 항체를 이용한 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환의 치료에 관한 것이다. 더 구체적으로는 ErbB2를 과다발현하는 암으로 진단된 사람 환자 또는 그러한 암이 의심되는 환자를 독소루비신 또는 에피루비신 등의 안트라사이클린 이외의 화학요법제와 항-ErbB2 항체를 병용하여 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

본원에 기재된 모든 인간에 대한 치료방법 및 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환의 치료에 관한 것이다. 더 구체적으로는 ErbB2를 과다발현하는 암으로 의심되거나 이 질환으로 진단된 사람 환자를 독소루비신 또는 에피루비신 등의 안트라사이클린 이외의 화학요법제와 항-ErbB2 항체의 조합으로 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 성장인자 및 성장인자 수용체를 코딩하는 원시발암유전자 (protooncogene)이 유방암을 비롯한 사람의 여러 악성 병태에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 상피 성장인자 수용체 (EGFR)와 관련된 185-kd 막형단 (transmembrane) 당단백질 수용체 (p185^{HER2})를 코딩하는 사람 ErbB2 유전자 (*erbB2*; *her2* 또는 *c-erbB-2*로도 알려짐)는 사람 유방암의 약 25 내지 30 %에서 과다발현되는 것으로 밝혀졌다 [Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987); 및 Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989)].

[0003] ErbB2 과다발현 종양의 병태 및 임상적 공격성에 있어서의 ErbB2의 직접적 역할을 뒷받침하는 여러 방면의 증거가 있다. ErbB2를 비신생물 세포로 도입하면 이들의 악성 형질전환이 유발되는 것으로 나타났다 (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7159-7163 (1987), DiFiore et al., Science 237: 78-182 (1987)). HER2를 발현하는 형질전환 (transgenic) 생쥐는 유선 종양이 발병하는 것으로 밝혀졌다 (Guy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10578-10582 (1992)).

[0004] 사람 *erbB2* 단백질 생성물 및 *erbB2* 유전자에 상응하는 쥐 유전자 (*neu*)에 의해 코딩되는 단백질에 대해 유도된 항체가 규명되어 있다. 문헌[Drebin et al., Cell 41:695-706 (1985)]는 쥐 *neu* 유전자 생성물에 대해 유도된 IgG2a 모노클로날 항체를 언급하였다. 7.16.4로 불리는 이 항체는 B104-1-1 세포(*neu* 원시발암유전자로 형질감염된 NIH-3T3 세포) 상의 세포 표면 p185 발현의 하향 조절(down-modulation)을 야기하고, 이들 세포의 콜로니 형성을 억제한다. 문헌[Drebin et al. PNAS (USA) 83:9129-9133 (1986)]에서, 7.16.4 항체는 누드(nude) 생쥐에 이식된 쥐 신경아세포종 세포 (이로부터 *neu* 발암유전자가 처음 단리됨) 뿐만 아니라 쥐 *neu* 형질전환된 NIH-3T3 세포의 종양형성 증식을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 문헌[Drebin et al., Oncogene 2:387-394 (1988)]에는 쥐 *neu* 유전자 생성물에 대한 일군의 항체 생성에 관해 기재되어 있다. 상기 모든 항체는 연결 아가에 현탁된 *neu* 형질전환된 세포의 증식에 대해 세포 정지 효과를 보이는 것으로 밝혀졌다. IgM, IgG2a 및 IgG2b 이소형 (isotype)의 항체는 보체의 존재 하에 *neu* 형질전환된 세포의 상당한 시험관내 용해를 매개할 수 있지만, 상기 항체 어느 것도 *neu* 형질전환된 세포의 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC)의 높은 수준을 매개할 수 없었다. 문헌[Drebin et al., Oncogene 2:273-277 (1988)]은 p185 분자 상의 2개의 상이한 영역과 반응성인 항체의 혼합물이 누드 생쥐에 이식된 *neu* 형질전환된 NIH-3T3 세포에 대해 시너지적 항종양 효과를 야기한다고 보고하였다. 항-*neu* 항체의 생물학적 효과는 문헌[Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290 (1991) 및 1994년 10월 13일 공개된 국제 특허 출원 공개 제W094/22478호]에 정리되어 있다.

[0005] 문헌[Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989)]에는 사람 유방암 세포주 SKBR3를 사용하여 특성화한 일군의 항-ErbB2 항체의 생성이 기재되어 있다. 상기 항체에 노출시킨 후 SKBR3 세포의 상대적 세포 증식은 72시간 후에 단일층의 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 측정하였다. 상기 분석을 사용하여 세포 증식을 56% 억제하는 4D5로 불리는 항체를 사용하여 최대 억제율을 얻었다. 7C2 및 7F3를 비롯하여 상기 군의 다른 항체는 상기 분석에서 보다 작은 정도로 세포 증식을 저하시켰다. 상기 문헌에서는 SKBR3 세포가 배지로부터 항체의 제거 후에 거의 정상 속도로 증식을 재개하기 때문에 4D5 항체의 SKBR3 세포에 대한 효과가 세포독성이라기 보다는 세포정지성이라고 결론지었다. 항체 4D5는 또한 p185^{erbB2} 과다발현 유방 종양 세포주를 TNF- α 의 세

포 독성 효과에 대해 감수성이 있는 것으로 만든다는 것이 밝혀졌다 (1989년 7월 27일 공개된 국제 특허 출원 공개 제W089/06692호 참조). 문헌[Hudziak et al.]에서 논의된 항-ErbB2 항체는 또한 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., *Chem.* 266:14300-5(1991); 및 D'Souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994)]에서 특징이 규명되어 있다.

[0006] 문헌 [Tagliabue et al., *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991)]에는 ErbB2를 과다발현하는 폐 선암 세포주 (Calu-3)에 대한 반응성을 기준으로 선택된 2개의 항체가 기재되었다. 이 항체들 중 MGR3으로 불리는 항체는 ErbB2를 내부화하여 ErbB2의 인산화를 유도하고 시험관내 종양 세포 증식을 억제한다.

[0007] 문헌 [McKenzie et al., *Oncogene* 4:543-548 (1989)]은 TA1로 명명된 항체를 포함하여 에피토프 특이성이 상이한 일군의 항-ErbB2 항체를 기재하고 있다. 이 TA1 항체는 ErbB2의 엔도사이토시스(endocytosis)의 촉진을 유도하는 것으로 밝혀졌다 (Maier et al., *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991) 참조). 문헌[Bacus et al. *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362(1990)]은 TA1 항체가 유방암 세포주 AU-565 (erbB2 유전자를 과다발현함) 및 MCF-7 (erbB2 유전자를 과다발현하지 않음)의 성숙을 유도한다고 보고하였다. 상기 세포에서의 성숙 표현형의 성장 및 수득의 억제는 세포 표면에서의 ErbB2 수용체의 개수 감소 및 세포질에서의 일시적인 개수 증가를 수반하는 것으로 밝혀졌다.

[0008] 문헌 [Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88:8691-8695 9(1991)]은 일군의 항-ErbB2 항체를 생성시켜 누드 생쥐에 복강내 주사하고 erbB2 유전자의 과다발현에 의해 형질전환된 쥐 섬유아세포의 종양 증식에 대한 상기 항체의 효과를 평가하였다. 4개의 항체에 대해서는 다양한 정도의 종양 억제가 검출되었지만, 항체 중의 하나 (N28)는 일관되게 종양 증식을 자극하였다. 모노클로날 항체 N28은 ErbB2 수용체의 상당한 인산화를 유도하였지만, 다른 4개의 항체는 일반적으로 낮은 인산화 유도 활성을 보이거나 전혀 보이지 않았다. 또한, SKBR3 세포의 증식에 대한 항-ErbB2 항체의 효과를 분석하였다. 상기 SKBR3 세포 증식 분석에서, 2개의 항체 (N12 및 N29)는 대조구에 비해 세포 증식의 저하를 야기하였다. 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및 항체 매개 세포 의존성 세포독성 (ADCC)를 통한 시험관내 세포 용해를 유도하는 여러 항체의 능력을 평가하고, 상기 문헌의 저자들은 항체의 억제 기능이 CDC 또는 ADCC 때문이 아니라고 결론지었다.

[0009] 문헌 [Bacus et al., *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992)]은 상기 문헌 [Bacus et al.(1990) 및 Stancovski et al.]에 기재된 항체를 특성화하였다. Stancovski 등의 복강내 연구를 확장하여, 사람 ErbB2를 과다발현하는 생쥐 섬유아세포를 보유하는 누드 생쥐 내로 정맥내 주사한 후 항체의 효과를 평가하였다. 그들의 이전 연구에서 관찰된 바와 같이, N28은 종양 증식을 촉진하지만, N12 및 N29는 ErbB2 발현 세포의 증식을 상당히 억제하였다. 또한, 부분적인 종양 억제가 N24 항체에서 관찰되었다. Bacus 등은 또한 MCF-7 (낮은 수준의 ErbB2 수용체 보유) 뿐만 아니라 사람 유방암 세포주 AU-565 및 MDA-MB453 (ErbB2를 과다발현)에서의 성숙 표현형을 촉진하는 항체의 능력을 시험하였다. Bacus 등은 체내 종양 억제와 세포 분화 사이의 관계를 파악하고, 종양 자극 항체 N28이 분화에 영향을 주지 않고, N12, N29 및 N24 항체의 종양 억제 작용은 상기 항체가 유도하는 분화의 정도와 밀접한 관련이 있다고 보고하였다.

[0010] 문헌 [Xu et al., *Int. J. Cancer* 53:401-408(1993)]은 일군의 항-ErbB2 항체의 에피토프 결합 특이성 뿐만 아니라 SKBR3 세포의 앵커리지 비의존성 및 앵커리지 의존성 증식을 억제하는 능력 (개개의 항체의 능력 및 항체의 조합에 의한 능력), 세포 표면 ErbB2를 조절하는 능력 및 리간드 자극 앵커리지 비의존성 성장을 억제하는 능력을 평가하였다 (항-ErbB2 항체 조합물에 대해서는 1994년 1월 6일 공개된 국제 특허 출원 공개 제 W094/00136호 및 Kasprzyk et al., *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992) 참조). 다른 항-ErbB2 항체는 문헌 [Hancock et al., *Cancer Res.* 5:4575-4580 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54:3578-3765 (1994) 및 Harwerth et al., *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992)]에서 논의되었다.

[0011] 재조합 인간화 항-ErbB2 모노클로날 항체 (쥐의 항-ErbB2 항체 4D5의 인간화된 형태, rhuMAb HER2 또는 헤르셉틴 (HERCEPTIN (등록상표)로 불림)는 ErbB2-과다발현 전이성 유방암 환자에게 항암 치료 전에 다량 투여하면, 임상적으로 활성이 있었다 (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)).

[0012] ErbB2 과다발현은 특히 엽액 림프절에 관련된 1차 질병 환자에게 있어서 흔히 나쁜 예후의 조짐으로서 여겨지며

(Slamon et al., (1987) 및 (1989), 앞의 책, Ravidin and Charness, Gene 159:19-27 (1995), Hynes and Stern, Biochem Biophys Acta 1198: 165-184 (1994)), CMF (시클로포스파미드, 메토티렉세이트 및 플루오로우라실) 및 안트라사이클린류를 포함하는 화학요법 및 호르몬요법에 대한 감수성 및(또는) 내성과 연관된 것으로 보고되었다 (Baselga et al., Oncology 11 (3 Suppl 1):43-48 (1997)). 그러나, ErbB2 과다발현과 나쁜 예후와의 관련성에도 불구하고, HER2-양성 환자가 탁산 치료에 대해 임상적으로 반응할 가능성은 HER2-음성 환자의 3 배 이상이었다 (같은 책). rhuMab HER2는 BT-474 사람 유방 선암종 세포를 주사한, HER2를 높은 수준으로 발현하는 누드 생쥐에게서 파클리탁셀 (등록상표명 탁솔 (Taxol)) 및 독소루비신의 유방암 이식편 억제 활성을 향상시키는 것으로 나타났다 (Baselga et al., Breast Cancer, Proceedings of ASCO, Vol. 13, Abstract 53 (1994)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환의 치료 방법에 관한 것이며, 항-ErbB2 항체를 이용한 치료가 화학요법제 사용의 임상적 이익을 일반적으로 향상시키지만 안트라사이클린 유도체의 부작용으로 관찰되는 심근 부전 증후군은 항-ErbB2 항체의 투여로 인해 오히려 증가한다는 인식에 기초해 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 따라서 본 발명은 안트라사이클린 유도체 이외의 화학요법제와 항-ErbB2 항체의 조합의 유효량을 안트라사이클린 유도체가 없는 상태에서 사람 환자에게 투여하는 것을 포함하는, ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환의 의심되거나 그러한 질환으로 진단된 사람 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 의하면, 안트라사이클린 유도체 이외의 화학요법제와 항-ErbB2 항체의 조합의 유효량을 투여함으로써 심근부전 증후군 부작용없이 질환을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 말단절단(truncation) 돌연변이체 분석 및 위치지정 돌연변이에 의해 결정된 ErbB2의 세포의 도메인의 에피토프 지도를 도시한 것이다 (Nakamura et al., J. of Virology 67(10):6179-6191 (1993년 10월); Renz et al., J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 (1994년 6월)). 항중식성 MAb 4D5 및 3H4는 막횡단 도메인에 인접하여 결합한다. 다양한 ErbB2-ECD 말단절단 또는 점 돌연변이체를 중합 효소 연쇄 반응 기술을 사용하여 cDNA로부터 제조하였다. ErbB2 돌연변이체는 포유동물 발현 플라스미드에서 gD 융합 단백질로서 발현되었다. 상기 발현 플라스미드는 삽입된 cDNA의 하류에 위치한 SV40 종결 및 폴리아데닐화 신호를 갖는 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서를 사용한다. 플라스미드 DNA를 사용하여 293S 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 1일 후에, 세포를 1% 투석된 태송아지 혈청 및 ³⁵S 메티오닌 및 ³⁵S 시스테인 각각 25 μCi씩 함유하는 메티오닌 및 시스테인 부재의 저 글루코스 DMEM 중에서 밤새 대사적으로 표지시켰다. 상층물을 수거하고, 이 상층물에 ErbB2 MAb 또는 대조구 항체를 첨가하여 4℃에서 2 내지 4시간 인큐베이션하였다. 복합체를 침전시키고 10 내지 20% 트리신 SDS 구배 겔에 적용하고 100 V에서 전기영동시켰다. 겔을 멤브레인 상에 전기 블로팅시키고 방사성사진술에 의해 분석하였다. 서열 8 및 9는 각기 3H4 및 4D5 에피토프를 나타낸다.

도 2는 ErbB2의 도메인 1의 아미노산 서열 (서열 1)을 밑줄과 함께 도시한 것이다. 굵은 글씨로 나타난 아미노산은 결실 맵핑(deletion mapping)에 의해 결정된 MAb 7C2 및 7F3에 의해 인식되는 에피토프, 즉 "7C2/7F3 에피토프" (서열 2)의 위치를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이런 질환은 바람직하게는, ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 양성 또는 악성 종양, 예를 들면 유방암, 관상 세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 신경교아종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 타액선암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음문암, 갑상선암, 간 암종 및 여러 형태의 두부 및 경부 암 등의 암이다. 화학요법제는 바람직하게는 탁솔 (등록상표) (파클리탁셀) 또는

탁술 (등록상표) 유도체 등의 탁소이드이다.

- [0019] 항-ErbB2 항체는 항증식 효과면 충분하긴 하지만, 바람직한 실시양태에서는 세포사멸 (cell death) 또는 세포자멸 (apoptosis)을 유도할 수 있다. 바람직한 항-ErbB2 항체는 ErbB2 수용체의 세포외 도메인에 결합하며, 바람직하게는 ErbB2 세포외 도메인 서열 내의 에피토프 4D5 또는 3H4에 결합한다. 더욱 바람직하게는 항-ErbB2 항체는 항체 4D5이며, 가장 바람직하게는 인간화된 형태의 항체이다.
- [0020] 본 발명의 방법은 특히 ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로하는 유방암 또는 난소암의 치료에 적합하다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면은 용기와, 이 용기 내의 항-ErbB2 항체를 포함하는 조성물과, 임의로는 이 조성물이 ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 상태의 치료를 위해 사용될 수 있음을 나타내는 용기 상의 또는 용기에 결합된 라벨과, 상기 조성물과 안트라사이클린형 화학요법제의 병용을 피하라는 지시사항을 담은 포장 삽입물을 포함하는 제조품에 관한 것이다.
- [0022] 1. 정의
- [0023] 용어 "HER2", "ErbB2", "c-Erb-B2"는 서로 바꿔 사용할 수 있다. 다른 언급이 없는 한, 용어 "ErbB2", "c-Erb-B2" 및 "HER2"는 ErbB2 단백질을 의미하고, "*erbB2*", "*c-erb-B2*" 및 "*her2*"는 사람 유전자를 의미한다. 사람 *erbB2* 유전자 및 ErbB2 단백질은 문헌[예를 들어 Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501] 및 Yamamoto et al., Nature 319:230-234(1986)]에 기재되어 있다 (Genebank 기탁 번호 X03363). ErbB2는 4개의 도메인 (도메인 1-4)으로 이루어진다.
- [0024] "에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프는 ErbB2의 막횡단 영역에 가깝다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해서, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차 차단 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 맵핑을 수행하여 (도 1 참조) 항체가 ErbB2 상의 4D5 에피토프(즉, ErbB2의 대략 잔기 529, 예를 들어 대략 잔기 561 내지 대략 잔기 625을 포함하는 영역 내의 하나 이상의 잔기)에 결합하는지를 평가할 수 있다.
- [0025] "에피토프 3H4"는 ErbB2의 세포외 도메인에서 항체 3H4가 결합하는 영역이다. 이 에피토프를 도 1에 나타냈다. 이 에피토프는 ErbB2 세포외 도메인의 아미노산 서열에서 약 541 내지 약 599까지의 잔기를 포함한다.
- [0026] "에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및(또는) 7F3 항체(각각 후술되는 바와 같이 ATCC에 기탁됨)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인의 N 말단에 위치한 영역이다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해서, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차 차단(cross-blocking) 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 맵핑을 수행하여 항체가 ErbB2 상의 7C2/7F3 에피토프(즉, ErbB2의 대략 잔기 22 내지 대략 잔기 53의 영역 내의 하나 이상의 잔기 (서열 2))에 결합하는지를 조사할 수 있다.
- [0027] 용어 "세포 사멸의 유도" 또는 "세포 사멸을 유도할 수 있는"이란 생존가능 세포를 비생존성으로 만드는 항체의 능력을 의미한다. 여기서 "세포"는 ErbB2 수용체를 발현하는 세포, 특히 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포이다. ErbB2를 "과다발현"하는 세포는 동일한 조직형의 비암세포에 비해 정상 수준보다 상당히 많은 양의 ErbB2를 갖는다. 바람직하게는, 세포는 암세포, 예를 들어 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광 세포이다. 시험관 내에서, 이 세포는 SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 시험관내 세포 사멸은 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)에 의해 유도되는 세포 사멸과 구별하기 위해 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 측정할 수 있다. 따라서, 세포 사멸 분석은 열 불활성화 혈청을 사용하여(즉, 보체의 부재 하에) 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 수행될 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해서, 요오드화프로피듐(PI), 트리판 블루 (Moore et al., Cytotechnology 17:1-11 (1995) 참조) 또는 7AAD (실시에 1 참조)의 흡수에 의해 평가되는 막 온전성의 상실을 비처리 세포에 비교하여 평가할 수 있다. 바람직한 세포 사멸 유도 항체는 "BT474 세포에서 PI 흡수 분석"에서 PI 흡수를 유도하는 항체이다.
- [0028] 문구 "세포사멸의 유도" 또는 "세포사멸을 유도할 수 있는"이란 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 파편화 및(또는) 막 비지클(세포자멸체로 칭함)의 형성에 의해 측정되는 계획된 세포 사멸 (programmed cell death)을 유도하는 항체의 능력을 의미한다. 여기서 세포는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세

포이다. 바람직하게는, "세포"는 종양 세포, 예컨대, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관 내에서는 상기 세포가 SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 세포자멸에 관련된 세포 반응을 평가하기 위해 다양한 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 포스파티딜 세린(PS) 위치전이는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고, DNA 단편화는 본원 실시예에 기재된 바와 같이 DNA 래더링(laddering)을 통하여 평가할 수 있고, DNA 단편화와 함께 핵/크로마틴 농축은 저2배체(hypodiploid) 세포의 증가에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포자멸을 유도하는 항체는 "BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석" (하기 참조)에서 미처리 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 더 잘 유도하는 항체이다.

[0029] 때때로, 세포자멸 유도 항체는 ErbB2/ErbB3 복합체 (예를 들어 7F3 항체)의 HRG 결합/활성화를 차단하는 것이다. 다른 환경에서, 항체는 HRG에 의한 ErbB2/ErbB3 수용체 복합체의 활성화를 그다지 차단하지 않는 항체 (예를 들어 7C2)이다. 또한, 항체는 세포자멸을 유도하지만 S기 세포의 비율을 크게 저하시키지 않는 7C2와 같은 항체(예를 들어 대조구에 비해 상기 세포의 비율을 단지 약 0 내지 10% 감소시키는 항체)일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 항체는 사람 ErbB2에 특이적으로 결합하고, erbB1, erbB3 및(또는) erbB4 유전자에 의해 코딩되는 단백질과 같은 다른 단백질과 그다지 잘 교차반응하지 않는 7C2와 같은 항체이다. 때때로, 항체는 문헌 [Schechter et al., Nature 312:513(1984) 및 Drebin et al., Nature 312:545-548(1984)]에 기재된 바와 같이 *neu* 단백질과 그다지 교차반응하지 않을 수 있다. 이러한 실시양태에서, 항체와 상기 단백질과의 결합 (예를 들어 내인성 수용체에 대한 세포 표면 결합)의 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성 면역 침전법 (RIA)에 의해 측정시에 약 10% 미만일 것이다.

[0031] "헤레글린 (HRG)"은 ErbB2-ErbB3 및 ErbB2-ErbB4 단백질 복합체를 활성화시키는(즉, 복합체에 부착하면 복합체 내의 티로신 잔기의 인산화를 유도하는) 폴리펩티드를 의미한다. 상기 용어에 포함되는 다양한 헤레글린 폴리펩티드는 문헌[Holmes et al., Science, 256:1205-1210(1992); WO92/20798; Wen et al., Mol. Cell. Biol., 14(3):1909-1919; 및 Marchionni et al., Nature, 362:312-318(1993)]에 기재되어 있다. 상기 용어는 천연 HRG 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편 및(또는 변이체), 예를 들어 그의 EGF 유사 도메인 단편 (예를 들어 HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄)를 포함한다.

[0032] "ErbB2-ErbB3 단백질 복합체" 및 "ErbB2-ErbB4 단백질 복합체"는 각각 ErbB2 수용체 및 ErbB3 수용체 또는 ErbB4 수용체의 올리고머에 비공유적으로 결합된다. 복합체는 이들 수용체 둘 모두를 발현하는 세포가 HRG에 노출될 때 복합체가 형성되고 문헌[Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994)]에 기재된 바와 같이 면역침전에 의해 단리되고 SDS-PAGE에 의해 분석될 수 있다.

[0033] "항체"(Ab) 및 "면역글로불린"(Ig)은 동일한 구조적 특성을 갖는 당단백질이다. 항체는 특이적인 항원에 결합 특이성을 보이지만, 면역글로불린은 항체 및 항원 특이성이 결합된 다른 항체 유사 분자를 모두 포함한다. 항체 유사 분자 종류의 폴리펩티드는 예를 들어 림프계에 의해 낮은 수준으로, 골수종 세포에 의해 증가된 수준으로 생성된다.

[0034] "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 일반적으로 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성되는 약 150,000 달톤의 헤테로테트라머의 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 디설피드 공유결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설피드 결합의 개수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 변한다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적 간격으로 사슬 내부의 디설피드 결합을 갖는다. 각각의 중쇄는 한 말단에 가변 도메인(V_H) 및 이 도메인에 후속하는 많은 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한 말단에 가변 도메인(V_L) 및 다른 말단에 불변 도메인을 갖고, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 한줄로 위치하고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 한줄로 위치한다. 특정 아미노산 잔기들이 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다.

[0035] 용어 "가변"은 항체들 간에 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 크게 상이하고 그 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인에서 보존도가 보다 높은 부분은 프레임워크 영역(FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결을 형성하며 어떤 경우에는 β -시트 구조의 일부를 이루는 3개의 CDR에 의해, 주로 β -시트의 입체형태인 프레임워크 영역 4개가 연결되어 이루어진다. 각 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 서로 매우 근접하게 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의

형성에 기여한다 (Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669 (1991) 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합시에 직접 관여하지 않지만, 항체 의존적 세포의 세포독성에서 항체의 참가와 같은 상이한 이펙터 기능을 보인다.

[0036] 항체를 파파인 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 항원 결합 부위를 하나씩 갖는 "Fab" 단편, 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하여 이를 붙여진 나머지 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신을 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 가지며 여전히 항원에 교차결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.

[0037] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하게 비공유결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이것은 각 가변 도메인의 CDR 3개가 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 한정하는 배열로 존재한다. 결론적으로 보면, 6개의 CDR이 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 하나의 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)의 경우에도 전체 결합 부위보다 친화성은 낮지만 항원을 인식하여 항원에 결합하는 능력을 갖는다.

[0038] 또한, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역에서 유래한 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기가 첨가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 의미한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 몇쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되었다.

[0039] 임의의 척추동물종으로부터 유래한 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 명백하게 상이한 종류 중의 하나로 분류될 수 있다.

[0040] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 주요 클래스가 존재하고, 이들 중 몇 개는 서브클래스(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다. 면역글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 잘 알려져 있다.

[0041] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 완전한 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 완전한 항체로부터 형성된 다특이성 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 요구되는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편을 포함한다.

[0042] "항체 단편"은 완전한 항체의 일부, 바람직하게는 완전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, $F(ab')$, $F(ab')_2$, 및 Fv 단편, 디아바디(diabody), 선형 항체 (Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)), 단일쇄 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 형성된 다특이성 항체 등이 있다.

[0043] 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 상동성인 항체의 군집으로부터 수득된 항체를 말한다. 즉 미량 존재할지 모르는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고는 군집을 구성하는 개개의 항체는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 유도된 것으로, 높은 특이성을 갖는다. 또한, 일반적으로 상이한 항원 결정자(에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 항원 결정자에 대해서만 유도된다. 특이성 외에, 모노클로날 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 유리하다. "모노클로날"이란 수식어는 실질적으로 상동성인 항체 군집으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내고, 어떤 특정 방법에 의해 항체 생성을 요구하는 것으로서 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 제조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 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 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0044] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라(chimera)" 항체(면역글로불린) 및 요구되는 생물학적 활성을 보이는 이 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제

4,816,567호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

- [0045] 비인간(예를 들어 쥐과) 항체의 "인간화" 형태는 키메라 면역글로불린, 즉, 비사람 면역글로불린으로부터 유래한 최소한의 서열을 포함하는 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 서열)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 사람 면역글로불린 (수용 항체)의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기가 필요한 특이성, 친화도 및 능력을 갖는, 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간중(공여 항체)의 CDR의 잔기로 대체된 사람 면역글로불린이다. 어떤 경우에는 사람 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR)이 대응하는 비사람 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열 중 어디에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이런 변형은 항체 성능을 더욱 세련화하고 극대화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비사람 면역글로불린의 CDR 영역에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역이 사람 면역글로불린 서열의 영역인 하나 이상, 일반적으로 2개의 가변 도메인 모두를 실질적으로 포함할 것이다. 또한, 인간화 항체는 적어도 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 사람 면역글로불린의 불변 영역의 일부를 포함할 것이다 (Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) 참조). 인간화 항체는 항체의 항원 결합 영역이 목적 항원으로 짧은꼬리원숭이를 면역시켜 생성된 항체로부터 유래된 PRIMATIZED(상표) 항체가 있다.
- [0046] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 중에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 필요한 구조를 형성하도록 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다(sFv에 관해서는 문헌 (Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 및 Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)) 참조).
- [0047] 용어 "디아바디 (diabody)"는 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H-V_L) 내의 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 도메인을 다른 사슬의 상보성 도메인과 강제로 페어링시켜 2개의 항원 결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097, W093/11611 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0048] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및(또는) 회수된 항체이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정시 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과인 항체로, 또는 (2) 스피닝 컵(spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산의 잔기 15개 이상을 획득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제될 것이다. 단리된 항체는 그 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 원위치에서의 항체이다. 그러나, 단리된 항체는 일반적으로 하나 이상의 정제 단계에 의해 정제될 것이다.
- [0049] 용어 "샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 체내 혈청 반감기를 증가시키는 기능을 수행하는 IgG 분자 (예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 의미한다.
- [0050] "치료"는 치료적 처리 및 예방적 또는 억제적 조치를 모두 의미한다. 치료를 필요로 하는 대상은 질환이 억제되어야 하는 대상 뿐만 아니라 이미 질환을 앓고 있는 대상을 포함한다.
- [0051] 치료를 위한 "포유동물"은 인간, 가축, 및 동물원, 경기용 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0052] "질환"은 항-ErbB2 항체를 사용한 치료에 의해 호전되는 모든 상태이다. 이것은 포유동물이 문제의 질환에 걸리게 하는 병태를 포함하여 만성 및 급성 질환 또는 질병을 포함한다. 본원에서 치료되는 질환의 예로는 양성 및 악성 종양, 백혈병 및 임파선 악성 질환, 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선, 마크로파지, 상피, 기질 및 포배강 질환, 및 염증성, 혈관형성 및 면역 질환이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] "치료적 유효량"이란 용어는 항증식 효과를 갖는 양을 지칭하는 데 사용된다. 바람직하게는 치료적 유효량이 세포자멸 활성을 갖거나 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 바람직하게는 양성 또는 악성 종양 세포, 특히 암 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 효능은 치료되는 상태에 따라 통상적인 방식으로 측정할 수 있다. 암 치료의 경우

효능 측정은 예를 들면 질병 진행 시간 (TTP) 평가 또는 반응률 (RR) 결정을 통해 이루어질 수 있다 (하기 실시예의 설명 참조).

[0054] 용어 "암" 및 "암성"은 미조절된 세포 증식이라는 전형적 특징을 갖는 포유동물의 생리 상태를 의미하거나 규정한다. 암의 예로는 암종, 임파종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 구체적인 예는 판상 세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 신경교아종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 타액선암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종 및 여러 종류의 두부 및 경부 암을 포함한다.

[0055] 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 저해하거나 억제하고(하거나) 세포를 파괴시키는 물질을 의미한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 I^{131} , I^{125} , Y^{90} 및 Re^{186}), 화학요법제 및 독소, 예를 들면 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성을 갖는 독소 또는 그의 단편을 포함하는 것을 의미한다.

[0056] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 이의 예는 아드리아마신 (독소루비신), 에피루비신, 5-플루오로우라실 (5-FU), 시토신 아라비노시드 ("Ara-C"), 시클로포스파미드 (상표명 CYTOXAN), 티오테파, 부술판, 탁소이드, 예를 들면 파클리탁셀 (등록상표명 탁솔, 미국 뉴저지주 프린스턴에 위치한 브리스틀마이어스스컵 온콜로지사 제품) 및 도세탁셀 (탁소테레 Taxotere, 프랑스 안토니에 위치한 롱플랑 로레아사 제품), 메토트렉세이트, 시스플라틴, 빈블라스틴, 블레오마이신, 에토포시드, 이포스파미드, 미토마이신 C, 미톡산트론, 빈크리스틴, 비노렐빈, 카르보플라틴, 테니포시드, 다우노마이신, 카르미노마이신, 아미노프테린, 탁티노마이신, 미토마이신, 에스페라미신 (미국 특허 제4,675,187호 참조), 멜팔란 및 다른 관련 질소 머스타드를 포함한다. 또한, 타목시펜 및 오프라리스톤과 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 호르몬 제제도 상기 화학요법제의 정의에 포함된다.

[0057] 화학요법제의 다른 예로는, 임프로술판 및 피포술판 등의 알킬 술폰산염류; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파 등의 아지리딘류; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올멜라민을 비롯한 에틸렌이민류 및 메틸아멜라민류; 클로람부실, 클로나파진, 콜로포스포라미드, 에스트라머스틴, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포라미드, 우라실 머스타드 등의 질소머스타드류; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라미무스틴 등의 니트로수레아류; 아클라시노마이신류, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 각티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르지노필린, 크로모마이신류, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 다우노루비신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신류, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신, 젠타미신 등의 항생제; 테넨테린, 프테롭테린, 트리메트렉세이트 등의 폴릭산 유사체; 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌 등의 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈 및 플록스우리딘 등의 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탈올, 메피티오스탈, 테스토라톤 등의 안드로겐류; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄 등의 항부신제 (anti-adrenals); 프롤린닉산 등의 폴릭산 보충물; 아세글락톤; 알도포라미드 글리코시드; 아미노레블리닉산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK (등록상표); 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테뉴아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미도락톨; 피포브로판; 가시토신; 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 백금; 나벨빈; 노반트론; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디클루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노익산; 카페시타빈; 및 이들 중 어느 하나의 제약상 허용가능한 염, 산 또는 유도체 등이 있다.

[0058] 종양에 대해 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 호르몬제의 다른 예로는 알록시펜 (Evista), 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜 및 LY117018 등의 항에스트로겐제 및 플루타미드 및 닐루타미드 등의 항안드로겐제 및 이들 중 어느 하나의 제약상 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 있다.

[0059] "증식 억제제"는 세포, 특히 ErbB2 과다발현 암세포의 시험관 내 또는 체내 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 ErbB2 과다발현 세포의 S기 비율을 크게 감소시키는 물질이다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 시기에서)차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제로는 빈카스 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔, 및 토포 II 억제

제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신 등이 있다. 또한, G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토크렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지에도 작용한다. 추가 정보는 문헌 [Murakami et al., *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" (WB Saunders: Philadelphia, 1995), Chapter 1, 특히 13면]에 기재되어 있다. 4D5 항체 (및 그의 기능적 등가물)도 상기 목적을 위해 사용할 수 있다.

[0060] "독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 완전한 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-리코-헥소피라노실)옥소]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0061] "사이토킨"은 하나의 세포 군집에 의해 방출되는, 세포간 매개체로서 다른 세포에 대해 작용하는 단백질의 일반 명칭이다. 이러한 사이토킨의 예는 임포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토킨에는 성장 호르몬, 예를 들어 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 펠락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 물레리안 억제 물질; 생쥐 고나도트로핀 연합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- β ; 혈소관 형성 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트르포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- α , - β 및 - γ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 마크로파지-CSF (M-CSF); 과립구-마크로파지-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터루킨(IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- α 및 TNF- β ; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 비롯한 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 사이토킨은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0062] 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 대한 세포독성이 작고 효소에 의해 활성화되거나 보다 활성인 모 형태로 전환될 수 있는 제약상 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 의미한다 (예를 들어 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 전구약물은 인산염 함유 전구약물, 티오포스페이트 함유 전구약물, 황산염 함유 전구약물, 펩티드 함유 전구약물, D-아미노산 변형 전구약물, 글리코실화 전구약물, β -락탐 함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드 함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드 함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 바와 같은 화학요법제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0063] "고상 (solid phase)"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비수성 매트릭스를 의미한다. 고상의 예는 부분적으로 또는 완전하게 유리 (예를 들어 세공 조절된 유리), 폴리사카라이드 (예를 들어 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘을 포함한다. 특정 실시양태에서, 내용에 따라 고상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 즉, 고상은 정제 컬럼 (예를 들어 친화도 크로마토그래피 컬럼)이다. 이 용어는 또한 미국 특허 제4,275,149호에 기재된 것과 같은 별개 입자의 비연속적 고상을 포함한다.

[0064] "리포솜"은 약물 (예를 들어 항-ErbB2 항체, 및 임의로 화학요법제)의 포유동물로의 전달에 유용한 다양한 형태의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 구성되는 작은 비지름이다. 리포솜의 성분은 통상 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 형성으로 배열된다.

[0065] "포장 삽입물"이란, 치료용 제품의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 지시사항으로서, 이러한 치료용 제품의 사용과 관련한 징후, 사용법, 투여량, 투여방법, 금기 및(또는) 경고에 관한 정보를 담고 있다.

[0066] II. 항-ErbB2 항체의 제조

[0067] 아래에는 본 발명에 따라 사용되는 항체의 생산을 위한 예시적인 기술에 관하여 설명한다. 항체 생산에 사용되는 ErbB2 항원은 예를 들면, 원하는 에피토프를 포함하는 ErbB2 세포의 도메인의 가용성 형태 또는 그의 일부일

수 있다. 별법으로, 세포 표면에 ErbB2를 발현하는 세포 (예를 들면, ErbB2를 과다발현하도록 형질전환된 NIH-3T3 세포 또는 SKBR3 세포와 같은 암종 세포주 {문헌[Stancovski et al., PNAS (USA) 88: 8691-8695 (1991)] 참조})를 사용하여 항체를 생산할 수 있다. 항체를 생산하기에 유용한 ErbB2의 다른 형태는 당업계의 기술자에게 명백할 것이다.

[0068]

(i) 폴리클로날 항체

[0069]

폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 보조제를 피하(sc) 또는 복강내(ip)로 여러번 주사하여 동물 내에서 유발시킨다. 그 관련 항원을, 면역시키고자 하는 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키홀 삿갓조개 (keyhole limpet) 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 타이로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제에, 이관능성 작용제 또는 유도화제, 예를 들면, 말레이미도벤조일 술포숙신아미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통해 결합), N-히드록시숙신아미드 (라이신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기에서, R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)를 사용하여 결합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0070]

동물을 예를 들면, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 결합물 (각각 토끼와 생쥐에 대해)을 3 부피의 프로인드 (Freund's) 완전 보조제와 혼합하고, 이 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 결합물 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후에, 동물을 원래의 양의 1/5 내지 1/10의 프로인드 완전 보조제 중의 펩티드 또는 결합물로 다수 부위에 피하 주사함으로써 재면역시켰다. 7 내지 14일 후, 동물을 출혈시키고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석하였다. 역가가 정체 (plateau)될 때까지 동물을 재면역시킨다. 바람직하게는, 동일한 항원을 상이한 단백질에, 및(또는) 상이한 가교결합제를 통해 결합시킨 결합물로 동물을 재면역화한다. 결합물은 또한 단백질 용합체로서 재조합 세포 배양을 통해 제조할 수 있다. 또한, 명반(alum)과 같은 응집제를 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.

[0071]

(ii) 모노클로날 항체

[0072]

모노클로날 항체는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 얻으며, 즉, 집단을 이루는 개별적인 항체들은 소량 존재할 수 있는 가능한 자연 변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형 "모노클로날"은 별개의 항체들의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 지시한다.

[0073]

예를 들면, 모노클로날 항체는 문헌[코흘러 (Kohler) 등, Nature, 256: 495 (1975)]에서 처음 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)을 이용하여 제조할 수 있다.

[0074]

하이브리도마 방법에서, 면역화를 위해 사용된 단백질에 충분히 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 백혈구를 유도하도록 생쥐, 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 동물을 상기한 바와 같이 면역화시킨다. 별법으로, 백혈구를 시험관 내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 백혈구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합제를 사용하여 골수종 세포와 용합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 [고딩 (Goding), Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].

[0075]

이렇게 제조한 하이브리도마 세포를 바람직하게는 비융합 골수종 모세포의 성장 또는 생존을 억제시키는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배지 중에 접종하고 배양시킨다. 예를 들면, 골수종 모세포가 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우, 하이브리도마용 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이며, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제시킨다.

[0076]

바람직한 골수종 세포는 효율적으로 용합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 높은 수준의 안정적인 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 이들 중, 바람직한 골수종 세포주는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11, 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 매릴랜드주 록빌)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것과 같은 쥐 골수종 세포주이다. 사람 골수종 세포주 및 생쥐-사람 헤테로골수종 세포주가 또한 사람 모노클로날 항체의 생산에 대해 기술되었다 [코즈보르 (Kozbor), J. Immunol., 133: 3001 (1984); 및 브로듀어 (Brodeur) 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

[0077]

하이브리도마 세포가 성장하는 배지를 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석하였다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침강법에 의해, 또는 방사성면

역분석법 (RIA) 또는 효소 결합 면역 흡수 분석법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석에 의해 측정하였다.

- [0078] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들면, 먼슨 (Munson) 등 [Anal. Biochem., 107: 220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 측정할 수 있다.
- [0079] 원하는 특이성, 친화도 및(또는) 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝시키고 표준 방법 [고딩, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]으로 배양시켰다. 이러한 목적에 적합한 배지는 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수종양으로서 생체내 배양시킬 수 있다.
- [0080] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들면, 단백질 A-세파로즈 (Sepharose), 히드록시아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 절차에 의해 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리시킨다.
- [0081] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차 (예를 들면, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써)를 이용하여 쉽게 분리되고 서열결정된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 기원으로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 이어서, 그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜리(E. coli) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성시킨다. 항체를 코딩하는 DNA의 세균에서의 재조합 발현에 대한 리뷰 문헌은 문헌 [스케라 (Skerra) 등, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993); 및 플뤼턴 (Plueckthun), Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0082] 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 문헌[맥카퍼티 (McCafferty) 등, Nature, 348: 551-554 (1990)]에 기술된 기법을 이용하여 생산된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌[클락슨 (Clackson) 등, Nature, 352: 624-628 (1991) 및 막스 (Marks) 등, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)]에서는 파지 라이브러리를 사용하는 쥐 및 사람 항체의 단리를 각각 기술하였다. 이후의 문헌에서는 체인 셔플링(chain shuffling)에 의한 고친화도(nM 범위)의 사람 항체의 생산 [막스 등, Bio/Technology 10: 779-783 (1992)] 뿐만 아니라, 매우 큰 파지 라이브러리의 제조 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 [워터하우스 (Waterhouse) 등, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)]을 기술하였다. 따라서, 이들 기법은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기법과 병용가능한 방법이다.
- [0083] DNA는 또한 예를 들면, 동종 쥐 서열 대신 사람 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 문헌[모리슨 (Morrison) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)]), 또는 비면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수 있다.
- [0084] 전형적으로 그러한 비면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나, 항체의 한 항체-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어 항원에 특이성을 갖는 하나의 항체-결합 부위 및 상이한 항원에 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.
- [0085] (iii) 인간화 항체 및 사람 항체
- [0086] 비사람 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비사람 기원으로 부터의 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비사람 아미노산 잔기는 종종 "임포트(import)" 잔기로 부르며, 전형적으로 "임포트" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 사람 항체의 상응하는 서열 대신 설치류 CDRs 또는 CDR 서열로 치환함으로써 본질적으로 윈터 (Winter) 등의 방법 [존스 (Jones) 등, Nature, 321: 522-525 (1986); 리치만 (Riechmann) 등, Nature, 332: 323-327 (1988); 베르호옌 (Verhoeven) 등, Science, 239: 1534-1536 (1988)]에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 실질적으로 보다 적은 무순상 사람 가변 도메인이 비사람 종으로부터 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기를 설치류 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기로 치환시킨 사람 항체이다.
- [0087] 인간화 항체를 제조하기 위해 사용되는 사람 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 도메인 모두)의 선택은 항원성을 감소시키기 위해 매우 중요하다. 소위 "베스트핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지의 사람 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 사람 서열을 인간화 항체를 위한 사람 프레임워크(FR)로서 수용한다 [심스 (Sims) 등, J. Immunol, 151: 2296

(1993); 코티아 (Chothia) 등, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)]. 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 사람 항체의 인식 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 몇종의 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 [카터 (Carter) 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); 프레스타 (Presta) 등, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)].

[0088]

항원에 대한 높은 친화도와 다른 양호한 생물학적 특성을 보유하면서 항체를 인간화시키는 것이 또한 중요하다. 이러한 목적을 이루기 위해, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하는 모서열과 다양한 구상되는 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하고, 당업계의 기술자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 배위 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이를 점검하면 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기들의 유망한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 끼치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 원하는 항체 특성을 성취하도록, 수여자 및 임포트 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 결합시킬 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 끼치는데 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여된다.

[0089]

별법으로, 지금은 내인성 면역글로불린 생산의 부재하에 면역시 사람 항체의 완전한 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 생쥐)을 제조할 수 있다. 예를 들면, 키메라 및 생식세포주 돌연변이 생쥐에서 항체의 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동질적으로 삭제시키면 내인성 항체 생산의 완전히 억제시키는 것이 기술되었다. 사람 생식세포주 면역글로불린 유전자 배열을 그러한 생식세포주 돌연변이 생쥐에 전달시키면 항원 켈린지시 사람 항체를 생산할 것이다. 예를 들면, 문헌[제이코보비츠 (Jakobovits) 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); 제이코보비츠 등, *Nature*, 362: 255-258 (1993); 브루거만 (Bruggermann) 등, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)] 참조. 사람 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수 있다 [후겐봄 (Hoogenboom) 등, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); 막스 등, *J. Mol. Bio.*, 222: 581-597 (1991)].

[0090]

(iv) 항체 단편

[0091]

항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기법이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 단백질의 단백질 분해성 소화에 의해 유래되었다 (예를 들면, 문헌[모리모토 (Morimoto) 등, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) 및 브렌난 (Brennan) 등, *Science*, 229: 81 (1985)]을 참조). 그러나, 이들 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리시킬 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이콜리로부터 직접 회수하고 화학적으로 결합시켜 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 [카터 (Carter) 등, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)]. 다른 방법에 따라, $F(ab')_2$ 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리시킬 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기법은 숙련된 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. 국제 특허 공개 제WO 93/16185호 참조.

[0092]

(v) 이중특이적 항체

[0093]

이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 ErbB2 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들면, 하나의 아암은 7C2/7F3 에피토프와 같은 ErbB2의 도메인 1에서의 에피토프에 결합할 수 있고, 다른 하나의 아암은 상이한 ErbB2 에피토프, 예를 들면, 4D5 에피토프에 결합할 수 있다. 그러한 다른 항체는 ErbB2 결합 부위를 EGFR, ErbB3 및(또는) ErbB4에 대한 결합 부위(들)에 결합시킬 수 있다. 별법으로, 항-ErbB2 아암은 T-세포 수용체 분자와 같은 백혈구 상의 트리거링 분자 (예를 들면, CD2 또는 CD3), 또는 $Fc \gamma RI$ (CD64), $Fc \gamma RII$ (CD32) 및 $Fc \gamma RIII$ (CD16)와 같은 IgG ($Fc \gamma R$)에 대한 Fc 수용체에 결합하는 아암과 결합시킬 수 있다. 이중특이적 항체는 ErbB2를 발현하는 세포에 세포독성제를 배치시키기 위해 사용할 수 있다. 이들 항체는 ErbB2-결합 아암 및 세포독성제 (예를 들면, 사포린, 항-인터페론- α , 빙카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토틱세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)과 결합하는 아암을 갖는다. 이중특이적 항체는 완전한 길이의 항체 또는 항체 단편 (예를 들면, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로서 제조할 수 있다.

[0094]

이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 완전한 길이의 이중특이적 항체의 전통적인 제법은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하며, 여기에서, 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 [밀스타인 (Millstein) 등, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 구분으로 인해, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하며, 이중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계로 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소

번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 국제 특허 공개 제WO 93/08829호 및 문헌[트라우너커 (Traunecker) 등, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다.

[0095] 다른 방법에 따라, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체의 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2의 적어도 일부 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합물의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물, 및 원하는 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터에 삽입하고, 적당한 숙주 유기체로 동시형질감염시킨다. 이렇게 하면 제작에 사용된 비동등한 비율의 3개의 폴리펩티드 사슬이 최적의 수율을 제공하는 경우 실시예에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 우수한 융통성을 제공한다. 그러나, 동등한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현이 높은 수율을 제공하는 경우 또는 비율이 특히 중요하지 않은 경우, 2개 또는 3개의 모든 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터 내에 삽입하는 것도 가능하다.

[0096] 이 방법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 아암에서 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄와 다른 아암에서 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 단지 1/2에서의 면역글로불린 경쇄가 손쉬운 분리 방식을 제공하므로, 이러한 비대칭 구조가 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이 방법은 국제 특허 공개 제WO 94/04690호에 기술되어 있다. 이중특이적 항체를 생산하기 위한 보다 상세한 내용은 예를 들면, 문헌[수레쉬(Suresh) 등, Methods in Enzymology, 121: 210(1986)] 참조.

[0097] 국제 특허 공개 제WO 96/27011호에 기재된 다른 방법에 따라, 한 쌍의 항체 분자들 사이의 계면을 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 헤테로다이머의 백분율을 최대화하도록 유전공학적으로 처리할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예를 들면, 티로신 또는 트립토판)으로 치환시킨다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄 (예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환시킴으로써 제2 항체의 계면 상에 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보충적인 "공간"이 생성된다. 이렇게 하여 호모다이머와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물 보다 헤테로다이머의 수율을 증가시키는 기전을 제공한다.

[0098] 이중특이적 항체는 가교결합된 또는 "헤테로결합" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로결합물 내의 항체 중 하나는 아미딘과 결합되고, 다른 하나는 비오틴과 결합될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들면, 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (국제 특허 공개 제WO 91/00360호, 동 제WO 92/200373호, 및 유럽특허 제EP03089호) 제안되었다. 헤테로결합 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합제는 당업계에 공지되어 있고, 많은 가교결합 기법과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 기술되어 있다.

[0099] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 제조하는 기법은 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조할 수 있다. 문헌[브렌난(Brennan) 등, Science, 229: 81 (1985)]에서는 F(ab')₂ 단편을 제조하기 위해 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단시키는 절차를 기술하였다. 이들 단편은 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원되어 인근(vicinal) 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸아민으로 환원시킴으로써 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 제제로서 사용할 수 있다.

[0100] 최근의 진보로 이. 콜리로부터 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수가 용이해졌고, 이는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 결합될 수 있다. 문헌[샬라비(Shalaby) 등, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에서는 완전한 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기술하였다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜리로부터 개별적으로 분비되고, 시험관 내에서 화학 결합시켜 이중특이적 항체를 형성한다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 사람 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 사람 유방암 표적에 대해 사람 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발시킨다.

[0101] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리시키는 다양한 기법이 또한 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 류신 지퍼(zipper)를 사용하여 생산되었다 [코스텔나이(Kostelny) 등, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에

의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 호모다имер을 한지 영역에서 환원시켜 모노머를 형성한 다음, 재산화시켜 항체 헤테로다имер을 형성하였다. 이 방법은 또한 항체 호모다имер의 생산에 이용될 수 있다. 문헌[홀링저(Hollinger) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기술되어 있는 "디아바다" 기법에서는 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적인 기전을 제공하였다. 단편은 동일 사슬 상의 2개의 도메인 사이를 짝지우기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 짝을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위를 형성하게 된다. 단일 사슬 Fv (sFv)를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 다른 방법이 또한 보고되었다 (문헌[그루버(Gruber) 등, J. Immunol., 152: 5368 (1994)] 참조).

[0102] 2 이상의 역가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 [투스(Tutt) 등, J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0103] (vi) 원하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝

[0104] 항체를 생산하는 기법은 상기에 기술하였다. 상기한 특징을 갖는 이들 항체를 선별한다.

[0105] 세포 사멸을 유도하는 항체를 선별하기 위해, 예를 들면, PI, 트리판 블루 또는 7AAD 흡수에 의해 지시되는 막 자체의 손실을 대조구에 비해 평가하였다. 바람직한 평가는 "BT474 세포를 사용한 PI 흡수 분석"이다. 이 분석에 따라, BT474 세포 (이는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, 매릴랜드주 록빌))으로부터 입수할 수 있음)를 10% 열불활성화 FBS (Hyclone) 및 2mM L-글루타민을 보충한 둘베코 개질 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; D-MEM):Ham's F-12 (50:50)에서 배양시킨다. (따라서, 분석은 보체 및 면역 작동기(effector) 세포의 부재하에 수행한다.) BT474 세포를 100×20 mm의 접시에 접시당 3×10⁶의 밀도로 접종하고 밤새 부착시킨다. 이어서, 배지를 제거하고, 신선한 배지만 또는 10μg/ml의 적절한 MAb를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 배양시킨다. 각각의 처리 후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신 분해 (trypsinization)에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 4°C에서 12000rpm으로 4분 동안 원심분리시키고, 펠렛을 3ml의 빙냉 Ca²⁺ 결합 완충액 (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)에 재현탁시키고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35mm 여과기 캐핑된 12×75 시험관 (시험관당 1ml, 처리군당 3개의 시험관)에 분취하였다. 이어서, 시험관에 PI (10μg/ml)을 넣었다. FACSCAN™ 유동 세포 계산기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 측정할 때 통계학적으로 유의한 수준으로 세포를 사멸시키는 항체를 선별하였다.

[0106] 세포사멸을 유발하는 항체를 선별하기 위해, 하기 실시예 2에 기술한 바와 같은 "BT474 세포를 사용하는 아넥신 결합 분석"이 이용가능하다. 앞서 단락에서 기술한 바와 같이 BT474 세포를 배양하고 접시에 접종시켰다. 이어서, 배지를 제거하고, 신선한 배지만 또는 10μg/ml의 MAb를 함유하는 배지로 교체한다. 3일간의 배양 기간 이후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신분해에 의해 탈착시켰다. 이어서, 상기 논의한 바와 같이 세포 사멸 분석을 위해 세포를 원심분리시키고, Ca²⁺ 결합 완충액에 재현탁시키고, 시험관에 분취하였다. 이어서, 시험관에 표지된 아넥신 (예를 들면, 아넥신 V-FTIC) (1μg/ml)을 넣었다. FACSCAN™ 유동 세포 계산기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. 대조구에 비해 통계학적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 세포사멸 유도 항체로서 선별하였다.

[0107] 앞서 단락에서 논의한 아넥신 결합 분석 이외에, "BT474 세포를 사용하는 DNA 염색 분석"이 이용가능하다. 이 분석을 수행하기 위해, 앞서의 두 단락에 기술한 바와 같이 관심있는 항체로 처리한 BT474 세포를 9μg/ml의 HOECHST 33342™을 사용하여 37°C에서 2시간 동안 배양시킨 다음, MODFITLT™ 소프트웨어 (Verity Software House)를 사용하여 EPICS ELITE™ 유동 세포 계산기 (Coulter Corporation) 상에서 분석하였다. 비처리 세포 (100% 이하의 자멸 세포) 보다 2배 이상 (바람직하게는 3배 이상)으로 세포사멸 세포의 비율을 변화시키는 항체를 이 분석을 이용한 세포사멸 유도 항체로서 선별할 수 있다.

[0108] 관심있는 항체에 의해 결합된 ErbB2 상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 에드 할로우(Ed Harlow) 및 데이빗 레인(David Lane) (1988)]에 기술된 것과 같은 보통의 교차 차단 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 실시예 2에 기술된 에피토프 맵핑을 수행할 수 있다.

[0109] 세포 배양물에서 SKBR3 세포의 성장을 50-100% 억제하는 항-ErbB2 항체를 동정하기 위해, 국제 특허 공개 제WO 89/06692호에 기재된 SKBR3 분석을 수행할 수 있다. 이 분석에 따라, SKBR3 세포를 10% 태아 송아지 혈청, 글

루타민 및 페니실린 스트렙토마이신을 보충한 F12 및 DMEM 배지의 1:1 혼합물 중에서 배양시켰다. SKBR3 세포를 35mm 세포 배양 접시 내에 20,000 세포로 플레이팅시켰다 (2ml/35mm 접시). 1 접시당 2.5µg/ml의 항-ErbB2 항체를 첨가하였다. 6일 후, 비처리 세포에 대한 세포의 수를 전자적 COULTER™ 세포 계수기를 사용하여 계수하였다. SKBR3 세포의 성장을 50-100% 억제하는 항체가 원하는 바의 세포사멸 항체와 함께 선별된다.

[0110]

(vii) 이펙터 기능 유전공학적 처리

[0111]

예를 들면, 암을 치료하는 데 있어서 항체의 유효성을 증가시키기 위해, 작동기 기능에 대해 본 발명의 항체를 개질시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)을 Fc 영역에 도입하여, 이 영역에서 쇠간 디설피드 결합 형성을 허용할 수 있다. 이렇게 생산된 호모다имер 항체는 증진된 내부이행(internalization) 능력 및(또는) 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포독성(ADCC)를 가질 수 있다. 문헌[카론(Caron) 등, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992); 및 쇼페스, 비. (Shopes, B.) J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)] 참조. 문헌[울프(Wolff) 등, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같이 헤테로이관능성 가교결합기를 사용하여 증진된 항종양 활성을 갖는 호모다имер 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 유전공학적으로 처리할 수 있고, 이에 의해 보체 용해 및 ADCC 능력을 증진시킬 수 있다. 문헌[스테벤슨(Stevenson) 등, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)] 참조.

[0112]

(viii) 면역결합물

[0113]

본 발명은 또한 화학요법제, 독소(예를 들면, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (예를 들면, 방사성결합물)에 결합된 본원에 기술한 항체를 포함하는 면역결합물에 관한 것이다.

[0114]

그러한 면역결합물의 생산에 유용한 화학요법제는 상기 기술하였다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모텍신 A 사슬, 알파-사르신, 알루라이즈 포르디 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 파이놀라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*saponaria officinalis*) 억제제, 켈로린, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노미신, 에노미신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성결합된 항-ErbB2 항체를 생산하기 위해 다양한 방사성뉴클레오타이드가 이용가능하다. 그 예로는 ²¹¹Bi, ¹³¹I, ⁹⁰Y 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다.

[0115]

항체 및 세포독성제의 결합은 다양한 2기능성 단백질 결합제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피메이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르 알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어 비스(p-아지도벤조일)핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄 벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098(1987)]에 기재된 바에 따라 제조될 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)는 방사성 뉴클레오타이드를 항체에 결합시키기 위한 킬레이팅제의 예이다 (예를 들어 W094/11026 참조).

[0116]

다른 실시양태에서, 항체는 중앙 예비 표적화에 사용하기 위한 "수용체" (예를 들어 스트렙타비딘)에 결합될 수 있고, 항체-수용체 결합체는 환자에게 투여된 후 정화제를 사용하여 비결합된 결합체를 순환물로부터 제거하고 이어서 세포독성제(예를 들어 방사성 뉴클레오타이드)에 결합된 "리간드"(예를 들어 아비딘)이 투여된다.

[0117]

(ix) 면역리포솜

[0118]

항-ErbB2 항체는 또한 면역리포솜으로서 제조될 수도 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 공지된 방법에 의해 제조된다 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 및 미국 특허 제4,485,045호 및 4,544,545호]. 순환 시간이 증강된 리포솜은 미국 특허 제5,013,556호에 기재되어 있다.

[0119]

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)를 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 한정된 세공 크기를 갖는 필터를 통하여 압출하여 목적 직경을 갖는 리포솜을 생성시킨다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설피드 교환 반응을 통하여

문헌[Martin et al., Biol. Chem. 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 결합될 수 있다. 화학요법제(예를 들어 독소루비신)은 리포솜 내에 임의로 함유된다 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989) 참조].

[0120]

(x) 항체 의존적 효소 매개 전구약물 요법 (ADEPT)

[0121]

본 발명의 항체는 또한 전구약물(예를 들어 펩티드 화학요법제, W081/01145 참조)을 활성 함암 약물로 전환시키는 전구약물 활성화 효소에 항체를 결합시킴으로써 ADEPT에 사용될 수 있다 (예를 들어 W088/07378 및 미국 특허 제4,975,278호 참조).

[0122]

ADEPT에 유용한 면역결합체의 효소 성분은 전구약물을 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 대해 작용할 수 있는 효소를 포함한다.

[0123]

본 발명의 방법에 유용한 효소는 인산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리 포스파타제; 황산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리 아릴술파타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항암제인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카베신 (예를 들어 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닌카르복시펩티다제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물 분해 효소, 예를 들어 β -갈라토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β -락타마제; 및 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 아민 질소에서 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아마이드, 예를 들어 페니실린 V 아마이드 또는 페니실린 G 아마이드를 포함하고, 이에 제한되지 않는다. 별법으로, 당업계에 "아브짐(abzyme)"으로도 알려진 효소 활성을 갖는 항체를 사용하여 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시킬 수 있다 (예를 들어 Massey, Nature 328:457-458(1987) 참조). 항체-아브짐 결합체는 아브짐의 중앙 세포 군집으로의 전달에 대해서 본원에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0124]

본 발명의 효소는 상기 논의한 헤테로 2기능성 가교결합체의 사용과 같은 당업계에 공지된 기술에 의해 항-ErbB2 항체에 공유결합될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다 (예를 들어 Neuberger et al., Nature, 312:604-608(1984) 참조).

[0125]

(xi) 항체-셀비지 수용체 결합 에피토프 융합

[0126]

본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어 중앙 투과를 증가시키기 위해서 완전한 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우, 항체 단편은 그의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 변형되는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 예를 들어 셀비지 수용체 결합 에피토프를 항체 단편에 (예를 들어 항체 단편의 적절한 영역의 변이에 의해 또는 예를 들어 DNA 또는 펩티드 합성에 의해 항체 단편의 말단 또는 중앙에 융합되는 펩티드 태그에 에피토프를 도입함으로써) 도입함으로써 달성될 수 있다.

[0127]

체내 반감기가 증가된 상기 항체 변이체를 제조하는 체계적인 방법은 몇단계로 이루어진다. 제1 단계는 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프에 결합하는 셀비지 수용체의 서열 및 배열을 동정하는 단계를 수반한다. 에피토프가 동정된 후에 목적 항체의 서열은 동정된 결합 에피토프의 서열 및 배열을 포함하도록 변형된다. 서열이 변이된 후에, 항체 변이체는 본래의 항체보다 긴 체내 반감기를 갖는지를 확인하기 위해 시험된다. 항체 변이체가 시험시에 보다 긴 체내 반감기를 갖지 않으면, 그 서열은 동정된 결합 에피토프의 서열 및 배열을 포함하도록 추가로 변형된다. 변형된 항체는 보다 긴 체내 반감기에 대해 시험되고, 이 과정은 보다 긴 체내 반감기를 보이는 분자가 수득될 때까지 계속된다.

[0128]

이와 같이 목적 항체에 도입된 셀비지 수용체 결합 에피토프는 상기 정의된 바와 같은 적합한 에피토프이고, 그의 특성은 변형된 항체의 종류에 따라 결정될 것이다. 이전은 목적 항체가 계속 생물학적 활성을 갖도록 제조된다.

[0129]

에피토프는 Fc 도메인의 하나 또는 두개의 루프로부터의 1 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사 위치로 이전된 영역을 구성하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, Fc 도메인의 하나 또는 두개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 이전된다. 보다 더 바람직하게는, 에피토프는 Fc 영역(예를 들어 IgG의)의 CH2 도메인으로부터 선발되어 항체의 CH1, CH3 또는 V_H 영역, 또는 하나 이상의 상기 영역으로 이전된다. 별법으로, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 선발되어 항체 단편의 C_L 영역 또는 V_L 영역, 또는 두 영역 모두로 이전된다.

- [0130] 가장 바람직한 한 실시양태에서, 셀비지 수용체 결합 에피토프는 서열 (5'에서 3'으로) PKNSSMISNTP (서열 3)를 포함하고, 임의로 HQSLGTQ (서열 4), HQNLSDGK (서열 5), HQNISDGK (서열 6) 및 VISSHLGQ (서열 7)로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 추가로 포함하고, 특히 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')₂이다. 가장 바람직한 다른 실시양태에서, 셀비지 수용체 결합 에피토프는 서열(들) (5'에서 3'으로) HQNLSDGK (서열 5), HQNISDGK (서열 6) 또는 VISSHLGQ (서열 7) 및 서열 PKNSSMISNTP (서열 3)를 함유하는 폴리펩티드이다.
- [0131] (ix) 항-ErbB2 항체의 정제
- [0132] 제조할 기술을 사용할 때, 항체는 세포내에서, 세포질 주변(periplasm) 공간에서 생산될 수 있거나 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 파쇄 입자, 숙주 세포 또는 용균 단편이 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜리의 세포질 주변 공간에 분비된 항체를 단리하는 방법이 기재되어 있다. 세포 페이스트는 아세트산나트륨(pH3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동된다. 세포 파쇄물은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우에는, 상기 발현 시스템으로부터의 상층물은 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축하는 것이 바람직하다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질을 분해할 위험을 억제하기 위해 상기 단계에 포함될 수 있고, 항생도제는 외래 오염물의 성장을 억제하기 위해 포함될 수 있다.
- [0133] 세포로부터 제조되는 항체 조성물은 예를 들어 히드록실아파티드 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피, 바람직하게는 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A는 사람 γ 1, γ 2 또는 γ 4 중쇄를 기재로 한 항체의 정제에 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 생쥐 이소형 및 사람 γ 3을 위해 추천된다 (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). 친화도 리간드가 결합되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 사용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스는 세공 조절된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 사용하여 달성할 수 있는 것 보다 신속한 유속 및 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함하는 경우에는, Bakerbond ABX 수지(등록상표) (J.T. Baker, 미국 뉴저지주 Phillipsburg 소재)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온 교환 컬럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE(등록상표) 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를 들어 폴리아스파르산 컬럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 회수되는 항체에 따라 사용가능하다.
- [0134] 예비 정제 단계(들) 후에, 목적 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 약 2.5 내지 4.5의 pH의 용출 완충액을 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 저 pH 소수성 크로마토그래피에 적용할 수 있다.
- [0135] C. 제약 제제
- [0136] 항체의 치료 제제는 목적 순도를 갖는 항체를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 함께 혼합함으로써 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조되어 보관된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 적합한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 복용자에게 비독성이고, 완충액, 예를 들어 인산염, 시트레이트 및 기타 유기산 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하여 일당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체 (예를 들어 Zn-단백질 착체); 및(또는) 비이온계 계면활성제, 예를 들어 TWEEN(등록상표), PLURONICS (등록상표) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)를 포함한다.
- [0137] 또한, 제제는 치료되는 특정 증상에 필요한 1 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 해로운 영향을 주지 않는 보완적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 한 제제 내에 EGFR, ErbB2 (예를 들어 ErbB2 상의

상이한 에피토프에 결합하는 항체), ErbB3, ErbB4 또는 혈관 내피 인자 (VEGF)에 결합하는 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로 조성물은 세포 독성제, 사이토킨 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 상기 분자는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 조합하여 존재하는 것이 적합하다.

[0138] 또한, 활성 성분은 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전 중에서 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 제조된 마이크로캡슐에 봉입될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0139] 체내 투여에 사용되는 제제는 멸균처리되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.

[0140] 서방성 제제도 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT (등록상표) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 마이크로스피어), 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 보다 단기간 동안 단백질을 방출시킨다. 캡슐화된 항체가 장시간 동안 유지될 때, 이들 항체는 37°C에서 수분에 대한 노출의 결과로서 변성되거나 응집될 수 있고, 이것은 생물학적 활성의 상실 및 면역원성의 변화 가능성을 야기한다. 관련 메카니즘에 따라서 안정화를 위해 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 교환을 통한 분자내 S-S 결합의 형성으로 밝혀지면, 안정화는 술포히드릴 잔기를 개질시키고, 산성 용액으로부터 동결건조시키고 수함량을 조절하고, 적절한 첨가제를 사용하고, 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성할 수 있다.

[0141] **IV. 항-ErbB2 항체를 이용한 치료 방법**

[0142] 본 발명의 항-ErbB2 항체는 ErbB2 수용체의 과다발현 및(또는) 활성화라는 특징을 갖는 질환을 포함하여 상이한 질환의 치료에 사용될 수 있다. 항-ErbB2 항체로 치료되는 질환 또는 질병의 예는 양성 또는 악성 종양 (예를 들어 간, 신장, 방광, 유방, 위장, 난소, 직장결장, 전립선, 췌장, 폐, 음부, 갑상선, 간 암종; 육종; 신경교아세포종; 및 상이한 종류의 두부 및 목암); 백혈병 및 임파성 악성 종양; 다른 질환, 예를 들어 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선, 매크로파지, 상피, 기질 및 포배강 질환, 및 염증성, 혈관형성 및 면역학적 질환을 포함한다.

[0143] 본 발명의 항체는 포유동물, 바람직하게는 인간에게 공지의 방법, 예를 들어 볼러스로서 정맥내 투여에 의해, 일정 시간에 걸친 연속 주입에 의해, 또는 근내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 수강(髓腔)내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여된다. 항체의 정맥내 투여가 바람직하다.

[0144] 다른 치료법을 본 발명의 항-ErbB2 항체의 투여와 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시되는 항체로 치료되는 환자는 방사선 치료법을 받을 수도 있다. 별법으로, 또는 추가로 화학치료제를 환자에게 투여할 수 있다. 상기 화학치료제의 제조 및 투여 계획은 제조자의 지시에 따라 또는 처방의의 결정에 따라 사용할 수 있다. 또한, 상기 화학치료제의 제조 및 투여 계획은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, William & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다. 화학치료제는 항체 투여 전 또는 후에, 또는 항체와 동시에 투여될 수 있다. 항체는 투여량이 공지된 항-에스테로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜 또는 항-프로게스테론, 예를 들어 오나프리스톤 (EP 616812 참조)과 조합될 수 있다.

[0145] 또한, 다른 종양 관련 항원에 대한 항체, 예를 들어 EGFR, ErbB3, ErbB4 또는 혈관 내피 인자 (VEGF)에 결합하는 항체를 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로 2 이상의 항-ErbB2 항체가 환자에게 동시에 투여될 수 있다. 때때로, 1 이상의 사이토킨을 환자에게 투여하는 것이 유리할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 성장 억제제와 함께 동시투여된다. 예를 들어, 성장 억제제가 먼저 투여된 후, 항-ErbB2 항체가 투여될 수 있다. 그러나, 동시 투여 또는 항-ErbB2 항체의 선투여도 가능하다. 성장 억제제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 양이고 성장 억제제와 항-ErbB2 항체의 조합 작용 (시너지)에 의해 저하될 수 있다.

[0146] 질병의 억제 또는 치료를 위해, 항체의 적합한 투여량은 상기한 바와 같은 치료되는 질병의 종류, 질병의 심도

및 경과에 따라 결정되고, 항체는 예방 또는 치료 목적, 사전 치료, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 처방 의사의 판단에 따라 투여된다. 항체는 한번에 또는 일정 치료 기간에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다.

[0147] 질병의 종류 및 증세에 따라, 항체 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 15 mg/kg (즉, 0.1 내지 20 mg/kg)이 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에 투여되는 초기 가능 투여량이다. 일반적인 1일 투여량은 상기 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 질환에 따라 치료는 질병의 증상이 목적 수준으로 억제될 때까지 유지된다. 그러나, 다른 투여 요법도 유용할 수 있다. 상기 치료법의 진행은 통상의 기술 및 분석법에 의해 용이하게 모니터링할 수 있다.

[0148] **V. 제조품**

[0149] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 질환의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 제조될 수 있다. 용기는 질환 치료에 유효한 조성물을 보유하고 멸균 출입구를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥내 투여 용액 백 또는 피하주사 바늘이 침투가능한 스톱퍼를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 활성 물질은 항-ErbB2 항체이다. 용기 상의 또는 용기에 부착된 라벨은 조성물이 대상 질환의 치료에 사용된다는 것을 나타낸다. 제품은 추가로 제약상 허용되는 완충액, 예를 들어 인산염 완충 염수, Ringer 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 사용 지침서와 함께 다른 완충액, 희석제, 여과기, 바늘, 시린지 및 패키지 삽입물을 포함하여 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0150] **미생물 기탁**

[0151] 다음과 같은 하이브리도마 세포주를 미국 메릴랜드주 록빌 파크론 드라이브 12301 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC)에 기탁하였다.

[0152] 항체 이름 ATCC 번호 기탁일

[0153] 7C2 ATCC HB-12215 1996년 10월 17일

[0154] 7F3 ATCC HB-12216 1996년 10월 17일

[0155] 4D5 ATCC CRL 10463 1990년 5월 24일

[0156] 하기 실시예는 본 발명을 단지 예시하고자 한 것으로, 본 발명을 제한하지 않는다.

[0157] [실시예]

[0158] **재료 및 방법**

[0159] <항-ErbB2 모노클로날 항체>

[0160] ErbB2의 세포외 도메인에 특이적인 항-ErbB2 IgG₁ κ 쥐 모노클로날 항체 4D5 및 7C2를 문헌[Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990) 및 W089/06692]에 기재된 바와 같이 생산하였다. 문헌 [Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159 (1987)]에 기재된 바와 같이 생산한 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 세포 (약 1 x 10⁵ ErbB2 분자/세포를 발현함)를 25 mM EDTA 함유 인산염 완충 염수(PBS)를 사용하여 수거한 후 이를 사용하여 BALB/c 생쥐를 면역처리하였다. 0, 2, 5 및 7주에서 생쥐에게 0.5 ml PBS 중의 10⁷ 세포를 복강내 주사하였다. ³²P 표지된 ErbB2를 면역침전시키는 항혈청을 갖는 생쥐에게 9 및 13주에서 밀 배 아글루티닌-세파로스 (WGA) 정제된 ErbB2 멤브레인 추출물을 복강내 주사하였다. 이어서, ErbB2 제제 0.1 ml을 정맥내 주사하고, 비장세포를 생쥐 골수종 세포주 X63-Ag8.653과 융합시켰다. ELISA 및 방사성 면역 침전에 의해 하이브리도마 상층물을 ErbB2 결합에 대해 스크리닝하였다. MOPC-21 (IgG1) (미국 노쓰캐롤라이나주 더햄 소재의 Cappel)을 이소형 매치 대조구로서 사용하였다.

[0161] 쥐 4D5 항체의 인간화형 (등록상표명 헤르셉틴)를 써서 치료를 수행했다. 이 인간화 항체는 쥐 4D5 항체의 상보성 결정 영역을 컨센서스 사람 면역글로블린 IgG₁ (IgG₁)의 프레임워크로 삽입하여 제조한 것이다 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 (1992)). 생성된 인간화 항-ErbB2 모노클로날 항체는 p185^{HER2}에 대한 친화성이 높고 (딜로히에이션 상수 [K_d] = 0.1 nmo1/L), 시험관 내에서 및 사람 이중이식편에서

고농도의 p185^{HER2}를 함유하는 유방암 세포의 증식을 뚜렷하게 억제하며, 항체 의존적 세포 독성 (ADCC)를 유도하며, 이전에 광범위한 치료를 받은 바 있는 ErbB2를 과다발현하는 전이성 유방암 환자에게서 단일 작용제로서 임상적 활성을 띠는 것으로 밝혀졌다. 헤르셉틴 (등록상표)은 이 항체를 배양 배지로 분비하는 유전자조작된 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포를 대규모 증식시켜 제조했다. 이 항체를 표준적 크로마토그래피법 및 여과 방법을 사용하여 CHO 배양 배지로부터 정제했다. 이 연구에 사용된 각 항체를 분석하여, 그 정체, 순도, 효능 및 미국 식품의약국 (FDA)의 멸균 및 안전성 요건에 충족하는가를 확인했다.

[0162] <적격성 기준>

[0163] 연구 승인을 위해 환자들은 다음의 모든 기준에 만족해야 했다.

[0164] - 전이성 유방암

[0165] - ErbB2 (HER2) 발암유전자의 과다발현 (면역조직화학 또는 형광 원위치내 (in-situ) 혼성화 (FISH)에 의해 측정했을 때 2+ 내지 3+). (ErbB2의 중앙 발현은 상기한 바와 같은 환자의 파라핀 집적 중앙 조각으로부터 제조된 박편들을 면역조직화학적 분석 (Slamon et al., (1987) 및 (1989), 앞의 책)하여 측정할 수 있다. 사용된 1차 검출 항체는 쥐 4D5 MAb이며, 이는 치료에 사용되는 인간화 항체와 동일한 CDR을 갖는다. 만일 중앙 세포의 25 % 이상이 p185^{HER2}에 특징적인 막 염색을 드러내면 그 중앙은 ErbB2를 과다발현하는 것으로 간주된다).

[0166] - 방사선사진술, 신체 검사 또는 사진에 의해 2차원적으로 측정할 수 있는 질병 (예컨대, 용해성 골 병변)

[0167] 측정가능한 질병이란 신체 검사, X-선 (평면 필름), 컴퓨터 X-선 단층촬영 (CT), 자기공명영상 (MRI), 초음파 또는 사진에 의해 2개의 수직 지름으로 재현가능하게 측정될 수 있는 임의의 덩어리로 정의된다.

[0168] 골아세포 전이, 흉방삼출액, 또는 복수증은 측정가능한 것으로 생각되지 않았다. 측정가능한 병변은 최대 직경이 적어도 1 cm 이상이어야 한다. 평가가능한 부위 (예, 폐)에서 전이성 질병의 평가가능한 부위 및 병변의 수를 세는 것은 적절한 케이스 리포트 형식 (CRF)에 기록되어야 한다. 많은 수의 폐 또는 간 병변이 존재했을 경우, 부위 마다 6 개의 최대 병변이 뒤따랐다.

[0169] - 고지에 입각한 동의서를 이해하는 능력과 서명하고자 하는 의사

[0170] - 18세 이상의 여성

[0171] - 혈액, 신장, 간 및 대사 기능의 실험 평가 결과를 살펴봄으로써 검증되는, 동시 세포독성 화학요법을 받기에 적절한 후보자

[0172] <배제 기준>

[0173] 다음 중 어느 하나에라도 해당하는 환자는 연구 시작시 배제되었다.

[0174] - 전이성 유방암 환자를 위한 사전 세포독성 화학요법 받음

[0175] 환자는 전이성 질병을 위한 사전 호르몬 요법 (예를 들면, 타목시펜) 또는 보조제 설정된 세포독성 요법을 받을 수 있다.

[0176] - 치유될 수 있도록 치료받지 못한 부수적 악성 질병 있음

[0177] - 카르노프스키 스케일을 기준으로 60 % 미만의 동작 상태

[0178] - 임신 여성 또는 수유중인 여성, 연구자에 의해 결정된 효과적인 피임법을 사용하지 않는다면 출산 능력이 있는 여성

[0179] - 좌우 양측 유방암 (양쪽 1차 중앙이 모두 HER2를 2+ 내지 3+으로 과다발현하거나, 전이 부위가 HER2를 2+ 내지 3+으로 과다발현하는 경우 중 하나)

[0180] - 연구 시작전 30일 이내에 연구중인 작용제 또는 허가받지 않은 작용제를 사용한 경우

[0181] - 뇌로의 임상적으로 불안정하거나 치료되지 못한 전이 (예를 들면 방사선치료법이 필요)

[0182] 상기의 기준에 근거하여 469명의 환자를 선정하여 연구에 등록시켰다. 이 환자들 중 (화학요법별로 계층화한) 절반을 무작위로 헤르셉틴(등록상표) 항체를 추가 투여했다 (아래 참조).

[0183] <투여 방법 및 투여량>

- [0184] 항-ErbB2 항체
- [0185] 첫날, 인간화 항-ErbB2 항체 (헤르셉틴 (등록상표), H) 4 mg/kg 용량을 90분간에 걸쳐 정맥내 투여했다. 7일째부터는 매주마다 2 mg/kg 항체를 90 분간에 걸쳐 정맥내 투여했다.
- [0186] 화학요법
- [0187] 질병이 진행성이 아닌 환자들은 최소 6 주기 동안 다음 2개의 화학요법 중 하나를 받았다. (a) 환자가 보조제 설정된 안트라사이클린 요법을 받은 바 없었다면 시클로포스파미드와 함께 독소루비신 또는 에피루비신 (AC)을 투여하며, (b) 환자가 보조제 설정된 임의의 안트라사이클린 요법을 받은 적이 있으면 파클리탁셀 (T, 탁솔 (등록상표))을 투여했다. 헤르셉틴 (등록상표) 항체의 초기 용량은 어느 하나의 화학요법의 제1 주기를 수행하기 24 시간 전에 투여했다. 이 항체의 다음 용량은 초기 용량에 대한 내성이 양호한 경우에 화학요법 투여 직전에 투여했다. 만일 이 항체의 초기 용량에 대한 내성이 양호하지 못하면, 다음 주입은 화학요법 투여 24시간전까지 계속했다. 치료담당 의사의 견해상 계속 치료의 이점이 있다고 판단되는 환자는 6 주기 이상 계속해서 화학요법을 실시했다.
- [0188] 시클로포스파미드 (600 mg/m²)는 최소 3 분 동안 정맥내 푸쉬를 통해서나 또는 최대 2 시간 동안 주입을 통해서 투여했다.
- [0189] 독소루비신 (60 mg/m²) 또는 에피루비신 (75 mg/m²)은 제도적 규약에 따라 최소 3-5 분 동안 느린 정맥내 푸쉬를 통해서나 또는 최대 2 시간 동안 주입을 통해 투여했다.
- [0190] 파클리탁셀 (등록상표명 탁솔)은 3 시간에 걸쳐 정맥내 투여를 통해 175 mg/m²의 용량을 투여했다. 파클리탁셀을 투여받은 모든 환자는 파클리탁셀 보다 12 전 및 6 시간 전에 텍사메타손 (또는 그의 등가물) 20 mg x 2를 경구 투여하고, 파클리탁셀 보다 30 분 먼저 디펜히드라민 (또는 그의 등가물) 50 mg을 정맥내 투여하고, 파클리탁셀 보다 30 분 먼저 디메티딘 (또는 다른 H₂ 차단제) 300 mg을 정맥내 투여받았다.
- [0191] <반응 기준>
- [0192] 진행성 질병 이것의 객관적 증거는 임의의 측정가능한 병변의 25 % 이상 증가이다. 뿐만 아니라 진행성 질병은 새로운 병변이 나타나는 경우를 포함한다. 골 병변의 경우 진행성은 평면 필름, CT, MRI에 의한 객관적 측정시 25 % 증가, 골절에 기인하지 않은 새로운 병변 징후, 또는 통증 경감 방사선요법의 요구로 정의된다.
- [0193] 완전한 반응 최소 4주 동안 모든 방사선사진 및(또는) 육안으로 명확하게 관찰되는 종양의 소멸. 피부 및 흉벽의 완전한 반응은 생검에 의해 확인되어야 했다.
- [0194] 부분 반응 최소 4주 동안 모든 측정가능한 병변의 수직 직경의 결과의 총합이 50 % 이상 감소. 이 경우라면, 어떠한 새 병변도 나타나지 않거나 어떠한 병변도 크기가 커지지 않았을 것이다.
- [0195] 미미한 반응 모든 측정가능한 병변의 수직 직경의 결과의 총합에서 25 내지 49 %의 감소. 이 경우라면, 어떠한 새 병변도 나타나지 않거나 어떠한 병변도 크기가 커지지 않았을 것이다.
- [0196] 안정한 질병 측정가능한 병변의 크기가 25 % 이상 변화되지 않음. 아무런 병변도 나타나지 않을 것이다.
- [0197] 종양 진행까지의 시간 (TTP)은 치료 시작부터 진행까지의 시간으로 계산되었다. 반응률에 대한 신뢰성 한계는 단일 비례를 위한 정확한 방법을 사용하여 계산했다 (Fleiss, JL, Statistical Methods for Rates and Proportions (ed. 2), New York, NY, Wiley, 1981, pp13-17).
- [0198] 결과
- [0199] 10.5 개월의 추적 조사 중간에 질병 진행까지의 시간 (TTP (개월)) 및 반응률 (RR)에 대한 평가 결과, 헤르셉틴 (등록상표)에 의해 전체적으로 심각한 부작용 (AE) 없이 화학요법 효과가 상당히 증대한 것으로 나타났다.

표 1

	등재 인원수	TTP (개월)	RR (%)	AE (%)
CRx	234	5.5	36.2	66
CRx + H	235	8.6*	62.00**	69
AC	145	6.5	42.1	71
AC + H	146	9.0	64.9	68
T	89	4.2	25.0	59

T + H	89	7.1	57.3	70
* p < 0.001 (로그 랭크 테스트 기준)				
** p < 0.01 (X ² 테스트 기준)				
CRx : 화학요법				
AC : 안트라사이클린/시클로포스파미드 치료				
H : 헤르셉틴 (등록상표)				
T : 탁솔 (등록상표)				

[0201] 안트라사이클린을 투여했을 때 관찰된 것과 유사한 심근 부전 증후군이 AC + H의 병용 치료 (18 % 등급 3/4)의 경우가 AC 단독 (3 %), T (0%), 또는 T + H (2 %)에 의한 치료 보다 더 자주 보고되었다.

[0202] 이 데이터가 의미하는 바는, 항-ErbB2 항체 치료를 화학요법과 병용하면, 반응률 및 질병 진행 평가를 통해 관정된 바로는 임상적 이점이 현저히 증가한다는 것이다. 그러나, 독소루비신 또는 에피루비신의 심장 부작용 증가로 인해 안트라사이클린류를 항-ErbB2 항체 치료와 병용하는 것은 금기시된다. 위험성 및 이점을 모두 고려할 때 상기 결과는 헤르셉틴 (등록상표)와 파클리탁셀 (탁솔 (등록상표))의 병용 치료가 긍정적인 영향을 보여준다.

[0203] 명세서의 모든 인용의 공개 내용은 본원에 참고로 명백히 도입된다.

수탁번호

[0204]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션

수탁번호 : ATCCHB12215

수탁일자 : 19961017

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션

수탁번호 : ATCCHB12216

수탁일자 : 19961017

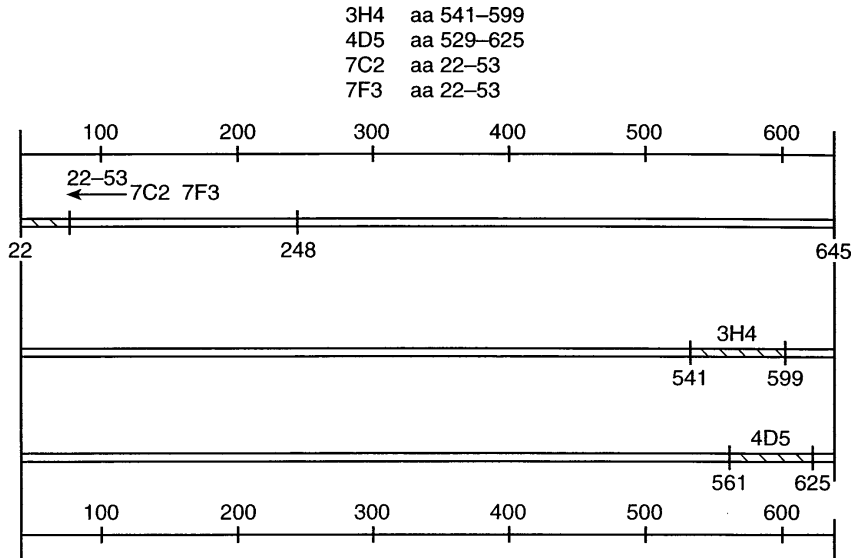
기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션

수탁번호 : ATCCCL10463

수탁일자 : 19900524

도면

도면1



3H4 에피토프 (서열 8)

VEECRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVAR
| |
541 599

4D5 에피토프 (서열 9)

LPCHECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCPGKPDLSYMPIWKFPDEEGACQP
| |
561 625

도면2

1 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPA
38 SPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL
75 QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDN
112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEI
149 LKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLID
186 TNRSRA

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

<120> TREATMENT WITH ANTI-ErbB2 ANTIBODIES

<130> P1256R2PCT

<150> US 60/069,346

<151> 1997-12-12

<160> 9

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

 Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu
 110 115 120
 Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 125 130 135
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys
 140 145 150
 Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg
 155 160 165

 Ala

<210

> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro
1 5 10 15
Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln
20 25 30
Gly Cys

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 4

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln

1 5

<210> 8

<211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val

1 5 10 15

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln

20 25 30

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val

35 40 45

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg

50 55

<210> 9

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr

1 5 10 15

Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr

20 25 30

Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys

35 40 45

Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
50 55 60
Gly Ala Cys Gln Pro
65