



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월26일

(11) 등록번호 10-1642846

(24) 등록일자 2016년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7015772

(22) 출원일자(국제) 2008년12월23일

심사청구일자 2013년12월17일

(85) 번역문제출일자 2010년07월16일

(65) 공개번호 10-2010-0095017

(43) 공개일자 2010년08월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/013998

(87) 국제공개번호 WO 2009/082485

국제공개일자 2009년07월02일

(30) 우선권주장

61/016,763 2007년12월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2005055936 A2*

WO2007076923 A1*

US20050272637 A1

US20070020261 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

백시넥스 인코포레이티드

미국 뉴욕 로체스터 마운트 호프 애브뉴 1895 (우: 14620)

(72) 발명자

조더러 모리스

미국 뉴욕주 14534 퍼츠포드 우드랜드 로드 44

에반스 엘리자베스 이

미국 뉴욕주 14469 블룸필드 메인 스트리트 41

(74) 대리인

김동완

전체 청구항 수 : 총 18 항

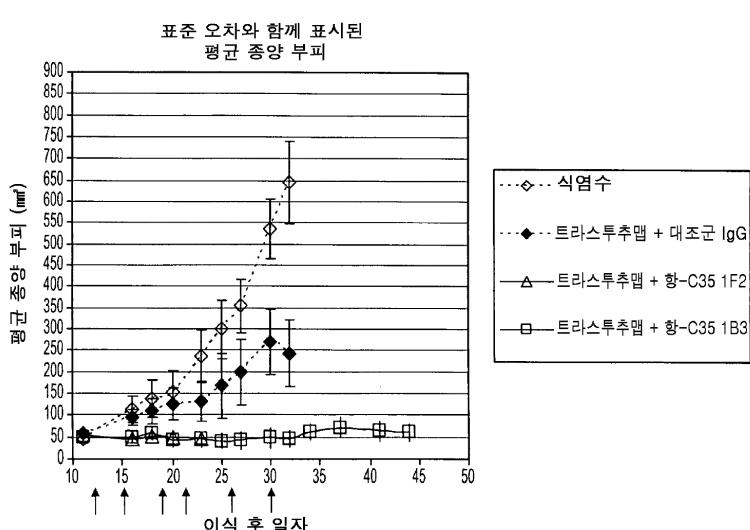
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 항-C35 항체 병용 치료 및 방법

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 HER2 또는 하나 이상의 EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함하는 암세포 사멸 방법에 관한 것이다. 일부 실시태양에서 상기 항체는 치료제로서 투여된다. 또한 본 발명은 이들 방법에 유용한 C35, HER2 및 EGFR 항체에 관한 것이다.

대 표 도



명세서

청구범위

청구항 1

C35 및 HER2를 발현하는 암세포를 사멸하기 위한 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 C35와 특이적으로 결합하는 항-C35 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 HER2와 특이적으로 결합하는 항-HER2 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체는 트라스투주맙(trastuzumab)임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 항-C35 항체는 1F2이고, 항-HER2 항체는 트라스투주맙임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 화학 요법제 또는 방사선에서 선택된 치료제를 더욱 포함함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 화학요법제는 파클리탁셀 또는 아드리아마이신임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 9

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더욱 포함함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 치료제는 항-C35 항체 및 항-HER2 항체 조성물을 투여하기 전에 투여함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 11

제 6항에 있어서, 상기 치료제는 항-C35 항체 및 항-HER2 항체 조성물을 투여한 후에 투여함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 12

제 6항에 있어서, 상기 치료제는 항-C35 항체 및 항-HER2 항체 조성물과 동시에 투여함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-C35 항체 또는 단편은 1F2, 1B3, MAbc0009, MAb 165 및 MAb 171로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 항-C35 항체 또는 단편은 1F2임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 17

제 15항에 있어서, 상기 항-C35 항체 또는 단편은 1B3임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 18

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암세포는 유방 암세포임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 유방 암세포는 내관성 암종(carcinoma) 세포임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 20

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 하나 이상의 항-C35 항체 또는 그의 단편을 포함함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 21

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 하나 이상의 항-HER2 항체를 포함함을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 22

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-C35 항체는 인간화(humanized), 키메라 또는 인간 항체임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 23

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-HER2 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 항체임을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 암세포, 특히 C35를 발현하는 암세포의 사멸 방법에 관한 것이다. 하나의 관점에서 상기 방법은 하나 이상의 항-C35 항체 및 하나 이상의 항-HER2 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 관점에서 상기 방법은 하나 이상의 항-C35 항체 및 하나 이상의 항-EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서 치료제도 항체와 함께 투여된다. 또 다른 관점에서 본 발명은 HER2, EGFR 및 IGFR과 같은 수용체 분자의 발현을 시험하는 단계를 포함한 C35-양성 암에 대한 치료의 고안 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

세포 성장은 신체의 특정한 요구에 반응하는 신중하게 조절되는 과정이다. 가끔, 세포 분열에 관한 규칙을 규정하는 복잡하고 높게 조절되는 제어가 파괴된다. 이러한 일이 발생하게 되면 세포는 그의 항상성 조절과 관계없이 성장 및 분열을 시작하여 일반적으로 암으로 표기되는 조건을 유발하게 된다. 실제로 암은 25~44세의 미국인 중 두 번째의 사망 원인이다.

[0003]

암에 대한 현재 치료법은 화학치료법 및 방사선 치료법을 포함한다. 화학치료제는 주로 아폽토시스를 유도함으로서 암세포를 사멸한다(Fisher, D.E., Cell 75:539- 542 (1994); Fung, C.Y., and D.E. Fisher, J. Clin. Oncol. 13:801-807 (1995); Lowe, S.W., et al, Cell 74:957-967 (1993)). 방사선 치료법은 아폽토시스의 유도 및 또 다른 메커니즘에 의해 암세포를 사멸한다. 그러나 화학치료법 및 방사선 치료법은 일정 종양 내 모든 세포를 사멸하지 않고 이러한 치료에서 생존한 세포는 성장을 지속한다. 따라서 이들 치료는 전체 종양을 박멸하는데는 종종 불충분하다. 따라서 암을 치료하는 개선된 치료 방법에 대한 요구가 존재한다.

[0004]

항체를 이용한 종양 세포 내에서 차별적으로 발현되는 표면 세포막 마커를 타겟하는 암에 대한 면역치료 방법은 개발된 바 있다(예를 들어 미국 특허등록 번호: 5,770,195, "Monoclonal Antibodies to the HER2 Receptor", 1995년 5월 23일 제출; 1998년 6월 23일 등록). 그러나 종양에서 차별적으로 발현되는 많은 항원은 종양 세포의 표면 상에 노출되지 않는다. 그 결과로 이러한 세포내 항원은 항체-기반 치료법에 대한 타겟으로 부적당하다.

발명의 내용

[0005]

본 발명의 간단한 요약

[0006]

본 발명은 (a) C35에 특이적으로 결합하는 일정량의 항-C35 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 (b) HER2에 특이적으로 결합하는 일정량의 항-HER2 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 C35 및 HER2를 발현하는 암세포에 투여하는 단계를 포함하고, 항-C35 항체의 함량 및 항-HER2 항체의 함량은 상기 암세포를 사멸하는데 효과적임을 특징으로 하는 C35 및 HER2를 발현하는 암세포의 사멸 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서 상기 방법은 일정량의 치료제를 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 하나의 실시태양에서 상기 방법은 생체 내에서 수행된다. 또 다른 실시태양에서 상기 방법은 인간과 같은 포유류에서 수행된다.

[0007]

본 발명의 하나의 실시태양에서 치료제는 화학치료제이다. 상기 화학치료제는 시스플라틴, 카보플라틴, 파클리탁셀, 아드리아마이신, 도세탁셀, 탁소터, 켐시타빈 및 비노렐빈으로 구성된 군에서 선택된다. 하나의 실시태양

에서 상기 치료제는 파클리탁셀이다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 아드리아마이신이다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 방사선이다.

[0008] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 치료제는 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-HER2 항체 중 하나 이상을 투여하기 전에 투여된다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-HER2 항체 중 하나 이상과 동시에 투여된다. 항-C35 항체 및 항-HER2 항체는 동시에 또는 연속으로 투여된다. 하나의 실시태양에서 각각의 항체 또는 그의 단편은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0009] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1F2, 1B3, MAb0009, MAb 163, MAb 165, MAb 171 및 그의 변이체 또는 유도체로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1F2 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1B3 또는 그의 변이체 또는 유도체이다.

[0010] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맙(trastuzumab)이다.

[0011] 본 발명의 하나의 실시태양에서 암세포는 유방암, 간암, 난소암, 방광암, 폐암, 전립선암, 췌장암, 결장암 및 흑색종으로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 암세포는 유방 암세포이다. 또다른 실시태양에서 유방 암세포는 내관성 암종 세포이다.

[0012] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 방법은 하나 이상의 항-C35 또는 그의 단편을 투여하는 단계를 포함한다. 또다른 실시태양에서 상기 방법은 하나 이상의 HER2 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0013] 본 발명의 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 항체이다. 또다른 실시태양에서 항-HER2 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 항체이다

[0014] 또한 본 발명은 환자의 암세포 표본 내의 EGFR 및 HER2 발현에 대해 시험하는 단계; 및 암세포가 EGFR 발현에 양성적인 경우 암세포를 사멸하는데 효과적인 일정량의 항-EGFR 항체 및 일정량의 항-C35 항체를 투여하는 단계; 또는 암세포가 HER2 발현에 양성적인 경우 암세포를 사멸하는데 효과적인 일정량의 항-HER2 항체 및 일정량의 항-C35 항체를 투여하는 단계를 포함한 환자의 C35-양성 암세포의 사멸 방법에 관한 것이다. 본 발명의 하나의 실시태양에서 EGFR 또는 HER2 발현은 시험관 내 분석에 의해 측정된다. 또다른 실시태양에서 시험관 내 분석은 면역조직화학(IHC), 형광 동소 보합법(FISH), 종합효소 연쇄 반응(PCR) 및 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)으로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 EGFR 또는 HER2 발현은 생체 내 분석에 의해 측정된다. 또다른 실시태양에서 EGFR 또는 HER2 발현은 세포 영상화 분석에 의해 측정된다. EGFR 및 HER2 발현은 다른 분석 방법 및 동일한 분석 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0015] 본 발명의 하나의 실시태양에서 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다. 또다른 실시태양에서 유방암은 전이 유방암이다.

[0016] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세툭시맙(cetuximab)이다. 또다른 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맙이다.

- [0017] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-C35 항체는 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1B3 또는 그의 인간화 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1F2 또는 그의 인간화 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 완전한 인간이다.
- [0018] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-EGFR 항체 및 상기 항-C35 항체는 다른 시간에 투여된다. 또다른 실시태양에서 항-EGFR 항체는 상기 항-C35 항체 전에 투여된다. 또다른 실시태양에서 항-HER2 항체 및 상기 항-C35 항체는 다른 시간에 투여된다. 또다른 실시태양에서 항-HER2 항체는 상기 항-C35 항체 전에 투여된다.
- [0019] 또한 본 발명은 암 환자 유래의 생물학적 표본 내 HER2 및 EGFR 발현을 시험하는 단계; 항-C35 항체 및 HER2 또는 EGFR에 대한 항체를 포함한 항체 병용 치료법을 선택하는 단계를 포함하고, 상기 생물학적 표본이 HER2 발현에 대해 양성적인 경우 항-HER2 항체가 선택되고, 상기 생물학적 표본이 EGFR 발현에 대해 양성적인 경우 EGFR 항체가 선택됨을 특징으로 하는 C35-양성 암 환자에 대한 치료 고안 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서 상기 생물학적 표본은 종양 조직, 혈장 및 혈청으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0020] 본 발명의 하나의 실시태양에서 C35-양성 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다. 또다른 실시태양에서 유방암은 전이 유방암이다.
- [0021] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세툭시맵이다. 또다른 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맵이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 C35에 대한 결합 특이성을 보유한 1B3 또는 그의 인간화 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 항-C35 항체는 C35에 대한 결합 특이성을 보유한 1F2 또는 그의 인간화 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 완전한 인간이다.
- [0022] 또한 본 발명은 환자의 암세포 표본 내 C35, EGFR 및 HER2의 발현에 대해 시험하는 단계; 상기 암세포 내에서 발현되는 C35, EGFR, HER2 조합을 측정하는 단계; 및 상기 암세포 내에서 발현되는 C35, EGFR, HER2 조합에 대한 항체 조합을 제공하는 단계를 포함한 항체 병용 치료법으로의 암 치료 방법에 치료적으로 반응할 환자의 확인 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서 상기 암은 유방암, 간암, 난소암, 형광암, 폐암, 전립선암, 췌장암, 결장암 및 흑색종으로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 상기 암은 유방암이다. 또다른 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다.
- [0023] 본 발명의 하나의 실시태양에서 C35, EGFR 및 HER2 발현은 시험관 내 분석에 의해 측정된다. 또다른 실시태양에서 상기 시험관 내 분석은 면역조직화학(IHC), 형광 동소 보합법(FISH), 종합효소 연쇄 반응(PCR) 및 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0024] 본 발명의 하나의 실시태양에서 EGFR 또는 HER2 발현은 생체 낸 분석에 의해 측정된다. 또다른 실시태양에서 EGFR 또는 HER2 발현은 세포 영상화 분석에 의해 측정된다. 하나의 실시태양에서 상기 세포는 C35와 EGFR 조합을 발현한다. 본 발명의 또다른 실시태양에서 항체 조합은 항-C35 항체 및 항-EGFR 항체를 포함한다. 또다른 실시태양에서 상기 세포는 C35와 HER2 조합을 발현한다. 또다른 실시태양에서 항체 조합은 항-C35 항체 및 항-HER2 항체를 포함한다. 하나의 실시태양에서 상기 세포는 C35, EGFR 및 HER2 조합을 발현한다. 또다른 실시태양에서 일정 항체 조합은 항-C35 항체, 항-EGFR 항체 및 항-HER2 항체이다.
- [0025] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 방법은 환자의 암세포 표본 내에서 IGFR 발현을 시험하는 단계; 상기 암세포에서 발현된 C35, EGFR, HER2 및 IGFR 조합을 측정하는 단계; 및 상기 암 세포에서 발현된 C35, EGFR, HER2 및 IGFR 조합에 대한 항체 조합을 제공하는 단계를 더욱 포함한다. 또다른 실시태양에서 상기 세포는 C35 및 IGFR 조합을 발현한다. 또다른 실시태양에서 항체 조합은 항-C35 항체 및 항-IGFR 항체를 포함한다.

- [0026] 또한 본 발명은 C35에 특이적으로 결합하는 일정량의 항-C35 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 일정량의 항-EGFR 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 암세포에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 항-C35 항체 함량 및 상기 항-EGFR 항체 함량은 암세포 사멸에 효과적임을 특징으로 하는 C35 및 EGFR을 발현하는 암세포의 사멸 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서 상기 방법은 일정량의 치료제를 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 또다른 실시태양에서 상기 방법은 상기 방법은 생체 내에서 수행된다. 또다른 실시태양에서 상기 방법은 포유류 내에서 수행된다. 또다른 실시태양에서 상기 포유류는 인간이다.
- [0027] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 치료제는 화학치료제이다. 또다른 실시태양에서 상기 화학치료제는 시스플라틴, 카보플라틴, 파클리탁셀, 아드리아마이신, 도세탁셀, 탁소터, 켐시타빈 및 비노렐빈으로 구성된 군에서 선택된다. 하나의 실시태양에서 상기 화학치료제는 파클리탁셀이다. 또다른 실시태양에서 상기 화학치료제는 아드리아마이신이다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 방사선이다.
- [0028] 하나의 실시태양에서 상기 치료제는 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-EGFR 항체 중 하나 이상을 투여하기 전에 투여된다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-EGFR 항체 중 하나 이상을 투여한 후에 투여된다. 또다른 실시태양에서 상기 치료제는 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-EGFR 항체 중 하나 이상과 동시에 투여된다.
- [0029] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-EGFR 항체는 동시에 투여된다. 또다른 실시태양에서 상기 항-C35 항체 또는 상기 항-EGFR 항체는 순차적으로 투여된다. 또다른 실시태양에서 항체 또는 그의 단편 각각은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 용량으로 투여된다.
- [0030] 본 발명의 하나의 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1F2, 1B3, MAb0009, MAb 163, MAb 165, MAb 171 및 그의 변이체 또는 유도체로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1F2 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체 또는 단편은 C35에 대한 결합 특이성을 보유하는 1B3 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 또다른 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세톡시맙이다.
- [0031] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 암세포는 유방암, 간암, 난소암, 방광암, 폐암, 전립선암, 췌장암, 결장암 및 흑색종으로 구성된 군에서 선택된다. 또다른 실시태양에서 상기 암세포는 유방 암세포이다. 또다른 실시태양에서 유방 암세포는 내관성 암종 세포이다.
- [0032] 본 발명의 하나의 실시태양에서 상기 방법은 하나 이상의 항-C35 항체 또는 그의 단편을 투여하는 단계를 포함한다. 또다른 실시태양에서 상기 방법은 하나 이상의 항-EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 또다른 실시태양에서 항-C35 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 항체이다. 또다른 실시태양에서 항-EGFR 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 항체이다.
- [0033] 본 발명의 관점은 하기에 더욱 상세하게 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 트라스투추맙 + 대조군 IgG, 트라스투추맙 + 항-C35 1F2 항체, 트라스투추맙 + 항-C35 1B3 항체 또는 식염수(이식 12일 후 치료 시작)로 처리된 BT474-MD-이식 마우스의 평균 종양 부피를 나타낸다. 트라스투추맙 및 1F2 또는 1B3 항-C35 항체 조합은 트라스투추맙 단독과 비교시 종양 부피를 유의적으로 감소시켰다. 화살표는

치료 시점을 나타낸다.

도 2는 BT474-MD 이종이식 후 무종양 마우스의 수가 트라스투추맵 + 대조군 IgG 또는 식염수로 처리된 마우스와 비교시 트라스투추맵/항-C35 조합(트라스투추맵 + 항-C35 1F2 또는 트라스투추맵 + 항-C35 1B3) 처리 마우스 그룹에서 더 큼을 나타낸다. 화살표는 처리 시점을 나타낸다.

도 3은 후기-아폽토시스성(A) 트라스투추맵-처리 BT474 세포가 세포 표면 항-C35 항체 염색에 대해 양성적으로 염색되는 반면 (B) 생존 세포는 세포 표면 항-C35 항체 염색을 나타내지 않음을 나타낸다.

도 4는 트라스투추맵 + 대조군 IgG, 트라스투추맵 + 항-C35 1F2 항체, 대조군 IgG, 항-C35 1F2 또는 식염수(평균 종양 부피가 약 50 mm³인 경우 이식 15일 후 치료 시작)로 처리된 BT474-MD-이식 마우스의 평균 종양 부피를 나타낸다. 트라스투추맵 및 항-C35 1F2 조합은 1F2 항-C35 항체 단독 또는 트라스투추맵 단독과 비교시 종양 부피를 유의적으로 감소시켰다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다.

도 5는 트라스투추맵 및 항-C35 1F2과 비교시 트라스투추맵 + 대조군 IgG로 처리된 또는 비처리(식염수) BT474-MD-이식 마우스의 평균 종양 부피를 나타낸다(평균 종양 부피가 약 100 mm³인 경우 이식 22일 후 치료 시작). 트라스투추맵 및 1F2 항-C35 항체 조합은 트라스투추맵 단독과 비교시 종양 부피를 유의적으로 감소시켰다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 개요

[0036] 많은 연구가 아폽토시스를 수행하는 세포의 표면 세포막 내 변화를 기술하고 있다. 이들 변화 중 표면 세포막의 외부 소엽 상의 포스파티딜세린 노출시 반영되는 인지질 비대칭의 초기 소실이 현저하다. 표면 세포막 조성의 이러한 변화는 대식세포에 의한 아폽토시스성 세포의 인식 및 제거를 촉진시킴이 보고된 바 있다((Fadok, V.A., et al., J. Immunol. 148:2207-2216 (1992)). 노출된 포스파티딜세린 분자에 항응고 Annexin V를 결합시킴으로서 아폽토시스를 수행하는 세포의 검출을 가능하게 하는 일반적인 방법이 개발되었다(Koopman, G., et al, Blood 54:1415-1420 (1994)).

[0037] 화학치료법 및 방사선 유도된 아폽토시스 조건 하에서 종양 세포 세포막 상에 노출되고 종양 내 항체 컨쥬케이트된 방사성동위원소 또는 독소를 농축시키기 위한 효과적인 타겟이 될 수 있는 세포내 종양-특이적 또는 종양-결합 항원의 서브세트가 존재함이 측정되었다. 2005년 7월 21일 공개된 미국 출원 공개 번호 2005/0158323 A1 (본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨). 특히 내부 세포막과 일반적으로 결합되는 차별적으로-발현되는 종양-특이적 C35 항원은 방사선 및/또는 화학치료법에 의해 아폽토시스를 수행하도록 유도된 종양 세포의 표면 세포막 상에 노출되게 된다. 미국 출원 공개 번호 2005/0158323 A1, 도 1~3 참조. 이러한 항원(예를 들어 C35)에 대한 항체는 암 치료시 표준 아폽토시스-유도 화학치료법 및 방사선 치료법의 치료 이익을 강화시킬 수 있기 때문에 이들을 이용하는 방법이 특히 효과적이다. 유사하게는 표면-노출 세포 신호전달 분자(예를 들어 HER2, EGFR 및/또는 IGFR과 같은 성장 인자 수용체)에 대한 항체와 같은 또 다른 아폽토시스-유도제는 C35에 대한 항체와 같은 세포내 항원에 대한 항체의 치료 이익을 개선시키는데 사용될 수 있다.

[0038] 하나의 관점에서 본 발명은 하나의 실시태양에서 종양의 박멸을 강화시키기 위해 아폽토시스의 유도와 함께 작용하는 방법에 관한 것이다. 이는 종양 세포 내에서 차별적으로 발현되는 세포내 마커 종류가 아폽토시스성 세포 표면 상에 노출되어 이들은 특정 항체에 의해 타겟될 수 있다는 새로운 관찰을 기반으로 한다. 하나의 관점에서 아폽토시스는 EGFR, HER2 또는 IGFR과 같은 세포 표면 수용체에 대한 하나 이상의 항체를 투여함으로서 유도된다. 또 다른 관점에서 C35와 같은 차별적으로 발현되는 세포내 종양 항원에 대한 하나 이상의 항체가 투여된다. 이러한 항체는 컨쥬케이트되지 않거나 독성 탑재물에 컨쥬케이트되어 투여될 수 있다. 이러한 치료 방법의 이익은 몇 배이다. 예를 들어 항체와 컨쥬케이트되는 경우 이러한 방법은 아폽토시스 타겟 부근에서 또 다른 비-아폽토시스성 종양 세포를 파괴할 수 있는 독성 탑재물의 종양 환경으로의 전달을 가능하게 한다. 또한 2 이상의 항체 조합을 투여함으로서 항체는 상승적으로 작용하고, 더 큰 세포 사멸을 달성하고 낮은 용량의 화학치료법 또는 방사선 치료법 또는 이의 제거를 가능하게 하여 관련 독성을 감소시킨다. 더욱이 이러한 방법은 표면

세포막 성분 내 변경에 의해 입증된 바와 같이 예를 들어 아폽토시스-유도제로의 치료에 의해 아폽토시스 과정을 차단한 생존 세포가 아폽토시스 진행을 면복하고 성장을 재개하는 것을 방지한다 Hammill, A.K., et al, *Exp. Cell Res.* 251:16-21 (1999)).

[0039] Evans et al.은 C35가 C35 발현에 대한 양성적인 유방 시험의 32%의 등급 1 및 66%의 등급 2 및 3 침윤 도관암종으로 유방암 내에서 과-발현됨을 보고하였다 Evans et al, *MoI. Cancer Ther.* 5:2919-30 (November 2006) (본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨). C35 발현이 정상 인간 조직 내에 제한되기 때문에 (Evans et al. 참조) 이는 특히 유방암 내에서 바이오마커(biomarker) 및 진단 및 치료 타겟으로 사용하기 위한 우수한 후보이다.

[0040] 정상 세포는 그의 개별적인 리간드에 의해 성장 인자 수용체 티로신 키나제(RTK)의 높게 제어된 활성화에 의해 증식되나 암세포도 성장 인자 수용체의 활성화에 의해 증식되나 정상 증식의 신중한 제어를 소실한다. 제어 소실은 성장 인자 및/또는 수용체의 과발현과 같은 많은 인자 및 성장 인자에 의해 조절되는 생화학적 경로의 자율적 활성화에 의해 유발된다. 종양형성과 관련된 RTK의 일부 예는 표피 성장 인자(EGFR), 혈소판-유래 성장 인자(PDGFR), 인슐린-유사 성장 인자(IGFR), 신경 성장 인자(NGFR) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)에 대한 수용체이다. 이들 성장 인자의 그들의 세포 표면 수용체로의 결합은 수용체 활성화를 유도하고, 이는 신호 변환 경로를 개시하고 변형시켜 세포 증식 및 분화를 유발하게 된다.

[0041] 표피 성장 인자(EGF) 수용체 패밀리의 멤버는 특히 표피 세포의 종양형성과 관련된 중요한 성장 인자 수용체 티로신 키나제이다. 발견된 EGF 수용체 패밀리의 첫 번째 멤버는 많은 형태의 종양 세포 상에서 발현되는 EGFR이다. EGFR은 종양 세포 분열 및 성장, 복구 및 생존, 혈관형성, 침입 및 종양 전이의 조절과 관련되는 것으로 나타났다.

[0042] EGFR은 세포외 리간드 결합 도메인, 막횡단 영역 및 세포질 단백질 티로신 키나제 도메인을 지닌 170 kDa 세포막-연결 당단백질이다. 특정 리간드의 결합은 EGFR 자가인산화, 수용체의 세포질 티로신 키나제 도메인의 활성화 및 종양 성장 및 생존을 조절하는 다수의 신호 변환 경로의 개시를 유발한다. 또한 EGFR 경로는 종양 내에서 VEGF 및 기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF)와 같은 다른 다양한 혈관형성 인자의 생성에 영향을 미친다.

[0043] 많은 인간 종양은 EGFR을 발현하거나 과발현하는 것으로 보고되었다. EGFR의 발현은 불충분한 예후, 감소된 생존 및/또는 증가된 전이와 상호관련된다. 종양형성의 연루로 인해 EGFR는 항암 치료법에 대해 특히 타겟되었다. 이를 치료법은 수용체의 세포외 도메인에 대한 리간드의 결합을 차단하는 단일클론 항체 또는 신호 변환을 방지하도록 세포내 영역에 직접 작용하는 합성 티로신 키나제 저해제를 주로 포함하였다. 또한 항-EGFR 항체도 EGFR-양성 종양 세포 내 아폽토시스를 유도한다.

[0044] 소마토메딘으로도 알려진 인슐린-유사 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I) 및 인슐린-유사 성장 인자-II (IGF-II)를 포함한다 (Klapper, et al, *Endocrinol.* 112:2215 (1983); Rinderknecht et al., *Febs.Lett.* 59:283 (1978)). 이들 성장 인자는 IGFR1에 결합함으로서 (Sepp-Lorenzino *Breast Cancer Research and Treatment* 47:235 (1998)) 종양 세포를 포함한 다양한 세포 형태 상에 분열촉진 활성을 발휘한다 (Macaulay *Br. J. Cancer* 65:311 (1992)). IGF와 IGFR1의 상호작용은 티로신 잔기 상에서 수용체의 자가인산화를 유발함으로서 수용체를 활성화시킨다 (Butler, et al., *Comparative Biochemistry and Physiology* 121:19 (1998)). 활성화되면 IGFR1은 세포 신호전달 경로를 활성화하기 위해 세포내 타겟을 인산화시키게 된다. 이러한 수용체 활성화는 종양 세포 성장 및 생존의 자극에 중요하다. 따라서 IGFR1 활성의 저해는 인간 암 성장 및 다른 증식성 질환을 치료하거나 예방하기 위한 유용한 잠재적인 방법을 나타낸다.

[0045] 여러 증거는 IGF-I, IGF-II 및 그의 수용체 IGFR1이 악성 표현형의 중요한 매개자임을 나타낸다. IGF-I의 혈

장 수치는 전립선암 위험률의 강한 예측변수로 판명되었고(Chan, et al., *Science* 279:563 (1998), 유사한 역학 조사는 IGF-I 수치를 유방암, 결장암 및 폐암 위험률과 강하게 연계시킨다.

[0046] 화학적으로 유도된 래트 신경모세포종 유래의 DNA로의 트랜스펙션의 결과로서 또 다른 형질전환 유전자가 확인되었다. 본래 neu로 명명되는 이러한 유전자는 c-erbB 원발암유전자와 관련되나 그와 구별되는 것으로 나타났다. 인간 게놈 및 상보성 DNA(cDNA) 라이브러리를 선별하기 위한 프로브로서 v-erbB 및 인간 EGFR에 의해 2개의 다른 그룹이 각각 HER2 및 c-erbB-2로 명명된 인간 erbB-관련 유전자를 독립적으로 분리시켰다. 후속 서열 분석 및 염색체 지도화 조사는 c-erbB-2 및 HER2가 neu의 변종임을 나타내었다.

[0047] 또한 HER2도 티로신 키나제 패밀리의 멤버이고; Coussens et al, *Science* 230:1132 (1985)에 의해 보고된 바와 같이 EGFR 유전자와 밀접하게 관련되나 그와는 구별된다. HER2는 EGFR 유전자가 위치하는 염색체 7의 밴드 p11-p13과 비교시 염색체 17의 밴드 q21 상에서 발견된다는 점에서 EGFR과 상이하다. 또한 HER2 유전자는 EGFR 유전자에 대한 5.8- 및 10-kb 전사체와 상이한 4.8 kb의 메신저 RNA(mRNA)를 생성한다. 최종적으로 HER2 유전자가 의해 암호화된 단백질은 EGFR 유전자에 의해 암호화된 170,000-달톤 단백질과 비교시 185,000 달톤이다. 역으로, 서열 데이터를 기반으로 HER2는 티로신 키나제 패밀리의 다른 멤버보다는 EGFR 유전자와 밀접하게 관련된다. EGFR 단백질과 유사하게 HER2 유전자(p185)는 세포외 도메인, 2개의 시스테인-풍부 반복 군집을 포함하는 막횡단 도메인 및 세포내 키나제 도메인을 지닌다. 더욱이 HER2 유전자의 증폭은 질환의 부정적 예후 및 재발 가능성과 유의적으로 상호관련된다. 항-EGFR 항체와 유사하게 항-HER2 항체는 종양 세포 내에서 아폽토시스를 유도한다.

[0048] HER2와 같은 세포외에서 발현되는 항원으로 단백질의 다른 에피토프에 지시된 2개의 다른 항-HER2 항체의 투여는 생체 내 및 시험관 내에서 항-종양 활성을 유발함을 함이 관찰되었다. Spiridon et al, *Clin. Cancer Res.* 8: 1720-30 (2002)(본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨). 실제로 2개의 다른 항-HER2 항체(Spiridon, 2002; Friedman et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 702: 1915-1920 (2005)); 2개의 다른 항-EGFR 항체(Friedman, 2005; Perera et al., *Clin. Cancer Res.* 77:6390-6399 (2005)); 및 하나의 항-HER2 및 하나의 항-EGFR 항체의 조합(Larbouret et al., *Clin. Cancer Res.* 75:3356-3362 (2007))의 투여에 대한 상승 효과가 입증되었다. 이들 상승 효과는 동일 분자 상에 다른 에피토프에 대해 지시된 높은 친화력 항체를 조합함으로서 세포 표면 분자의 고교차결합(hypercrosslinking)의 결과이다(Spiridon, 2002). 또한 이형이량체가 HER2와 EGFR의 사슬 사이에 형성되기 때문에 하나의 항-HER2 및 하나의 항-EGFR 항체와의 교차결합도 가능하다. 하나 이상의 에피토프의 동시 연대는 거대 응집체의 항체-수용체 복합체가 형성되게 한다. 이들 거대 응집체는 수용체의 가속화된 제거를 유발하는 작은 항체 복합체보다 신속하게 흡수된다(Friedman, 2005). 그러나 상기 기재된 바와 같이 Spiridon et al. 이 세포외에서 발현된 단백질 HER2를 발현한 반면 C35는 아폽토시스와 관련된 세포 표면 상에서 발현되는 세포내 항원이다. 하나의 관점에서 본 발명은 항-C35 항체 및 항-HER2 및/또는 항-EGFR 항체의 상승 효과를 유발하기 위한 C35의 세포 표면 발현을 유도하는 항-HER2 및/또는 항-EGFR 항체의 용도에 관한 것이다.

[0049] C35 유전자는 ERBB2(Her2/neu) 유전자의 3' 말단으로부터 염색체 17q12 및 사이트 505에 위치한다(Evans et al, 2006). 하나의 연구에서 C35 및 HER2의 발현은 C35에 대한 양성적으로 시험된 HER2-양성 유방 종양 모두에서 상호관련된 것으로 나타났다(Evans et al, 2006). 50% 정도의 C35+ 유방 종양이 HER2도 발현하고, 따라서 C35와 HER2 항체의 조합으로 치료될 수 있는 반면, 많은 C35+ 종양은 HER2를 적게 발현하거나 전혀 발현하지 않는다. 하기 본원의 실시예에서 입증된 바와 같이 대부분의 C35 양성 종양은 HER2와 EGFR 모두를 발현하는 작은 서브세트 C35+ 종양 및 HER2와 EGFR 모두를 발현하지 않는 유사한 작은 서브세트로서 HER2 또는 EGFR을 발현한다. 상기 논의된 바와 같이 HER2와 EGFR 모두는 종양 변환과 관련되고 각각은 항체에 의해 타겟될 때 아폽토시스를 유도하는 것으로 보고되었다. 본원에서 하기에 입증된 바와 같이 30개의 분석된 종양 중 7/30 종양은 C35+/Her2+/EGFR-, 17/30은 C35+/Her2-/EGFR+, 3/30은 C35+/Her2+/EGFR+이고 3/30만이 C35+/Her2-/EGFR-이었다. 따라서 C35와 HER2 또는 C35와 EGFR 항체의 조합은 이들 항원에 대해 양성적인 종양을 치료하는데 유용하다(예를 들어 항-C35 항체로 치료될 수 있는 표면 상에서 C35를 노출시키기 위해 아폽토시스를 유도함으로서). 항-C35 항체와 함께 사용되는 HER2 및 EGFR 항체의 상승작용은 적어도 부분적으로는 C35의 표면 노출 유발에 의한

것이다. 또한 2개 항체의 이용은 항체를 개별적으로 사용하는 치료와 반대로 두 분자의 수용체 제거 활성, 세포 사멸 또는 다른 효과기 기능을 증가시킬 수 있다. 따라서 하나의 관점에서 본 발명은 암세포를 사멸하는데 효과적인 일정량의 항-C35 항체 및 일정량의 항-HER2 항체 및/또는 일정량의 항-EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함한 암, 특히 유방암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0050]

I. 정의

[0051]

용어 "하나" 실재는 하나 이상의 실재를 나타냄이 주지되어야 한다; 예를 들어 "하나의 C35 항체"는 하나 이상의 C35 항체를 나타냄이 이해된다. 이와 같이 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나 이상"은 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0052]

본원에서 사용된 용어 "폴리펩타이드"는 단수 "폴리펩타이드"뿐만 아니라 복수 "폴리펩타이드들"도 포함해야 하고, 아마이드 결합(펩타이드 결합으로 알려진)에 의해 선형으로 연결된 단량체(아미노산)로 구성된 분자를 나타낸다. 용어 "폴리펩타이드"는 2 이상의 아미노산의 어떠한 사슬 또는 사슬들을 나타내고, 특정 길이의 생성물을 나타내지 않는다. 따라서 펩타이드, 디펩타이드, 트리펩타이드, 올리고펩타이드, "단백질", "아미노산 사슬" 또는 2 이상의 아미노산의 사슬 또는 사슬들을 나타내는데 사용되는 어떠한 용어도 "폴리펩타이드"의 정의에 포함되고, 용어 "폴리펩타이드"는 이를 용어 대신에 또는 상호교환가능하게 사용된다. 용어 "폴리펩타이드"는 제한 없이 당화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 가수분해성 분열 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 변형을 포함한 폴리펩타이드의 발현-후 변형의 생성물을 나타낸다. 폴리펩타이드는 천연 생물학적 공급원으로부터 유래하거나 재조합 기술에 의해 생성되나 항상 지정된 핵산 서열로부터 번역되지는 않는다. 이는 화학적 합성을 포함한 어떠한 방식으로도 생성된다.

[0053]

본 발명의 폴리펩타이드는 약 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상 또는 2,000개 이상의 아미노산 크기이다. 폴리펩타이드는 항상 그러한 구조를 지니지는 않으나 한정된 3-차원 구조를 지닌다. 한정된 3-차원 구조를 지닌 폴리펩타이드는 중첩됨을 나타내고, 한정된 3-차원 구조를 보유하지 않고 많은 다른 입체형태를 채택할 수 있는 폴리펩타이드는 비중첩됨을 나타낸다. 본원에서 사용된 용어 당단백질은 예를 들어 세린 잔기 또는 아스파라긴 잔기와 같은 산호-포함 또는 질소-포함 아미노산 잔기 측쇄를 통해 단백질에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티에 결합된 단백질을 나타낸다.

[0054]

"분리된" 폴리펩타이드 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체는 그의 천연 환경이 아닌 폴리펩타이드를 나타낸다. 특정 수준의 정제는 요구되지 않는다. 예를 들어 분리된 폴리펩타이드는 그의 고유 또는 천연 환경에서 이동될 수 있다. 숙주 세포에서 발현된 재조합으로 합성된 폴리펩타이드 및 단백질은 어떠한 적당한 기술에 의해 분리되거나 분획화되거나 부분적 또는 실질적으로 정제된 고유 또는 재조합 폴리펩타이드이기 때문에 본 발명의 목적으로 분리된 것으로 간주된다.

[0055]

또한 본 발명의 폴리펩타이드로서 전술된 폴리펩타이드의 단편, 유도체, 유사체 또는 변이체 및 그의 어떠한 조합도 포함된다. 본 발명의 항체들 또는 항체 폴리펩타이드를 나타내는 경우 용어 "단편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"는 상응하는 고유 항체 또는 폴리펩타이드의 항원-결합 특성의 적어도 일부를 보유하는 어떠한 폴리펩타이드도 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드 단편은 본원에서 논의된 특정 항체 이외에 단백질분해 단편뿐만 아니라 단편 결실도 포함한다. 본 발명의 C35 및/또는 HER2 항체 및 항체 폴리펩타이드의 변이체는 상기 기재된 바와 같은 단편 및 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변경된 아미노산 서열을 지닌 폴리펩타이드도 포함한다. 변이체는 자연적으로 발생하거나 비-자연 발생적이다. 비-자연 발생적 변이체는 당분야에 알려진 돌연변이 유발 기술을 이용하여 생성된다. 변이 폴리펩타이드는 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 포함한다. 항체 변이체는 항체의 인간화 버전뿐만 아니라 친화력 성숙되거나 최적화된 항체도 포함한다. 친화력 최적화는 당분야에 잘 알려진 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한 본 발명의 항체 친화력을 증가시키는

바람직한 방법은 US 2002/0123057 A1에 개시되어 있다. 본 발명의 C35 및/또는 HER2 항체 및 항체 폴리펩타이드의 유도체는 고유 폴리펩타이드에서 발견되지 않는 추가적인 특징을 나타내기 위해 변경된 폴리펩타이드이다. 예는 융합 단백질을 포함한다. 본원에서 사용된 C35 및/또는 HER2 항체 또는 항체 폴리펩타이드의 "유도체"는 기능적인 부수적 그룹의 반응에 의해 화학적으로 유도된 하나 이상의 잔기를 지닌 주 폴리펩타이드를 나타낸다. 20개 표준 아미노산의 하나 이상의 자연 발생적 아미노산 유도체를 포함한 웹타이드도 "유도체"로 포함된다. 예를 들어 프롤린은 4-하이드록시프롤린으로 치환되고, 라이신은 하이드록시라이신으로 치환되고, 히스티딘은 3-메틸히스티딘으로 치환되고, 세린은 호모세린으로 치환되고, 라이신은 오르니틴으로 치환된다.

[0056] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단수 핵산뿐만 아니라 복수 핵산을 포함하고, 분리된 핵산 분자 또는 컨스트럭트, 예를 들어 메신저 RNA(mRNA) 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 포스포디에스테르 결합 또는 비-통상적인 결합(예를 들어 웹타이드 핵산(PNA)에서 발견되는 것과 같은 아미드 결합)을 포함한다. 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 분절, 예를 들어 DNA 또는 RNA 단편을 나타낸다. "분리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 그의 고유 환경으로부터 이동된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 나타낸다. 분리된 폴리뉴클레오타이드의 추가적인 예는 이종의 숙주 세포에 유지된 제조합 폴리뉴클레오타이드 또는 용액 형태의 정제된(부분 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 분리된 RNA 분자는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 생체 내 또는 시험관 내 RNA 전사체를 포함한다. 본 발명에 따른 분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 합성으로 제조한 이러한 분자를 더욱 포함한다. 더욱이 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결자와 같은 조절 요소가 되거나 이를 포함한다.

[0057] 본원에서 사용된 "코드화 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈으로 구성된 핵산 부분이다. "정지 코돈"(TAG, TGA, 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되진 않으나 코드화 영역의 일부분으로 간주될 수 있으나 임의의 인접 서열 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론 등을 코드화 서열의 일부가 아니다. 본 발명의 2 이상의 코드화 영역은 예를 들어 하나의 벡터 상에 단일 폴리뉴클레오타이드 컨스트럭트로서 또는 분리된(상이한) 벡터 상에 개별적 폴리뉴클레오타이드 컨스트럭트로서 존재할 수 있다. 더욱이 어떠한 벡터도 단일 코드화 영역을 포함하거나 2개 이상의 코드화 영역을 포함하며, 예를 들어 단일 벡터는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 개별적으로 암호화한다. 더욱이 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 항-C35, HER2 또는 EGFR 항체 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 핵산에 융합되거나 융합되지 않은 이종의 코드화 영역을 암호화한다. 이종의 코드화 영역은 분비 신호 웹타이드 또는 이종의 기능성 도메인과 같은 특수 요소 또는 모티브를 제한 없이 포함한다.

[0058] 특정 실시태양에서 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 DNA이다. DNA의 경우 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 하나 이상의 코드화 영역과 실시 가능하게 결합된 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 제어 요소를 포함한다. 유전자 생성물의 발현을 조절 서열(들)의 영향 또는 제어 하에 위치시키기 위해 유전자 생성물 예를 들어 폴리펩타이드에 대한 코드화 영역이 하나 이상의 조절 서열과 결합되는 경우가 실시 가능한 결합이다. 예를 들어 프로모터 기능 유도가 바람직한 유전자 생성물을 암호화하는 mRNA의 전사를 유발하는 경우 및 2개의 DNA 단편간의 결합 특성이 발현 조절 서열의 유전자 생성물 발현을 지시하는 능력을 방해하지 않거나 DNA 주형의 전사 능력을 방해하지 않는 경우 2개의 DNA 단편(폴리펩타이드 코드화 영역 및 이와 결합된 프로모터)은 "실시 가능하게 결합"된 것이다. 따라서 프로모터가 핵산의 전사에 영향을 미칠 수 있는 경우 프로모터 영역은 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산과 실시 가능하게 결합된 것일 것이다. 프로모터는 예정된 세포에서만 DNA의 실질적인 전사를 지시하는 세포-특이 프로모터이다. 프로모터 이외에 다른 전사 제어 인자, 예를 들어 인핸서, 오퍼레이터, 억제자 및 전사 종결 신호는 폴리뉴클레오타이드와 실시 가능하게 결합되어 세포-특이적인 전사를 지시할 수 있다. 적당한 프로모터 및 다른 전사 제어 영역들은 본원에 기재되어 있다.

[0059] 다양한 전사 제어 영역은 당업자에게 알려져 있다. 이들은 제한 없이 사이토메갈로바이러스(인트론-A와 함께 즉시 초기 프로모터), 시미안 바이러스 40(초기 프로모터) 및 레트로바이러스(로우스 육종 바이러스와 같은) 유래의 프로모터 및 인핸서 분절과 같은 척추동물 세포에서 기능하는 전사 제어 영역을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 다른 전사 제어 영역은 액틴, 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토키 베타-글로빈과 같은 척추동

물 유전자뿐만 아니라 진핵 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열에서 유래된 것을 포함한다. 추가적인 적당한 전사 제어 영역은 조직-특이적인 프로모터 및 인핸서뿐만 아니라 램포카인-유도성 프로모터(예를 들어 인터페론 또는 인터루킨에 의해 유도 가능한 프로모터)를 포함한다.

[0060] 유사하게 다양한 번역 제어 인자가 당업자에게 알려져 있다. 이들은 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈 및 피코르나바이러스 유래 요소(특히 내부 리보솜 도입 부위 또는 IRES, 또한 CITE 서열이라고도 표기됨)를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0061] 또 다른 실시태양에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 RNA 예를 들어 메신저 RNA(mRNA) 형태의 RNA이다.

[0062] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 코드화 영역은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 분비 또는 신호 웨პ타이드를 암호화하는 추가적인 코드화 영역과 결합된다. 신호 가설에 따라 포유류 세포에 의해 분비되는 단백질은 조면 소포체를 통한 성장 단백질 사슬의 유출이 개시되면 성숙 단백질로부터 분열된 신호 웨პ타이드 또는 분비성 리더 서열을 지닌다. 당업자는 척추동물 세포에 의해 분비되는 폴리펩타이드가 일반적으로 폴리펩타이드의 N-말단에 융합된 신호 웨პ타이드를 지니고, 이는 완전한 또는 "전장"의 폴리펩타이드로부터 절단되어 폴리펩타이드의 분비형 또는 "성숙"형이 생성됨을 인지하고 있다. 특정 실시태양에서 고유 신호 웨პ타이드 예를 들어 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 웨პ타이드가 사용되거나 이와 실시 가능하게 결합된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 능력을 보유한 서열의 기능적 유도체가 사용된다. 또한 이종의 포유류 신호 웨პ타이드 또는 이의 기능적 유도체가 사용된다. 예를 들어 야생형 리더 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성자(TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다제의 리더 서열로 치환된다.

[0063] 본 발명은 특정 항-C35, 항-HER2 및 항-EGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체의 이용 방법에 관한 것이다. 자연-발생적 항체와 같은 전체-크기 항체를 특별하게 나타내지 않는 한 용어 "C35 항체", "HER2 항체" 및 "EGFR 항체"(본원에서 각각 용어 "항-C35 항체", "항-HER2" 및 "항-EGFR 항체"와 상호교환가능하게 사용됨)는 전체-크기 항체뿐만 아니라 이러한 항체의 항원-결합 단편, 변이체, 유사체 또는 유도체, 예를 들어 항체 분자와 유사한 방식으로 항원에 결합되는 자연 발생적 항체 또는 면역글로불린 분자 또는 조작된 항체 분자 또는 단편도 포함한다. 유사하게 본 발명은 특정 항-IGFR1 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에 관한 것이다. 자연-발생적 항체와 같은 전체-크기 항체를 특별하게 나타내지 않는 한 용어 "IGFR 항체"(IGFR은 본원에서 IGFR1과 상호교환가능하게 사용되고 IGFR 항체는 본원에서 용어 "항-IGFR 항체"와 상호교환가능하게 사용됨)는 전체-크기 항체뿐만 아니라 이러한 항체의 항원-결합 단편, 변이체, 유사체 또는 유도체, 예를 들어 항체 분자와 유사한 방식으로 항원에 결합되는 자연 발생적 항체 또는 면역글로불린 분자 또는 조작된 항체 분자 또는 단편도 포함한다.

[0064] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 항체 또는 면역글로불린은 하나 이상의 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 일반적으로 중쇄 및 경쇄의 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 척추동물 시스템에서의 기본적인 면역글로불린의 구조는 비교적 잘 알려져 있다. 예를 들어 Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*(2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press) 참조. 또한 본원에서 사용된 "본 발명의 항체" 또는 "본 발명의 항체 폴리펩타이드"는 각각 C35, HER2, EGFR 및 IGFR 또는 C35, HER2, EGFR 및 IGFR 폴리펩타이드 항체에 대한 항체를 포함한다.

[0065] 하기에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이 용어 "면역글로불린"은 생화학적으로 구별할 수 있는 다양한 종류의 폴리펩타이드를 포함한다. 당업자는 중쇄가 일부 서브클래스(예를 들어 γ 1- γ 4)와 함께 감마, 뮤, 알파, 엘타 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류됨을 인식할 것이다. 항체의 "종류"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE로 결정하는 것이 이러한 사슬의 특성이다. 면역글로불린 서브클래스(이소타입) 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 등은 잘 특성화되었고 기능적인 특수성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 이들 종류와 이소타입 각각

의 변형 버전은 본 개시물의 관점에서 당업자에게 용이하게 구별가능하고, 따라서 본 발명의 범위내에 존재한다. 모든 면역글로불린 종류는 명백하게 본 발명의 범위 내에 존재하나 하기 논의는 일반적으로 IgG 종류의 면역글로불린 분자에 관한 것일 것이다. IgG와 관련하여 표준 면역글로불린 분자는 약 23,000 달톤 분자량의 2개의 동일한 경쇄 폴리펩타이드와 분자량이 53,000~70,000의 2개의 동일한 중쇄 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 4개의 사슬은 일반적으로 "Y" 형태로 이황화 결합에 의해 연결되고, 경쇄는 "Y"의 입구에서 시작해서 가변부까지 연결되는 중쇄에 묶여있다.

[0066] 경쇄는 카파 또는 람다(κ , λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 종류는 카파 또는 람다 경쇄와 결합된다. 일반적으로 경쇄와 중쇄는 서로 공유 결합으로 결합되어 있으며, 면역글로불린이 2개의 중쇄의 "꼬리" 부분은 하이브리도마, B 세포 또는 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우 이황화 공유 결합 또는 비-공유 결합에 의해 서로 결합된다. 중쇄 내에서 아미노산 서열은 Y 구조의 분기된 말단의 N-말단에서 각각의 사슬의 하단의 C-말단까지 이어진다.

[0067] 경쇄와 중쇄 모두 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 분류된다. 용어 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 이러한 관점에 있어서, 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H) 부분 모두의 가변 도메인은 항원 인식 및 특이성을 결정하는 것으로 인식될 것이다. 역으로, 경쇄(C_L) 및 중쇄(C_H1 , C_H2 , 또는 C_H3)의 불변 도메인은 분비, 태반경유 이동, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. 관례에 따라 불변 도메인의 번호 부여는 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 점점 멀어질수록 증가된다. N-말단 부분은 가변 영역이고, C-말단 영역은 불변 영역이며; C_H3 및 C_L 도메인은 실제로 각각 중쇄와 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다.

[0068] 상기 나타난 바와 같이 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합 가능하게 한다. 즉, 항체의, V_L 도메인 및 V_H 도메인, 또는 상보성 결정 영역(CDR)의 서브세트는 결합하여 3차원 항원 결합 부위를 한정하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각 팔 말단에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 더욱 상세하게는 항체 결합 부위는 V_H 및 V_L 사슬 각각의 3개의 CDR에 의해 한정된다. 일부 예에서 예를 들어 카멜리드(camelid) 종으로부터 유래되거나 또는 카멜리드 면역글로불린을 기반으로 조작된 특정 면역글로불린 분자, 완전한 면역글로불린 분자는 경쇄없이 중쇄로만 구성된다. 예를 들어 Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446-448 참조.

[0069] 자연 발생적 항체에서 각각의 항원 결합 도메인 내에 존재하는 6개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체가 수성 환경 내에서 그의 3차원 입체형태를 나타낼 때 항원 결합 도메인을 형성하도록 특이적으로 위치하는 짧은 비-인접 아미노산 서열이다. "프레임워크(framework)"로 표기되는 항원 결합 도메인 내 잔여 아미노산은 적은 분자간 가변성을 나타낸다. 프레임워크 영역은 대개 β -시트 구조를 취하고 있고 CDR은 베타-시트 구조와 연결되는 루프를 형성하며, 일부의 경우 β -시트 구조의 일부를 형성한다. 따라서 프레임워크 영역은 사슬간 비-공유 상호작용에 의해 정확한 방향으로 CDR을 위치하게 하는 스캐폴드를 형성하도록 작용한다. 위치한 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 대한 표면 상보성을 한정한다. 이러한 상보성 표면은 그의 동계(cognate) 에피토프에 대한 항체의 비-공유 결합을 증진시킨다. 각각 CDR과 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산은 정확하게 한정되어 있기 때문에 당업자에 의해 어떠한 일정 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인에 대해서도 용이하게 확인될 수 있다("Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat et al. (1983) U.S. Department of Health and Human Services; 및 Chothia and Lesk(1987) J. Mol. Biol., 196:901-917 참조, 이는 본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨).

[0070] 본 발명에 사용되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유사체는 폴리클론, 단일클론, 다중특이성, 인간, 인간화, 영장류화 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, 에피토프-결합 단편 예를 들어 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fvs, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 이황화-결합 Fvs(sdFv), V_L 또는 V_H 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에서 생성된 단편 및 항-이디오타임(항-Id) 항체(예를 들어 본원에서 개시된 C35 항체에 대한 항-Id 항체 포함; 예를 들어 Hudson, P.J. and Couriau, C, Nature Med. 9: 129-134 (2003); 미국 공개번호

20030148409; 미국 특허등록 번호 5,837,242 참조)를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. ScFv 분자는 당분야에 알려져 있고 예를 들어 미국 특허등록 번호 5,892,019에 기재되어 있다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 어떠한 형태(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 종류(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자도 될 수 있다.

[0071] 단쇄 항체를 포함한 항체 단편은 가변 영역(들)을 단독으로 또는 하기의 전체 또는 일부와 함께 포함한다: 헌지 영역, C_H1, C_H2, 및 C_H3 도메인. 또한 가변 영역(들)과 헌지 영역, C_H1, C_H2 및 C_H3 도메인과의 어떠한 조합도 포함하는 항원-결합 단편도 본 발명에 포함된다. 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용되는 항체 또는 그의 면역특이적 단편은 조류 및 포유류 등의 어떠한 동물 기원으로부터도 유래된다. 바람직하게는 항체는, 인간, 마우스, 당나귀, 토끼, 염소, 기니아 퍼그, 낙타, 라마, 말 또는 닭 항체이다. 또다른 실시태양에서 가변 영역은 기원 내(예를 들어 상어 유래) 콘드리كت호이드(condricthoi)이다. 본원에서 사용된 "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 지니는 항체를 포함하고, 하기 및 예를 들어 Kucherlapati et al.의 미국 특허등록 번호 5,939,598에 기재된 바와 같이 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 인간 면역글로불린 라이브러리 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대한 형질전환 동물에서 분리된 항체를 포함한다.

[0072] 본원에서 사용된 용어 "중쇄 부분"은 면역글로불린 중쇄에서 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩타이드는 C_H1 도메인, 헌지(예를 들어 상위, 중위 및/또는 하위 헌지 영역) 도메인, C_H2 도메인, C_H3 도메인 또는 그의 변이체 또는 단편 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어 본 발명에 사용되는 결합 폴리펩타이드는 C_H1 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬; C_H1 도메인, 일부분 이상의 헌지 영역 및 C_H2 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬; C_H1 도메인과 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬; C_H1 도메인, 일부분 이상의 헌지 영역 및 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬 또는 C_H1 도메인, 일부분 이상의 헌지 영역, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬을 포함한다. 또다른 실시태양에서 본 발명의 폴리펩타이드는 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬을 포함한다. 더욱이 본 발명에 사용되는 결합 폴리펩타이드는 일부분 이상의 C_H2 도메인(예를 들어 C_H2 도메인의 전부 또는 일부)이 부재한다. 전술된 바와 같이 이들 도메인(예를 들어 중쇄 영역)은 자연 발생적 면역글로불린 분자로부터 아미노산 서열을 변경하도록 변형됨이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0073] 본원에 개시된 특정 C35, HER2 및/또는 EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체에 있어서, 다량체의 폴리펩타이드 사슬의 중쇄 부분은 다량체의 두 번째 폴리펩타이드 사슬과 동일하다. 또한 본 발명의 중쇄 부분-포함 단량체는 동일하지 않다. 예를 들어 각각의 단량체는 예를 들어 이중특이적 항체를 형성하는 상이한 타겟 결합 부위를 포함한다.

[0074] 본원에서 개시된 진단 및 치료 방법에 사용되는 결합 폴리펩타이드의 중쇄 부분은 상이한 면역 분자에서 유래된다. 예를 들어 폴리펩타이드의 중쇄 부분은 IgG1 분자에서 유래된 C_H1 도메인과 IgG3 분자에서 유래된 헌지 영역을 포함한다. 또다른 실시태양에서 중쇄 부분은 일부는 IgG1 분자에서 일부 유래되고 IgG3 분자에서 일부 유래된 헌지 영역을 포함한다. 또다른 실시태양에서 중쇄 부분은 IgG1 분자에서 일부, IgG4 분자에서 일부 유래된 키메라 헌지를 포함한다.

[0075] 본원에서 사용된 용어 "경쇄 부분"은 면역글로불린 경쇄에서 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 경쇄 부분은 V_L 또는 C_L 도메인 중 하나 이상을 포함한다.

[0076] 본원에 개시된 항-C35, 항-HER2, 항-EGFR 또는 항-IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 인지하고 특이적으로 결합하는 항원의 에피토프(들) 또는 일부(들)의 측면에서 기재되거나 명기된다. 항체의 항

원 결합 도메인과 특이적으로 상호작용하는 타겟 폴리펩타이드 부분은 "에피토프" 또는 "항원 결정기"이다. 타겟 폴리펩타이드는 단일 에피토프를 포함하나 일반적으로는 2 이상의 에피토프를 포함하며, 항원의 크기, 입체 형태 및 타입에 따라 임의의 수의 에피토프를 포함할 수 있다. 더욱이 타겟 폴리펩타이드 상의 "에피토프"는 비-폴리펩타이드 요소이거나 이를 포함할 수 있으며, 예를 들어 에피토프는 탄수화물 측쇄를 포함할 함이 주지되어야 한다.

[0077] 항체의 펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프의 최소 크기는 약 4 내지 5개의 아미노산인 것으로 간주된다. 펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프는 바람직하게는 약 7개 이상, 더욱 바람직하게는 약 9개 이상, 가장 바람직하게는 약 15개 내지 약 30개의 아미노산을 포함한다. CDR은 그의 3차 형태로 항원성 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 인식할 수 있기 때문에 에피토프를 포함하는 아미노산은 인접할 필요가 없으며, 일부의 경우 동일한 펩타이드 사슬 상에 존재하지 않을 수 있다. 본 발명에서 본 발명의 항체에 의해 인식되는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR의 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 더욱 바람직하게는 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상 또는 약 15개 내지 약 30개의 인접 또는 비-인접 아미노산의 서열을 포함한다.

[0078] "특이적으로 결합한다"는 것은 일반적으로 항체가 그의 항원 결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고, 결합은 항체 결합 도메인과 에피토프 간에 일부 상보성을 필요로 함을 의미한다. 이러한 정의에 따라 항체는 무작위의 관련 없는 에피토프에 결합하는 것보다는 더욱 용이하게 그의 항원 결합 도메인을 통해 에피토프에 결합될 때 에피토프에 "특이적으로 결합한다"라고 간주된다. 용어 "특이성"은 본원에서 특정 에피토프에 결합하는 특정 항체에 의해 상대 친화력을 한정하는데 사용된다. 예를 들어 항체 "A"는 항체 "B" 보다 일정 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 지닌 것으로 간주되거나 항체 "A"는 관련 있는 에피토프 "D" 보다 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합됨을 나타낸다.

[0079] "우선적으로 결합한다"는 항체가 관련 있거나, 유사하거나, 동종이거나 또는 유사한 에피토프에 결합하는 것보다 더욱 용이하게 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 따라서 일정 에피토프에 "우선적으로 결합하는" 항체는 이러한 항체가 관련 있는 에피토프와 교차-반응하더라도 관련 에피토프 보다 상기 에피토프에 결합할 가능성이 더 높을 것이다.

[0080] 비제한적인 예로서 항체가 두 번째 에피토프의 항체의 K_D 보다 낮은 해리 상수(K_D)를 지닌 첫 번째 에피토프 결합하는 경우 첫 번째 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다. 또다른 비제한적인 예로서 항체가 두 번째 에피토프의 항체 K_D 보다 적어도 1승 크기 미만인 친화력을 지닌 첫 번째 에피토프에 결합하는 경우 항체는 첫 번째 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다.

[0081] 또다른 비제한적인 예로서 항체가 두 번째 에피토프의 항체 K (오프) 보다 작은 오프율(off rate, k (오프))를 지닌 첫 번째 에피토프에 우선적으로 결합하는 경우 첫 번째 에피토프에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다. 또다른 비제한적인 예로서 항체가 두 번째 에피토프의 항체 k (off) 보다 적어도 1승 크기 미만의 친화력을 지닌 첫 번째 에피토프에 결합하는 경우 항체는 첫 번째 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다. 다른 비제한적인 예로소 항체가 두 번째 에피토프의 항체 k (off) 보다 적어도 2승 크기 미만의 친화력을 지닌 첫 번째 에피토프에 결합하는 경우 항체는 첫 번째 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다.

[0082] 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-2} sec^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 또는 10^{-3} sec^{-1} 과 동일하거나 더 작은 오프율(k (off))로 본원에 개시된 타겟 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합하다고 할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 항체는 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-4} sec^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-5} sec^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$, 10^{-6} sec^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ 또는 10^{-7} sec^{-1} 과 동일하거나 더 작은 오프율

(k(off))로 본원에 기재된 타겟 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다고 할 수 있다.

[0083] 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는, $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 또는 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 과 동일하거나 더 큰 온율(k(on))로 본원에 개시된 타겟 폴리펩타이드 또는 그의 단편이 또는 변이체에 결합한다고 할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 항체는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 또는 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 과 동일하거나 더 큰 온율(k(on))로 본원에 기재된 타겟 폴리펩타이드나 또는 그의 단편 또는 변이체에 결합한다고 할 수 있다.

[0084] 본 발명의 항체는 항체가 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 어느 정도 차단하는 수준으로 에피토프에 우선적으로 결합하는 경우 일정 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 경쟁적으로 저해한다고 할 수 있다. 경쟁적 저해는 예를 들어 경쟁적인 ELISA 분석과 같은 당분야에 알려진 어떠한 방법에 의해서도 측정된다. 일정 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 90% 이상, 80% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상까지 경쟁적으로 저해한다고 할 수 있다.

[0085] 본원에서 사용된 용어 "친화력"은 면역글로불린 분자의 CDR과 개별적인 에피토프의 결합 강도의 측정치이다. 예를 들어 Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28 참조. 본원에서 사용된 용어 "결합성(avidity)"은 면역글로불린 집단과 항원간의 복합체의 전체적인 안정성을 나타내는 것으로, 즉, 면역글로불린 혼합물의 항원과의 기능적 결합 강도이다. 예를 들어 Harlow at pages 29-34 참조. 결합성은 특정 에피토프를 지닌 집단 내 개별적 면역글로불린 분자의 친화력 및 면역글로불린과 항원의 원자가(valency) 모두와 관련된다. 예를 들어 2가 단일클론 항체와 폴리머와 같은 매우 반복적인 에피토프 구조를 지닌 항원간의 상호작용은 높은 결합성 중 하나이다.

[0086] 본 발명에 사용되는 항체는 "다중 특이적", 예를 들어 이중특이적, 삼중특이적 또는 그 이상의 다중특이적이며, 이는 동시에 하나 이상의 상이한 항원(예를 들어 단백질) 상에 존재하는 2 이상의 상이한 에피토프를 인식하고 결합하는 것을 의미한다. 따라서 항체가 "단일특이적" 또는 "다중특이적" 예를 들어 "이중특이적"인지 여부는 결합 폴리펩타이드와 반응하는 상이한 에피토프의 수를 나타낸다. 다중특이적인 항체는 본원에 기재된 타겟 폴리펩타이드의 상이한 에피토프에 대해 특이적이거나 타겟 폴리펩타이드 뿐만 아니라 이종의 폴리펩타이드나 또는 고형 지지체 물질과 같은 이종의 에피토프에 대해서도 특이적이다.

[0087] 본원에서 사용된 용어 "원자가"는 본 발명의 항체, 결합 웹타이드 또는 항체 내에 존재하는 가능한 결합 도메인 예를 들어 항원 결합 도메인의 수를 나타낸다. 각각의 결합 도메인은 하나의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 결합 폴리펩타이드 또는 항체가 하나 이상의 도메인을 포함하는 경우 각각의 결합 도메인은 "2가 단일특이적"으로 명명되는 2개의 결합 도메인을 지닌 항체에 대해 동일한 에피토프에 또는 "2가 이중특이적"으로 명명되는 2개의 결합 도메인을 지닌 항체에 대해 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또한 항체는 각각의 특이성에 대해 이중특이적 및 2가일 수 있다("이중특이적 4가 항체"로 명명됨). 또다른 실시태양에서 4가 미니바디(minibody) 또는 도메인이 삭제된 항체가 제조될 수 있다.

[0088] 이중특이적 2가 항체 및 이의 제조 방법은 예를 들어 미국 특허등록 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 및 미국 출원 공개번호 2003/020734와 2002/0155537에 기재되어 있으며, 이들 문현 모두는 본원에 그 전체가 참고문현으로 포함된다. 이중특이적 4가 항체 및 이의 제조 방법은 예를 들어 WO 02/096948과 WO 00/44788에 기재되어 있으며, 이들 문현 모두는 본원에 그 전체가 참고문현으로 포함된다. 일반적으로 PCT 공개공보 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60-69; 미국 특허등록 번호 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547-1553 참조.

- [0089] 상기 나타난 바와 같이 다양한 면역글로불린 종류의 서브유니트 구조와 불변 영역의 3차 구조는 잘 알려져 있다. 본원에서 사용된 용어 "V_H 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함하고, 용어 "C_H1 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 첫 번째(아미노 최말단) 불변 영역 도메인을 포함한다. C_H1 도메인은 V_H 도메인에 인접하여 있고, 면역글로불린 중쇄 분자의 헌지 영역의 아미노 말단이다.
- [0090] 본원에서 사용된 용어 "C_H2 도메인"은 예를 들어 통상적인 번호부여 스키임을 이용하여 항체의 약 244번 잔기에서 360번 잔기까지 이르는(잔기 244 내지 360, Kabat 번호부여 시스템; 및 잔기 231-340, EU 번호부여 시스템; Kabat EA et al. op. cit. 참조) 중쇄 분자의 일부를 포함한다. C_H2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는 특이한 도메인이다. 오히려 2개의 N-연결 분지형 탄수화물 사슬이 완전한 고유 IgG 분자의 2개의 C_H2 도메인들 사이에 삽입되어 있다. C_H3 도메인은 IgG 분자의 C_H2 도메인에서 C-말단까지 이르고 약 108개의 잔기를 포함함이 잘 입증되어 있다.
- [0091] 본원에서 사용된 용어 "헌지 영역"은 C_H1 도메인을 C_H2 도메인에 연결하는 중쇄 분자의 일부이다. 이러한 헌지 영역은 약 25개의 잔기를 포함하고 유연하며, 따라서 2개의 N-말단 항원 결합 영역을 독립적으로 움직일 수 있게 한다. 헌지 영역은 3개의 별개의 도메인으로 세분된다: 상위, 중위 및 하위 헌지 도메인(Roux et al. (1998) J. Immunol. 161:4083).
- [0092] 본원에서 사용된 용어 "이황화 결합"은 2개의 항원 사이에 형성된 공유 결합을 포함한다. 아미노산 시스템은 두 번째 티올기와 이황화 결합을 형성하거나 가교 형성할 수 있는 티올기를 포함한다. 대부분의 자연 발생적 IgG 분자에서 C_H1과 C_L 영역은 이황화 결합에 의해 연결되고 2개의 중쇄는 Kabat 번호부여 시스템을 이용하여 239 내지 242에 대응되는 위치(226 또는 229번 위치, EU 번호부여 시스템)에서 2개의 이황화 결합에 의해 연결된다.
- [0093] 본원에서 사용된 용어 "키메라 항체"는 면역반응성 영역 또는 부위가 첫 번째 종으로부터 수득되거나 유래하고, 불변 영역(본 발명에 따라 완전하거나 부분적이거나 변형된)은 두 번째 종으로부터 수득된 어떠한 항체도 의미한다. 바람직한 실시태양에서 타겟 결합 영역 또는 부위는 비-인간 공급원(예를 들어 마우스 또는 영장류)에서 유래될 것이고, 불변 영역은 인간 유래이다.
- [0094] 본원에서 사용된 용어 "조작된 항체"는, 중쇄, 경쇄 또는 이 둘 모두의 가변 도메인이 알려진 특이성의 항체로부터 일정 부분 이상의 하나 이상의 CDR 대치에 의해, 필요한 경우 부분적 프레임워크 영역 대치 및 서열 변화에 의해 변경된 항체를 나타낸다. CDR이 프레임워크 영역이 유래된 항체와 동일한 종류 또는 서브클래스의 항체에서 유래하더라도 CDR은 상이한 종류의 항체, 바람직하게는 상이한 종에서 유래한 항체에서 유래할 것으로 판단된다. 알려진 특이성의 비-인간 항체 유래의 하나 이상의 "공여" CDR이 인간 중쇄 또는 경쇄 프레임워크 영역에 이식된 조작 항체는 본원에서 "인간화 항체"로 표기된다. 모든 CDR을 공여 가변 도메인 유래의 완전한 CDR로 치환하여, 하나의 가변 도메인의 항원 결합하는 능력을 다른 곳으로 이동할 필요는 없다. 오히려, 타겟 결합 부위의 활성을 유지하는데 필요한 잔기를 이동하는 것만 필요하다. 이러한 설명은 예를 들어 미국 특허등록 번호 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, 및 6,180,370에 나타나 있고, 일반적인 실험을 수행하거나 기능적으로 조작되거나 인간화된 항체를 수득하기 위한 시행착오 시험에 의해 당업자의 능력 내에서 자명할 것이다.
- [0095] 본원에서 사용된 용어 "적합하게 중첩된 폴리펩타이드"는 폴리펩타이드를 포함하는 모든 기능적 도메인이 명백하게 활성인 폴리펩타이드(예를 들어 C35 항체)를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "부적합하게 중첩된 폴리펩타이드"는 폴리펩타이드의 하나 이상의 기능적 도메인이 활성이 아닌 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 실시태

양에서 적합하게 중첩된 폴리펩타이드는 하나 이상의 이황화 결합으로 연결된 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 역으로 부적합하게 중첩된 폴리펩타이드는 하나 이상의 이황화 결합으로 연결되지 않은 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.

[0096] 본원에서 사용된 용어 "조작된"은 합성 방법에 의한(예를 들어 재조합 기술, 시험관내 펩타이드 합성, 효소적 또는 화학적 펩타이드 결합 또는 이들 기술의 조합에 의한) 핵산 또는 폴리펩타이드 분자의 조작을 포함한다.

[0097] 본원에서 사용된 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어는 화학적 컨ью게이션 또는 재조합 수단을 포함한 어떠한 수단에 의해서도 2 이상의 요소 또는 구성성분을 함께 연결하는 것을 나타낸다. "인-프레임 융합(in-frame fusion)"은 본래 ORF의 정확한 번역 리딩 프레임을 유지하는 방식으로 연속적인 더 긴 ORF를 형성하는 2 이상의 폴리펩타이드 오픈 리딩 프레임(ORF)의 연결을 나타낸다. 따라서 재조합 융합 단백질은 본래 ORF에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 대응되는 2 이상의 분절(분절이 정상적으로는 자연적으로 연결되어 있지 않은)을 포함하는 단일 단백질이다. 따라서 리딩 프레임은 융합된 분절 전체에서 연속적으로 생성되나 분절은 예를 들어 인-프레임 링커 서열에 의해 물리적 또는 공간적으로 분리된다. 예를 들어 면역글로불린 가변 영역의 CDR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 인-프레임으로 융합되나 "융합된" CDR이 연속적 폴리펩타이드의 일부로서 동시-번역되는 한 하나 이상의 면역글로불린 프레임워크 영역 또는 추가 CDR 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 분리된다.

[0098] 폴리펩타이드와 관련하여 "선형 서열" 또는 "서열"은 서열 내 서로 인접한 잔기가 폴리펩타이드의 1차 구조 내에서 인접하는 아미노에서 카르복시 말단 방향의 폴리펩타이드 내 아미노산 순서이다.

[0099] 본원에서 사용된 "발현"은 유전자가 생화학 물질 예를 들어 폴리펩타이드를 생성하는 과정을 나타낸다. 상기 과정은 제한 없이 유전자 넉다운뿐만 아니라 일시적인 발현 및 안정적인 발현도 포함하는 세포 내 유전자의 기능적 존재의 어떠한 표명도 포함한다. 이는 유전자의 메신저 RNA(mRNA)로의 전사 및 이러한 mRNA의 폴리펩타이드(들)로의 번역을 제한 없이 포함한다. 최종적인 바람직한 생성물이 생화학적 산물인 경우 발현은 그러한 생화학적 물질 및 어떠한 전구체의 생성도 포함한다. 유전자의 발현은 "유전자 생성물"을 생성한다. 본원에서 사용된 유전자 생성물은 핵산, 예를 들어 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA 또는 전사체로부터 번역된 폴리펩타이드도 될 수 있다. 본원에 기재된 유전자 생성물은 예를 들어 폴리아데닐화와 같은 전사 후 변형을 지닌 핵산 또는 예를 들어 메틸화, 당화, 지질의 첨가, 그 외 단백질 서브유니트와의 결합, 단백질분해성 분열 등과 같은 번역 후 변형을 지닌 폴리펩타이드를 더욱 포함한다.

[0100] 본원에서 사용된 용어 "치료한다" 또는 "치료"는 치료학적 치료 및 예방학적 또는 예방적 조치 모두를 나타내며, 그 목적은 다발성 경화증의 진행과 같은 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애를 예방하거나 감퇴(약화)시키고자하는 것이다. 유익하거나 또는 바람직한 임상 결과로는 검출가능하거나 검출불가능하든지 관계없이 증상의 완화, 질병의 범위 축소, 질병의 안정(즉, 악화되지 않음) 상태, 질병 진행의 지연 또는 서행, 질병 상태의 개선 또는 완화 및 진정(부분적 또는 전반적)을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 또한 "치료"는 치료를 받지 않은 경우에 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 개체는 이상 또는 장애를 이미 지닌 개체뿐만 아니라 이상 또는 장애에 걸리기 쉬운 개체 또는 이상 또는 장애가 예방되어야 하는 개체를 포함한다.

[0101] "피험체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유류"는 진단, 예후 또는 치료가 바람직한 어떠한 개체, 특히 포유류 피험체도 의미한다. 포유류 피험체는 인간, 가축, 사육 동물 및 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 축우, 육우와 같은 동물원, 스포츠 또는 애완 동물을 포함한다.

[0102] 본원에서 사용된 "C35, HER2 및/또는 EGFR 항체의 투여가 유익할 피험체" 및 "치료가 요구되는 동물"과 같은 문

구는 C35, HER2 및/또는 EGFR 항체의 투여가 유익할 포유류 피험체와 같은 피험체를 포함한다. 본원에 더욱 상세하게 기재된 바와 같이 본 발명의 항체는 컨쥬게이트되지 않은 형태로 사용되거나 예를 들어 약물, 전구약물 또는 동위원소에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0103] II. C35, HER2, EGFR 및 IGFR 타겟 폴리펩타이드

[0104] C35는 유방암 및 흑색종, 결장 암종, 난소암, 간세포 암종, 방광암 및 퀘장암을 포함한 다른 종양 타입 내에서 차별적으로 발현되는 항원이다. C35 단백질은 프레닐화되고 내부 세포막과 결합하나 생존 종양 세포의 표면 세포막 상에서는 검출 불가능한 것으로 나타났다. C35 에피토프를 면역특이적으로 인식하는 마우스 단일클론 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 포함한 많은 항체가 존재한다. 미국 출원 공개 번호 2005/0158323 및 미국 특허 출원 번호 11/812,996 참조(본원에 참고문헌으로 포함됨). 또한 본 발명자들은 화학치료제 또는 방사선조사로의 치료에 의한 종양 세포 내 아폽토시스 유도가 완전한 종양 세포를 C35-특이적 항체에 의해 인식되게 하는 C35의 표면 세포막 노출을 유발함을 입증하였다.

[0105] C35 폴리펩타이드 및 아미노산 서열(서열번호: 1 및 2):

```

gcccgcg atg agc ggg gag ccg ggg cag acg tcc gta gcg ccc cct ccc
Met Ser Gly Glu Pro Gly Gln Thr Ser Val Ala Pro Pro Pro
1 5 10

gag gag gtc gag ccg ggc agt ggg gtc cgc atc gtg gtg gag tac tgt
Glu Glu Val Glu Pro Gly Ser Gly Val Arg Ile Val Val Glu Tyr Cys
15 20 25 30

gaa ccc tgc ggc ttc gag gcg acc tac ctg gag ctg gcc agt gct gtg
Glu Pro Cys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Leu Glu Leu Ala Ser Ala Val
35 40 45

aag gag cag tat ccg ggc atc gag atc gag tcg cgc ctc ggg ggc aca
Lys Glu Gln Tyr Pro Gly Ile Glu Ile Glu Ser Arg Leu Gly Gly Thr
50 55 60

ggt gcc ttt gag ata gag ata aat gga cag ctg gtg ttc tcc aag ctg
Gly Ala Phe Glu Ile Glu Ile Asn Gly Gln Leu Val Phe Ser Lys Leu
65 70 75

gag aat ggg ggc ttt ccc tat gag aaa gat ctc att gag gcc atc cga
Glu Asn Gly Phe Pro Tyr Glu Lys Asp Leu Ile Glu Ala Ile Arg
80 85 90

aga gcc agt aat gga gaa acc cta gaa aag atc acc aac agc cgt cct
Arg Ala Ser Asn Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Ser Arg Pro
95 100 105 110

ccc tgc gtc atc ctg tga
Pro Cys Val Ile Leu
115

```

[0106] [0107] 최근 암 연구는 세포가 HER2 또는 EGFR을 과발현하는 암의 치료를 위한 재조합 인간화 단일클론 항체의 용도에 집중되고 있다. HER2 서열은 당분야에 알려져 있고 유전자은행 수납 번호 NP_001005862, NP004439, AAA75493 또는 AAA35978을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. EGFR에 대한 서열도 당분야에 알려져 있고 유전자은행 수납 번호 AAB 19486, AAH94761, AAI28420 및 AAI1 8666을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 최종적으로 일반적인 인간 IGFR 전구체의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 유전자은행 수납 번호 X04434 또는 NM 000875 및 미국 특허등록 번호 7,217,796에서 명기된 것을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 전구체의 분열(예를 들어 710번과 711번 아미노산 사이의)은 성숙 IGFR를 형성하도록 결합되는 α -서브유니트 및 β -시트를 생성한다.

[0108]

HER2 유전자는 EGFR을 암호화하는 유전자와 밀접하게 관련되나 이와 구별된다. HER2 유전자의 증폭은 인간 유방암세포 내 종양성 변환과 연계된다. HER2 과발현은 20~30%의 유방암 환자에서 확인되었고, 이는 지역적 진행질환, 증가된 종양 재발 가능성 및 감소된 환자 생존과 상호관련된다. 위암, 자궁내막암, 타액선암, 비-소세포폐암, 퀘장암, 난소암, 복막암, 전립선암 또는 대장암을 지닌 30~40% 정도의 환자도 이러한 단백질의 과발현을 나타낸다. 소량의 HER2 단백질은 조직-특이적 방식으로 정상 세포의 형질막 상에서 발현된다. 이러한 단백질은 성장 인자 리간드에 결합하는 다른 ERBB 수용체와의 이형이량체 수용체 복합체 일부로 존재한다. HER2 수용체를 활성화하는 이러한 리간드의 결합은 세포 외부에서 세포핵으로의 성장 신호의 전송을 유발한다. 이들 성장 신호는 정상 세포 성장 및 분열 양상을 조절한다. 정상 세포 내 HER2 유전자의 변형은 HER2 단백질의 과발현을 유발하여 증가된 세포 분열, 증가된 세포 성장 속도를 야기하고, 암세포 표현형으로의 변환과 관련된다. 이러한 HER2 유전자 변형이 종양 세포에서 발생하는 경우 HER2 단백질은 직접적으로 과발현되거나 유전자 증폭이 유전자의 다수 복사체 및 HER2 단백질의 후속 과발현을 유발한다. 이들 변형을 야기하는 인자(들)는 현재 알려져 있지 않다.

[0109]

EGFR 과발현도 결장암(Resnick, M.B., et al, Clin Cancer Res. 10:3069-3075 (2004)), 직장암(Kopp, R., et al, Dis Colon Rectum 46: 1391-1399 (2003)), 비-소세포 폐암(Selvaggi, G., et al, Ann Oncol. 15:28-32 (2004)) 및 유방암(Witton, C.J., et al, J Pathol. 200:290- 297 (2003); Tsutsui, S. et al, Clin Cancer Res. 5:3454-3460(2002))의 불충분한 생존 및 재발과 관련됨이 입증되었다. 또한 EGFR 발현 상태는 유도 화학치료법 및 방사선치료법 후 불충분한 결과를 지니게 될 진행 비인장 암종의 환자 하위군을 확인할 수 있음이 제안되었다(Chua, D.T. et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 59:11-20 (2004)). EGFR 발현은 전립선암에서 질환 재발 및 안드로겐-독립성으로의 진행과 상호관련된다는 증거가 존재한다(Di Lorenzo, G. et al, Clin Cancer Res. 5:3438-3444 (2002)). 따라서 임상 실습시 EGFR의 검출은 EGFR-타겟된 약물 용도의 타당성의 의문을 포함한 환자 관리에 영향을 미칠 수 있다.

[0110]

또한 IGFR의 과발현은 여러 암세포주 및 종양 조직에서 입증되었다. IGFR은 모든 유방암 세포주의 40%(Pandini, et al, Cancer Res. 5:1935 (1999)) 및 폐암 세포주의 15%에서 과발현된다. 유방암 종양 조직에서 IGFR은 6~14배 과발현되고 IGFR은 정상 조직과 비교시 2~4배 높은 키나제 활성을 나타낸다(Webster, et al, Cancer Res. 5(5):2781 (1996); Pekonen, et al, Cancer Res. 48:1343 (1998)). 대장암 조직 생검의 90%는 증가된 IGFR 수치를 나타내고, IGFR 발현 정도는 질병 중등도와 상호관련된다. 1차 자궁경부 암세포 배양액 및 자궁경부암 세포주의 분석은 정상 외자궁경관 세포와 비교시 각각 3-배 및 5-배 IGFR 과발현을 나타내었다(Steller, et al, Cancer Res. 56:1762 (1996)). 또한 활막 육종 세포의 IGFR 발현도 침윤성 표현형과 상호관련된다(즉 전이 및 높은 증식 속도; Xie, et al, Cancer Res. 59:3588 (1999)).

[0111]

HER2, EGFR 또는 IGFR 수용체 단백질의 "과발현"은 조직 또는 기관 유래 정상 세포 내 발현 수치 대비 환자의 특정 조직 또는 기관 내 종양 유래 세포 내의 각각 HER2, EGFR 또는 IGFR의 비정상적 발현 수치를 나타낸다. HER2, EGFR 또는 IGFR 수용체의 과발현을 특징으로 하는 암을 지닌 환자는 당분야에 알려진 표준 분석에 의해 측정될 수 있다. 과발현은 면역조직화학(IHC) 검출을 이용하여 동결 또는 파라핀-포매 조직 절편의 고정 세포에서 측정될 수 있다. 조직학적 염색과 결합되는 경우 타겟된 단백질의 위치가 측정될 수 있고 종양 내 그의 발현 정도는 정량적 및 비-정량적으로 모두 측정될 수 있다. 이러한 IHC 검출 분석은 당분야에 알려져 있고 임상 시험 분석(CTA), 통상적으로 이용 가능한 LabCorp 4D5 시험 및 통상적으로 이용 가능한 DAKO HercepTest™(DAKO, Carpinteria, Calif.)를 포함한다. 후자 분석은 HER2 단백질의 과발현을 지닌 암을 확인하기 위해 특정 범위의 0 내지 3+ 세포 염색(0은 정상 발현, 3+은 가장 강한 양성 발현을 나타냄)을 이용한다(Trastuzumab full prescribing information; September 1998; Genentech, Inc., San Francisco, Calif. 참조). 따라서 1+, 2+ 또는 3+, 특히 2+ 또는 3+ 범위로 HER2 단백질의 면역조직화학(IHC) 또는 형광 동소 보합법(FISH)에 의한 과발현을 특징으로 하는 암을 지닌 환자는 본 발명의 치료 방법이 유리할 것이다.

[0112]

표준 검출 분석을 이용하여 여러 형태의 암이 HER2, EGFR 또는 IGFR 수용체를 과발현하는 세포를 지닌 것으로 특징 부여되었다. 이러한 암은 유방암, 위암, 자궁내막암, 전립선암, 방광암, 대장암 및 교모세포종을 포함하나

이에 한정적인 것은 아니다. 본 발명의 방법은 세포가 C35 및 HER2, EGFR 또는 IGFR 단백질을 과발현하는 어떠한 암의 치료/관리에도 유용하다. 특히 중요한 것은 유방암이다.

[0113] III. C35, HER2 및 EGFR 항체

[0114] 본 발명은 C35, HER2 또는 EGFR에 대한 항체(본원에서 항-C35, 항-HER2 또는 항-EGFR 항체; 또는 HER2 또는 EGFR 항체로도 표기됨) 및 C35와 HER2 또는 C35와 EGFR 항체의 조합을 이용한 암 치료 방법에 관한 것이다. 항체에 관한 상기 설명은 본원에 기재된 C35, HER2 및 EGFR 항체에도 적용된다.

[0115] 본 발명은 C35, HER2 또는 EGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편, 변이체 또는 융합 단백질에 면역특이적으로 결합하는 항체(항체 단편 또는 그의 변이체를 포함하거나 그로 구성된 분자 포함)를 포함한다. C35 폴리펩타이드는 서열번호: 2의 C35 폴리펩타이드를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. HER2 폴리펩타이드는 유전자은행 수납 번호 AAA75493 또는 AAA35978의 HER2 폴리펩타이드를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. EGFR 폴리펩타이드는 유전자은행 수납 번호 AAB19486, AAH94761, AAI28420 및 AAI18666을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. C35, HER2 또는 EGFR 폴리펩타이드는 핵산의 재조합 발현을 통해 생성된다(WO 01/74859 and U.S. Appl. No. 2004/0063907 for epitope-containing fragments of C35 참조).

[0116] HER2 수용체 기능을 타개하는 가장 널리 인식되는 단일클론 항체는 상표명 Herceptin(일반적으로 트라스투추맵, huMAb4D5-8 또는 rhuMAb HER2로 알려짐; 미국 특허등록 번호 5,821,337 및 Genentech, Inc., San Francisco, Calif.에서 구입 가능)으로 판매된다. 이러한 재조합 인간화 단일클론 항체는 HER2에 대한 높은 친화력을 지닌다. 광범한 유방 암종을 지닌 환자로의 초기 임상 시험은 HER2를 과발현하는 유방 암세포의 성장을 저해할 수 있는 이러한 단일클론 항체의 능력을 입증하였다(Baselga et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14(3):737-744). 이러한 시험에서 전이 유방암 환자의 트라스투추맵으로의 단일치료법은 14%의 전체 반응율을 야기하였다(2%의 완전한 반응자 및 12%의 부분적 반응자). 반응의 중간 존속기간은 9.1개월이었고, 중간 생존은 12.8개월(0.5 내지 24+ 개월 범위)이었다. 24%의 환자는 5.8개월에 진행이 없었다(Genentech, Inc., 파일 상의 데이터). HER2 과발현 정도는 처리 효과를 예측하였다.

[0117] 가장 널리 인식되는 HER2 항체가 트라스투추맵인 경우 본 발명의 방법은 이러한 항체의 용도를 제한하지 않는다. 마우스 기원 및 인간화 및 키메라 버전의 또다른 HER2 항체도 본 발명의 방법에 사용하기에 적당하다. 이러한 또다른 HER2 항체의 예는 4D5 항체(미국 특허등록 번호 5,677,171 및 5,772,997에 기재됨); 및 452F2, 736G9, 741F8, 758G5 및 761B10으로 지정된 520C9 항체 및 그의 기능적 동등물(미국 특허등록 번호 6,054,561에 기재됨)(본원에 참고문헌으로 포함됨)을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 더욱이 새로운 HER2 항체는 당분야에 알려진 방법을 이용하여 생성될 수 있는 것 또는 본원에 기재된 것이 될 수 있다.

[0118] EGFR의 세포외 영역에 대한 항체의 생성에 대한 많은 연구가 집중되고 있다. 생성된 mAbs는 주로 리간드 결합 차단 및 신호전달 봉괴에 의해 항-종양 활성을 매개한다. EGFR을 특이적으로 인식하기 위해 Peng et al. 1996(Peng D et al Cancer Res 1996, 56:3666-3669) 및 Mendelson et al. 1997(Mendelsohn J Clin Cancer Res 1997, 3:2703-2707)에 의해 최초로 개발된 여러 mAb가 존재하였다. 두경부 편평세포 암종 환자를 치료하는데 Mabs 425, 528 IgG2a 및 225 IgG1이 사용되었다(Sturgis E M, et al Otolaryngol. Head Neck Surg 1994, 111:633-643). 방사선표지를 포함한 실험 작업은 mAb 425가 신경아교종을 포함한 종양 성장의 효과적인 저해제임을 나타내었다(Rodeck U et al J Cell Biochem 1987, 35:315-320; Brady L W et al Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991, 22:225-230; Faillot T et al Neurosurgery 1996, 39:478-483). IMC-C225 mAb는 EGFR을 특이적으로 인식하고, 두경부암, 대장암, 췌장암 및 폐암과 같은 암 치료시 많은 가능성을 지닌다. mAb244는 p27 K1P1을 상향-조절하고 전립선암 세포주에서 G1 저지를 유도한다. 세특시맵(ERBITUX)으로도 알려진 IMC-C225는 인간 EGFR의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 재조합 인간/마우스 키메라 단일클론 항체이다. 세특시맵은 EGFR에 대한 리간드 결합을 차단하고 수용체 활성화를 방지하며 EGFR을 발현하는 종양 세포의 성장을 저해하는

EGFR 길항제이다. 세툭시맙은 이리노테칸(irinotecan)-기반 화학치료법에 불응성이거나 이를 견디지 못하는 표피 성장 인자 수용체-발현 전이성 대장암 환자의 치료시 이리노테칸과 함께 또는 단독으로 사용 승인되었다.

[0119] mAb R3은 EGFR에 대해 생성되었고 최초로 방사선면역치료법에 사용하기 위해 개발되었다(Waterfield M D, et al. J. Cell Biochem. 1982, 20:149-161 ; Ramos-Suzarte M, et al. J. Nucl. Med. 1999, 40:768-775). R3의 키메라 및 인간화 형태 모두가 제조되었고 아프리카 녹색 원숭이에서 시험되었다. R3의 인간화 버전은 마우스 항체와 동일한 결합 친화력을 보유하였고, 키메라 항체보다 2-배 덜 면역원성인 것으로 나타났다. 테크네튬-표지 마우스 및 인간화 mAb를 이용한 마우스의 이종이식 전임상 연구는 마우스보다 인간화 버전을 지닌 진단 도구로서 더 큰 가능성을 나타내었다. 래트 항-EGFR mAb, ICR62는 마우스 내에서 리간드 결합에 대해 효과적으로 경쟁하고 인간 종양 이종이식(편평세포 암종)을 박멸하였다. I기 임상 시험은 항체가 편평세포 암종 환자에 안정하게 투여되었음을 보고하였고, 그 후 두경부 편평세포 암종 세포주 내 성장 인자 수용체 및 그의 리간드의 신호전달 경로를 조사하는데 사용되었다(0-charoenrat P et al Clin. Exp. Metastasis 2000, 18:155-161; 0-charoenrat P et al. Int. J. Cancer 2000, 86: 307-317; 0-charoenrat P et al Oral Oncol. 2002, 38:627-640).

[0120] 또한 본 발명은 하나 이상의 암을 치료하기 위해 피항체, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간에 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 HER2 항체를 투여하는 단계를 포함한 항체-기반 치료방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 하나 이상의 암을 치료하기 위해 피항체, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간에 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함한 항체-기반 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 치료 화합물은 본 발명의 항체(본원에 기재된 그의 단편, 유사체 및 유도체 포함)를 포함하거나 이에 한정적인 것은 아니다. 본 발명의 항체는 당분야에 알려지거나 본원에 기재된 약제학적으로 허용 가능한 조성물 내에 제공된다.

[0121] 본 발명의 항체는 폴리클론, 단일클론, 다중특이적, 인간, 인간화, 영장류화 또는 키메라 항체, 단체 항체, scFv, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetraabody), 미니바디, 도메인-삭제 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함) 및 상기한 어떠한 것의 에피토프-결합 단편을 포함하거나 이에 한정적인 것은 아니다. 본원에 사용된 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 나타낸다. 본 발명의 면역글로불린 분자는 어떠한 타입(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 종류(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자도 될 수 있다.

[0122] C35 폴리펩타이드에 특이적인 하이브리도마 세포주 1F2.4.1 및 1B3.6.1은 종전 하이브리도마 기술을 이용하여 제조되었다. 항체는 표준 방법을 이용한 단백질 G 친화력 정제에 의해 하이브리도마 상청액으로부터 분리되었다. 2개의 하이브리도마 세포주 1F2 및 1B3 유래의 항체는 ELISA 및 웨스턴 블러트 분석시 재조합 C35 단백질에 특이적으로 결합한다. 또한 하이브리도마 세포주 1F2 유래의 항체는 면역조직화학법에 의해 포르말린 고정되고 파라핀 포매된 C35 양성 종양 및 세포주를 특이적으로 염색한다. 이들 항체 각각은 별개의 것이나 이 둘 모두는 C35 단백질에 대해 특이적이다. 이들 항체로 C35 단백질을 세포 용해질로부터 면역침강시키고 다른 것으로 검출하는 것이 가능하다. 경쟁적 결합 ELISA 분석은 하이브리도마 세포주 1F2 및 1B3에 의해 생성된 단일클론 항체가 C35 단백질의 상이한 에피토프에 결합함을 나타낸다.

[0123] 1F2 및 1B3 항체의 VL 및 VH 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 본원에 참고문헌으로 포함된 Evans et al 미국 공개 번호 US20050158323에 기재된 바와 같이 TOPO 벡터 내로 클론되었고, 이는 표 2에 명기된 날짜에 미국표준균주배양수록보존소(American Type Culture Collection, "ATCC")에 기탁되고 표 2에 명기된 ATCC 수탁 번호를 제공받았다. ATCC는 미국 버지니아주 20110-2209 매나세스 유니버시티 불레바드 10801에 소재한다. ATCC 기탁은 특히 절차의 목적을 위한 미생물 기탁 국제 승인 상의 부다페스트 조약의 협약에 준하여 이루어졌다.

[0124] 1F2 중쇄 서열을 지닌 클론 1F2G는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁 번호 PTA-5639를 제공받았다. 1F2 경쇄 서열을 지닌 클론 1F2K는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고, ATCC 수탁 번호 PTA-5640을 제공받았다. 1B3 중쇄 서열을 지닌 클론 1B3G는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁 번호 PTA-5637을 제공받았다. 1B3 경쇄 서열을 지닌 클론 1B3K는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁 번호 PTA-5638을 제공받았다.

표 1. 마우스 항-C35 가변 영역을 암호화하는 기탁된 폴리뉴클레오타이드 클론

폴리뉴클레오타이드 클론	ATCC 수탁번호	수탁일자
1F2G	PTA-5639	2003년 11월 11일
1F2K	PTA-5640	2003년 11월 11일
1B3G	PTA-5637	2003년 11월 11일
1B3K	PTA-5638	2003년 11월 11일

[0125]

[0126] 기탁된 클론의 마우스 가변 영역 유전자 및 벡터 부분의 서열은 하기에 나타나 있다.

이텔릭체 = Topo 벡터 서열(기탁된 클론 내에 포함됨)

점선 밀줄 = Topo 벡터의 EcoR1 클로닝 부위

소문자 = generacer 프라이머를 포함하는 5' 비변역 영역

ATG = 마우스 신호 웨일드 타이드 시작

굵은 글자체 = 프레임 워크 영역(FWR)

이중 밀줄 = CDR1, CDR2 또는 CDR3

밀줄 = 마우스 IgG1 또는 카파 불변 영역의 5' 부분

[0127]

[0128] 1F2 마우스 항-C35 V감마1 유전자 폴리뉴클레오타이드 서열(클론 1F2G 유래)(서열번호: 3):

GAATTTAGCGGCCGCGAATTGCCCTTcgactggaggcacgggacactgacatggactgaaggagtaaaaaa
 catctctctcatagaggttgcattttggggaaacagggtgtgcctaaagg
ATGAAAGTGTGAGTCTGTTGACCTGTTGACAGCCATTCTGGTATCCTGTCTGATGTACAGCTTCAGGA
GTCAGGACCTGGCCTCGTGAACC
TTCTCAGTCTCTGCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTCTGGAACTGGATGGGA
TCCGG
CDR1
CAGTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTAGCAATAA
CDR2
CTCCAACCCATCTCTCAAAATCGAATCTCCTTCACTCGTGACACATCTAAGAACCAAGTTTCTGAAGT
TTAATTCTGTGACTACTGACGACTCAGCTGCATATTACTGTACAAGAGGAACCTACGGGGTTGCTTACTGG
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCAAGCCAA
CDR3
AACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAACTCAAAGGGCGAATTG
TTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTT
 SIGNAL PEPTIDE = 18 AA
 FR 1 = 30 AA
 CDR 1 = 6 AA
 FR 2 = 14 AA
 CDR 2 = 16 AA
 FR 3 = 32 AA
 CDR 3 = 7 AA
 FR 4 = 11 AA

[0129]

[0130] 1F2 VH 아미노산 서열(클론 1F2G에서 암호화됨)(서열번호: 4):

DVQLQESGPGLVKPSQLSLTCSVTGYSITSGYFWNIRQFPGNKLEWMGYISYDGNSNSNPSLKNRISFT
 RDTSKNQFFLKFNSVTTDDSAAYYCTRGTTGFAYWGQGTLVTVSA

[0131]

[0132]

1F2 마우스 항-C35 카파 V 유전자 폴리뉴클레오타이드 서열(클론 1F2K 유래)(서열번호: 5):

CGCGAATTCGCCCTTTcgactggagcacgaggacactggacatggactgaaggagttagaaaaattacttaggg
accaaaattcaaaacacagaATGGATTTCAGGTGCAGATTTCAGCTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCA
GAATGTCCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCGATCTCCAGGGGAGAAGGTC
ACCATATCCTGCAGTGCCAAGTGTAAAGTTACATG

CDR1

AACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGA
TTTATCACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGTCT

CDR2

GGGACCTCTTACTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC
CAACAGTATCATAGTTACCCACCCACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAA

CDR3

AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAAAGGGCGAATTCGTT

SIGNAL PEPTIDE = 22 AA

FR1 = 23 AA

CDR 1 = 10 AA

FR 2 = 15 AA

CDR 2 = 7 AA

FR 3 = 32 AA

CDR 3 = 9 AA

FR 4 = 10 AA

[0133]

1F2-VK 아미노산 서열(클론 1F2K 유래)(서열번호: 6):

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIYHTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS
LTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPPTFGGGTKLEIK

[0134]

1B3 마우스 항-C35 V감마 V-유전자(클론 1B3G에 의해 암호화됨)(NC1-A7 V139-D-J1(VH36-60) M13281)(서열번호: 7):

CGCGAATTCGCCCTTTcgactggagcacgaggacactggacatggactgaaggagttagaaaaatctctcac
tggaggctgattttgaagaaagggttggctaaaagATGATGGTGTAAAGTCTTGTACCTGTTGA
CAGCCCTTCCGGTATCCTGTCAGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTAGCCTCGTGAACCTCTCAG
ACTCTGTCCTCACCTGTTCTGTCACTGGCAGTCCATCACCACCAGTGGTACTGGAACTGGATCCGAAATT
CCCAGGAAATA

CDR1

AACTTGAATACGTGGGGTACATAAGCTACAGTGGTGCACTTACTACAATCCATCTCTC
CDR2

AAAAGTCGAATCTCCATCACTCGAGACACATCCAAGAACCACTACTACCTGCAGTTGAATTCTGTGACTAC
TGAGGACACAGCCACATATTACTGTCAGAGGTGCCTACTACGGGGGGCTTTTCCTTACTTCGATG
TCTGGGCGCTGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

CDR3

GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCAAGGGCGA
ATTCGTTAAACCTGC

SIG PEP = 18 AA

FR1 = 30AA

CDR 1 = 5 AA

FR2 = 14 AA

CDR2 = 16 AA

FR 3 = 32 AA

CDR 3 = 14 AA

FR 4 = 11 AA

[0137]

1B3 VH 아미노산 서열(클론 1B3G에 의해 암호화됨)(서열번호: 8):

EVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYVGYISYSGGTYYNPSLKSRISITR
DTSKNHYYLQLNSVTTEDTATYYCARGAYGGAFFPYFDVWGAGTTVSS

[0139]

[0140] 1B3 마우스 항-C35 카파 V-유전자(클론 1B3K 유래)(서열번호: 9):

GAATTCGCCCTTcccctggaggacacga
 ggacactgacatggactgaaggagttagaaaatcagttccgtccaggacacagtttagatATGAGGTTCCAG
GTTCAGGTTCTGGGCTCTCTGCTCTGGATATCAGGTGCCACTGTGATGTCAGATAACCCAGTCTCC
ATCTTTCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATTAAATTGCAGGGCAAGTAAGTACATTAGCA
CDR1
AACATTTAGTCTGGTATCAGGGAGAAACCTGGAGAAACTAAAAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTG

CAACCTGGACTCCATCAAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGA

CDR2

TTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACTGTCAACAGCATAATGAAT

ACCCGCTCACGTTGGTGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT

CDR3

GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAAAGGGCGAATT

SP = 20AA
 FR1=23 aa
 CDR1 = 11 aa
 FR2 = 15 aa
 CDR2 = 7 AA
 FR3 = 32 aa
 CDR 3 = 9 AA
 FR 4 = 10 AA

[0141]

[0142] 1B3 VK 아미노산 서열(클론 1B3K에 의해 암호화됨)(서열번호: 10):

DVQITQSPSFLAASPGETITINCRASKYISKHLVWYQEKPGETKKLLIYSGSTLQSGLPSRFSGSGSGTDF

[0143]

[0144] 본 발명의 C35 항체는 본 발명의 서열번호: 2의 C35 폴리펩타이드, 폴리펩타이드 단편 또는 변이체 및/또는 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체를 포함한다(특이적 항체-항원 결합을 분석하기 위한 당분야에 잘 알려진 면역분석에 의해 측정됨).

[0145] 본원에 사용된 용어 "분리된"은 화합물이 자연 발생한 것과 상이한 환경 내에 존재하는 목적 화합물(예를 들어 C35 항체)을 의미한다. "분리된"은 목적 화합물이 실질적으로 풍부하거나/또는 목적 화합물이 부분적 또는 실질적으로 정제되는 표본 내 화합물을 포함한다.

[0146] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 분리된" 및 "실질적으로 정제된"은 그의 천연 환경에서 이동되고 자연적으로 결합된 다른 성분이 60% 이상 부재한, 바람직하게는 75% 이상 분재한, 가장 바람직하게는 90% 이상 부재한 화합물을 나타낸다. 본원에서 사용된 기준 항체와 "동일한 특이성"을 지닌 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 의미한다. 항체가 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 여부의 측정은 본원에서 하기에 기재된 방법을 이용하여 수행된다.

[0147] 본원에 개시된 마우스 하이브리도마 세포주에서 유래한 항체(1F2, 1B3, MAbs0009, MAb 163, MAb 165, MAb 171)는 출원 중인 미국 출원번호 11/812,996에 기재되어 있다. 이들 항체의 VL 및 VH 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었다. 클론 1F2G는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁번호 PTA-5639를 제공받았다. 클론 1F2K는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁번호 PTA-5640을 제공받았다. 클론 1B3G는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁번호 PTA-5637을 제공받았다. 클론 1B3K는 2003년 11월 11일 ATCC에 기탁되었고 ATCC 수탁번호 PTA-5638을 제공받았다.

[0148] 1F2, 1B3, MAbs0009, MAb 163, MAb 165 또는 MAb 171 항체의 이용은 설명을 목적으로 하고 상기 방법은 이들 항체에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 출원 중인 미국 출원번호 11/812,996에 명기된 것을 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 어떠한 C35 항체도 본 발명의 방법에 유용하다.

- [0149] 바람직하게는 예시된 항체의 유사체는 보존적 아미노산 치환에 의해 예시된 항체와는 상이하다. 보존적 또는 비보존적으로 아미노산 치환을 분류하기 위한 목적으로 아미노산은 하기와 같이 분류된다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(천연 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gin, his, lys, arg; 그룹 V(사슬 방위에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환은 동일한 종류 내 아미노산간의 치환을 포함한다. 비-보존적 치환은 하나의 종류의 멤버를 또다른 멤버로 교환하는 것으로 구성된다.
- [0150] 가장 바람직하게는 항체는 Fab, Fab' 및 F(ab')2, Fd, 단쇄 Fvs(scFv), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 단쇄 항체, 이황화-결합 Fvs(sdFv) 및 인트라바디 및 VL 또는 VH 영역을 포함하는 단편을 포함한 본 발명의 인간, 키메라(예를 들어 인간 마우스 키메라) 또는 인간화 항체 또는 항원-결합 항체 단편이다. 단쇄 항체를 포함한 항원-결합 항체 단편은 가변 영역(들) 단독 또는 하기의 전체 또는 일부를 함께 포함한다: 헌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인. 가변 영역(들)과 헌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 어떠한 조합도 포함하는 항체-결합 단편도 포함된다. 본 발명의 치료 방법에 바람직한 항체는 CH2 도메인 삭제를 포함한 것이다.
- [0151] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 이들을 인식하고 특이적으로 결합하는 본 발명의 폴리펩타이드의 에피토프(들) 또는 일부(들)의 측면에서 기재되거나 상술된다. 에피토프(들) 또는 폴리펩타이드 일부(들)는 본원에 기재된 바와 같이 예를 들어 N-말단 및 C-말단 위치 또는 인접 아미노산 잔기의 크기에 의해 상술된다. 본 발명의 어떠한 에피토프 또는 폴리펩타이드에도 특이적으로 결합하는 항체도 배제된다. 따라서 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고, 동일한 배제를 가능하게 한다.
- [0152] 또한 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 결합 친화력 측면에서 기재되거나 상술된다. 바람직한 결합 친화력은 5 X 10(-7) M, 10(-7) M, 5 X 10(-8) M, 10(-8) M, 5 X 10(-9) M, 10(-9) M, 5 X 10(-10) M, 10(-10) M, 5 X 10(-11) M, 10(-11) M, 5 X 10(-12) M, 10(-12) M, 5 X 10(-13) M, 10(-13) M, 5 X 10(-14) M, 10(-14) M, 5 X 10(-15) M 또는 10(-15) M 이하의 해리 상수 또는 Kd를 지닌 것을 포함한다.
- [0153] 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 항체는 항체 1F2, 1B3, MAbs0009, MAbs 163, MAbs 165 및 MAbs 171의 친화력과 동일하거나 유사한 C35에 대한 친화력을 지닌다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 항체 1F2, 1B3, MAbs0009, MAbs 163, MAbs 165 및 MAbs 171보다 높은 C35에 대한 친화력을 지닌다.
- [0154] 또한 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 항체와 동일한 생물학적 특성 중 하나 이상을 지닌 항체(항체 단편 또는 그의 변이체를 포함하거나 그로 구성된 분자 포함)의 용도를 포함한다. "생물학적 특성"은 예를 들어 C35, HER2, EGFR 및/또는 IGFR 폴리펩타이드에 대한 결합 능력과 같은 항체의 시험관 내 또는 생체 내 활성 또는 특성; C35, HER2, EGFR 및/또는 IGFR 폴리펩타이드 매개 생물학적 활성을 실질적으로 저해하거나 제거할 수 있는 능력; 또는 HER2, EGFR 및/또는 IGFR를 발현하는 암세포의 아폽토시스를 유도할 수 있는 능력을 의미한다. 선택적으로는 본 발명의 항체는 본원에 특정하게 나타난 항체 중 하나 이상과 동일한 에피토프에 결합할 것이다. 이러한 에피토프 결합은 당분야에 알려지고 본원에서 하기 기재된 분석을 이용하여 통상적으로 측정될 수 있다.
- [0155] 본 발명의 인간화 면역글로불린 및 인간 항체 변이체는 인간 면역글로불린(수용체 면역글로불린으로 명명됨)에서 실질적으로 유래한 가변 프레임워크 영역 및 마우스 C35, HER2, EGFR 및/또는 IGFR VH 및 VL 영역(공여체 면역글로불린으로 표기됨)에서 실질적으로 유래한 CDR을 지닌다. 불변 영역(들)이 존재하는 경우 이는 인간 면역글로불린에서 실질적으로 유래한다. 인간화 항체 및 인간 항체 변이체는 10(2), 10(3), 10(4), 10(5), 10(6), 10(7), 10(8), 10(9), or 10(10) M(-1) 이상의 C35, HER2, EGFR 및/또는 IGFR에 대한 특이적 결합 친화력을 나타낸다. 일반적으로 C35, HER2 또는 EGFR에 대한 인간화 항체 및 인간 항체 변이체의 결합 친화력의 상한선은 마우스 항체 1F2 또는 1B3의 3, 4, 5 또는 10 인자 이내이다. 종종 C35에 대한 결합 친화력 하한선도 1F2 또는 1B3의 마우스 항체의 3, 4, 5 또는 10 인자 이내이다. 바람직한 항-C35 인간화 면역글로불린 및 인간 항체 변이체는 C35에 대한 결합에 대해 마우스 항체 1F2 또는 1B3과 경쟁하고 C35가 각각의 마우스 또는 인간 항체에 결

합하는 것을 방지한다.

- [0156] 가능한 인간 수용체 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)에 의해 기재되어 있다. 인간 수용체 항체는 그의 가변 영역이마우스 C35 또는 HER2 항체와 높은 정도의 서열 동일성을 나타내도록 선택된다. 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역은 동일하거나 상이한 인간 항체 서열에서 유래할 수 있다. 인간 항체 서열은 자연 발생적 인간 항체의 서열이 될 수 있거나 여러 인간 항체의 공통 서열이 될 수 있다.
- [0157] 인간화 면역글로불린의 고안은 하기와 같이 수행될 수 있다: 아미노산이 하기 카테고리 내에 포함되는 경우 사용되는 인간 면역글로불린(수용체 면역글로불린)의 프레임워크 아미노산은 CDR-제공 비-인간 면역글로불린(공여체 면역글로불린) 유래의 프레임워크 아미노산으로 대체된다:
- [0158] (a) 수용체 면역글로불린의 인간 프레임워크 영역 내 아미노산은 해당 위치에서 인간 면역글로불린에 비정상적인 반면 공여체 면역글로불린 내 상응하는 아미노산은 해당 위치에서 인간 면역글로불린에 대해 일반적인 것이거나;
- [0159] (b) 아미노산 위치는 CDR 중 하나에 바로 인접하거나;
- [0160] (c) 아미노산은 각각 CDR과 상호작용 가능하다(Queen et al., WO 92/11018., 및 Co et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 88, 2869 (1991) 참조, 각각은 본원에 참고문헌으로 포함됨). 인간화 면역글로불린의 제조에 대한 상세한 설명은 Queen et al. 및 Co et al. 참조.
- [0161] 일반적으로 인간화 항체 및 인간 항체 변이체 내 CDR 영역은 이들이 유래한 마우스 또는 인간 항체 내 상응하는 CDR 영역과 실질적으로 동일하거나 더욱 일반적으로는 동일하다. 수득된 인간화 면역글로불린 또는 인간 항체 변이체의 결합 친화력에 명백하게 영향을 미치지 않고 CDR 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 생성하는 것이 가능하고, 종종 CDR 영역 내 치환은 결합 친화력을 강화시킬 수 있다. 예를 들어 Iwahashi et al., MoI. Immunol. 36: 1079-1091 (1999); Glaser et al., J. Immunol. 149(8): 2607-2614 (1992); and Tamura et al, J. Immunol. 164: 1432-1441 (2000) 참조.
- [0162] 상기 논의된 특정 아미노산 치환 이외에 인간화 면역글로불린 및 인간 항체 변이체의 프레임워크 영역은 일반적으로 이들이 유래한(수용체 면역글로불린) 인간 항체의 프레임워크 영역과 실질적으로 동일하고, 더욱 일반적으로는 동일하다. 물론 프레임워크 영역 내 많은 아미노산은 항체의 특이성 또는 친화력에 직접적인 기여를 거두지 않거나 전혀하지 않는다. 따라서 프레임워크 잔기의 많은 개별적 보존적 치환은 수득된 인간화 면역글로불린 또는 인간 항체 변이체의 특이성 또는 친화력의 명백한 변화 없이 내성화될 수 있다.
- [0163] 파지-디스플레이 기술은 모서열과 실질적인 서열 동일성을 지니고 결합 친화력 및 특이성을 보유한 유사체를 선택하기 위한 강력한 기술을 제공한다(예를 들어 Dower et al, WO 91/17271; McCafferty et al, WO 92/01047; and Huse, WO 92/06204; US 2002/0123057A1 참조; 각각은 본원에 참고문헌으로 포함됨).
- [0164] 상기 기재된 바와 같이 인간화 항체 또는 인간 항체 변이체의 가변 분절은 일반적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부와 연결된다. 인간 불변 영역 DNA 서열은 무한증식 B-세포와 같은 다양한 인간 세포로부터 잘-알려진 절차에 따라 분리될 수 있다(Kabat et al., 상동 및 WO 87/02671 참조). 항체는 경쇄 및 중쇄 불변 영역 모두를 포함한다. 중쇄 불변 영역은 CH1 헌지, CH2, CH3 및 종종 CH4 영역을 포함한다. 치료 목적으로는 CH3 도메인은 삭제되거나 생략된다.
- [0165] 인간화 항체 또는 인간 항체 변이체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함한 모든 형태 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 어떠한 동형의 불변 영역을 지닌 항체를 포함한다. 인간화 항체 또는 인간 항체 변이체가 독성

활성을 나타내는 것이 바람직한 경우 불변 영역은 일반적으로 보체-고정 불변 영역이고 종류는 일반적으로 IgG1이다. 이러한 독성 활성이 바람직하지 않은 경우 불변 도메인은 IgG2 종류가 될 수 있다. 인간화 항체 또는 인간 항체 변이체는 하나 이상의 종류 또는 동형 유래의 서열을 포함한다.

[0166] 키메라 항체도 본 발명의 용도에 포함된다. 이러한 항체는 인간 또는 마우스 또는 말과 같은 다른 종의 CH 영역 및/또는 CL 영역에 융합된 VH 영역 및/또는 VL 영역을 포함한다. 바람직한 실시태양에서 키메라 항체는 인간 C 영역에 융합된 마우스 항-C35 또는 항-HER2 항체에 의해 암호화되는 VH 및/또는 VL 영역을 포함한다. 항체가 치료 목적으로 사용되는 경우 인간 CH2 도메인은 삭제된다. 상기 기재된 바와 같이 키메라 항체는 항체 단편을 포함한다.

[0167] 상기 기재된 바와 같이 제조된 키메라 항체의 가변 분절은 일반적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부에 연결된다. 인간 불변 영역 DNA 서열은 무한증식 B-세포와 같은 다양한 인간 세포로부터 잘-알려진 절차에 따라 분리될 수 있다(Kabat et al., 상동 및 WO 87/02671 참조). 항체는 경쇄 및 중쇄 불변 영역 모두를 포함한다. 중쇄 불변 영역은 CH1 헌지, CH2, CH3 및 종종 CH4 영역을 포함한다. 치료 목적으로는 CH3 도메인은 삭제되거나 생략된다.

[0168] 키메라 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함한 모든 형태 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 어떠한 동형의 불변 영역을 지닌 항체를 포함한다. 키메라 항체가 독성 활성을 나타내는 것이 바람직한 경우 불변 영역은 일반적으로 보체-고정 불변 영역이고 종류는 일반적으로 IgG1이다. 이러한 독성 활성이 바람직하지 않은 경우 불변 도메인은 IgG2 종류가 될 수 있다. 키메라 항체는 하나 이상의 종류 또는 동형 유래의 서열을 포함한다.

[0169] 이러한 면역글로불린을 제조하기 위한 다양한 방법이 이용 가능하다. 유전자 코드의 퇴화로 인해 다양한 핵산 서열이 각각의 면역글로불린 아미노산 서열을 암호화한다. 바람직한 핵산 서열은 드 노보(de novo) 고형상 DNA 합성 또는 바람직한 폴리뉴클레오타이드의 초기 제조 변이체의 PCR 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있다. 본 출원에 기재된 항체를 암호화하는 모든 핵산은 본 발명에 명백히 포함된다.

[0170] 발현되면 본 발명의 전체 항체, 그의 이랑체, 개별적 경쇄 및 중쇄 또는 다른 면역글로불린 형태는 황산암모늄 침전, 친화력 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 갤 전기영동 등을 포함한 당분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로 Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982) 참조, 본원에 참고문헌으로 포함됨). 약제학적 용도로 약 90 내지 95% 이상의 균질성의 실질적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하고, 98 내지 99% 이상의 균질성이 가장 바람직하다. 바람직한 바와 같은 균질성으로 또는 그 일부로 정제되면 폴리펩타이드는 분석 절차, 면역형광 염색 등을 개발하고 수행하거나(Immunological Methods, VoIs. I and II, Lefkovits and Pernis, eds., Academic Press, New York, N.Y. (1979 and 1981 참조) C35 검출하거나 C35-관련 암을 진단하는데 치료적(체외 포함)으로 사용된다.

[0171] 하기 더욱 상세하게 논의된 바와 같이 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 단독으로, 서로 조합하여, 또는 다른 조성물과 조합하여 사용된다. 또한 항체는 N- 또는 C-말단에서 이종의 폴리펩타이드에 재조합적으로 융합되거나 폴리펩타이드 또는 다른 조성물에 화학적으로 컨쥬케이트된다(공유결합 및 비-공유결합 컨쥬케이션 포함). 예를 들어 본 발명의 항체는 검출 분석시 표지로 유용한 문자 및 이종의 폴리펩타이드, 약물, 방사선핵종 또는 독소와 같은 효과기 문자에 재조합적으로 융합되거나 컨쥬케이트된다. 예를 들어 본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함된 PCT 공개 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허등록 번호 5,314,995; 및 EP 396,387 참조.

[0172] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 항체에 대한 어떠한 형태의 공유결합 부착에 의해 변형되어 공유결합 부착이 항체가 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR에 결합하는 것을 방지하지 않게 된 유도체를 포함한다. 예를 들어 항체 유도

체는 제한 없이 당화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 세포성 리간드 또는 다른 단백질로의 결합 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 어떠한 많은 화학적 변형도 특정 화학 분열, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사 합성 등을 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 알려진 기술에 의해 수행된다. 더욱이 유도체는 하나 이상의 비-전형적 아미노산을 포함한다.

[0173] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 웨타이드 결합 또는 변형된 웨타이드 결합 즉 웨타이드 동배체에 의해 서로 연결된 아미노산으로 구성될 수 있고, 20개 유전자-암호화 아미노산 이외의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 번역후 처리와 같은 자연적 방법 또는 당분야에 잘 알려진 화학적 변형 기술에 의해 변형된다. 이러한 변형은 기본 서적 및 더욱 상세한 전공논문뿐만 아니라 여러 권의 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 변형은 웨타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함한 항체의 어떠한 곳에서도 발생할 수 있다. 동일한 형태의 변형이 일정 항체 내 여려 부위에서 동일하거나 다른 정도로 존재함이 인식될 것이다. 또한 일정 항체는 많은 형태의 변형을 포함한다. 항체는 예를 들어 유비퀴틴화의 결과로 분지되고, 분지 존재 또는 부재와 함께 고리형이다. 고리형, 분지형 및 분지 고리형 항체는 번역후 자연적 방법에서 유래하거나 합성 방법에 의해 생성된다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-라이보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합 부착, 헴 모이어티의 공유결합 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유결합 부착, 교차-결합, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유결합성 교차-결합 형성, 시스테인 형성, 피로글루탐산 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 당화, GPI 고정 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 폐길화, 단백질분해성 처리, 인산화, 폐닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화와 같은 단백질로의 전달-RNA 매개 아미노산 첨가 및 유비퀴틴화를 포함한다(예를 들어 PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS1 B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992) 참조).

[0174] 본 발명의 또 다른 실시태양은 하나 이상의 아미노산 치환 및 50 이하의 아미노산 치환, 더욱 바람직하게는 40 이하의 아미노산 치환, 더욱 더 바람직하게는 30 이하의 아미노산 치환, 더욱 더 바람직하게는 20 이항의 아미노산 치환을 포함한 아미노산 서열을 지닌 항체 서열의 아미노산 서열을 포함한 폴리웨타이드에 관한 것이다. 물론 증가 추세의 우선권 순서로 폴리웨타이드는 하나 이상 및 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 이하의 아미노산 치환을 포함한 항체 서열을 포함한 아미노산 서열을 지니는 것이 매우 바람직하다. 특정 실시태양에서 항체 서열 내 첨가, 치환 및/또는 결실의 수는 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 또는 50-150이다. 치환의 경우 보존적 아미노산 치환이 바람직하다. 치환은 프레임워크 영역 또는 CDR 또는 이 둘 모두 내에 존재한다.

[0175] 이러한 섹션의 설명은 본 발명의 방법에 유용한 C35, HER2, EGFR 및/또는 IGFR에 적용된다. 이러한 항체는 본원에 기재된 바와 같이 독소에 컨쥬게이트되거나 복합화되거나 컨쥬게이트되거나 복합화되지 않는다.

[0176] IV. C35, HER2 및 EGFR 항체 폴리웨타이드

[0177] 또한 본 발명은 본 발명의 항체를 구성하는 분리된 폴리웨타이드 및 이러한 폴리웨타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 폴리웨타이드 예를 들어 면역글로불린 분자에서 유래한 C35-, HER2- 또는 EGFR-특이적 항원 결합 영역을 암호화하는 아미노산을 포함한다. 지정된 단백질에서 "유래한" 폴리웨타이드 또는 아미노산 서열은 폴리웨타이드 기원을 나타낸다. 특정한 경우 특정 시작 폴리웨타이드 또는 아미노산 서열에서 유래한 폴리웨타이드 또는 아미노산 서열은 시작 서열 또는 약 10~20개 이상 아미노산, 약 20~30개 이상 아미노산, 약 30~50개 이상 아미노산으로 구성되거나 당업자에게 시작 서열 내 그의 기원을 지닌 것으로 확인된 그의 일부와 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 지닌다.

[0178] 하나의 실시태양에서 본 발명은 중쇄 가변 영역의 하나 이상의 CDR 또는 중쇄 가변 영역의 2 이상의 CDR이 상기

참조된 C35, HER2 또는 EGFR 항체 유래의 기준 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열과 80%, 85%, 90% 95%, 99% 또는 100% 이상 동일한 면역글로불린 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하거나 본질적으로 구성된다. 또한 VH의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역은 상기 참조된 항체 유래의 기준 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열과 80%, 85%, 90% 95%, 99% 또는 100% 이상 동일하다.

[0179] 특정 실시태양에서 상기 기재된 VH 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하거나 본질적으로 구성된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1F2, 1B3, MAbs0009, MAb 163, MAb 165 및 MAb 171로 구성된 군에서 선택된 단일클론 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 이러한 단일클론 항체가 C35에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해할 것이다.

[0180] 특정 실시태양에서 상기 기재된 VH 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하거나 본질적으로 구성된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M 또는 10^{-15} M 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 친화력으로 C35, HER2 또는 EGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 C35, HER2 또는 EGFR 변이 폴리펩타이드에 특이적으로 또는 우선적으로 결합한다.

[0181] 또 다른 실시태양에서 본 발명은 경쇄 가변 영역의 하나 이상의 CDR 또는 경쇄 가변 영역의 2 이상의 CDR이 상기 참조된 C35, HER2 또는 EGFR 항체 유래의 기준 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열과 80%, 85%, 90% 95%, 99% 또는 100% 이상 동일한 면역글로불린 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하거나 본질적으로 구성된다. 또한 VL의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역은 상기 참조된 항체 유래의 기준 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열과 80%, 85%, 90% 95%, 99% 또는 100% 이상 동일하다.

[0182] 특정 실시태양에서 상기 기재된 VL 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하거나 본질적으로 구성된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1F2, 1B3, MAbs0009, MAb 163, MAb 165 및 MAb 171로 구성된 군에서 선택된 단일클론 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 이러한 단일클론 항체가 C35에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해할 것이다.

[0183] 특정 실시태양에서 상기 기재된 VL 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함하거나 본질적으로 구성된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M 또는 10^{-15} M 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 친화력으로 C35, HER2 또는 EGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 C35, HER2 또는 EGFR 변이 폴리펩타이드에 특이적으로 또는 우선적으로 결합한다.

[0184] 상기 기재된 어떠한 폴리펩타이드도 추가적인 폴리펩타이드 예를 들어 암화화된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 신호 펩타이드, 본원에 기재된 항체 불변 영역 또는 본원에 기재된 또 다른 이종의 폴리펩타이드를 더욱 포함한다. 더욱이 본 발명의 폴리펩타이드는 본원에 기재된 폴리펩타이드 단편을 포함한다. 더욱이 본 발명의 폴리펩타이드는 본원에 기재된 바와 같이 융합 폴리펩타이드, Fab 단편 또는 다른 유도체를 포함한다.

[0185] 또한 본원에 개시된 C35, HER2 또는 EGFR 항체 폴리펩타이드는 이들이 유래한 자연 발생적 결합 폴리펩타이드로부터 아미노산 서열을 변경시키도록 변형됨이 당업자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어 지정된 단백질에서 유래

한 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은 유사하고, 예를 들어 시작 서열에 대한 특정 퍼센트 동일성을 지니고, 예를 들어 이는 시작 서열과 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일하다.

[0186] 더욱이 "비-필수" 아미노산 영역에서의 보존적 치환 또는 변화를 유발하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입이 이루어진다. 예를 들어 지정된 단백질에서 유래한 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은 하나 이상의 개별적 아미노산 치환, 삽입 또는 결실, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 이상의 개별적 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 제외하고 시작 서열과 동일하다. 특정 실시태양에서 지정된 단백질에서 유래한 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은 시작 서열 대비 1 내지 5개, 1 내지 10개, 1 내지 15개 또는 1 내지 20개의 개별적 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 지닌다.

[0187] 본 발명의 특정 항체 폴리펩타이드는 인간 아미노산 서열에서 유래한 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 구성된다. 그러나 특정 항체 폴리펩타이드는 또다른 포유류 종에서 유래한 하나 이상의 인접 아미노산을 포함한다. 예를 들어 본 발명의 항체는 영장류 중쇄 부분, 헌자 부분 또는 항원 결합 영역을 포함한다. 또다른 예로 하나 이상의 마우스-유래 아미노산은 비-마우스 항체 폴리펩타이드 예를 들어 C35, HER2 또는 EGFR 항체의 항원 결합 부위 내에 존재한다. 특정 치료 적용시 C35-, HER2- 또는 EGFR-특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유사체는 항체가 투여되는 동물에서 면역원성이 되지 않도록 고안된다.

[0188] 특정 실시태양에서 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 항체와 일반적으로 관련되지 않는 아미노산 서열 또는 하나 이상의 모이어티를 포함한다. 예시적 변형은 하기에 더욱 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어 본 발명의 단쇄 fv 항체 단편은 유연성 링커 서열을 포함하거나 기능성 모이어티(예를 들어 PEG, 약물, 독소 또는 표지)를 첨가하도록 변형된다.

[0189] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 융합 단백질을 포함하거나 본질적으로 구성된다. 융합 단백질은 예를 들어 하나 이상의 타겟 결합 부위를 지닌 면역글로불린 항원-결합 도메인 및 하나 이상의 이종의 부분 즉 자연 내에 자연적으로 연결되지 않는 부분을 포함하는 키메라 분자이다. 아미노산 서열은 일반적으로 융합 폴리펩타이드 내에 집합되는 개별적 단백질 내에 존재하거나 이들은 일반적으로 동일한 단백질 내에 존재하나 융합 폴리펩타이드 내 새로운 정렬 내에 위치한다. 융합 단백질은 예를 들어 화학적 합성 또는 펩타이드 영약이 바람직한 관계로 암호화되는 폴리뉴클레오타이드를 생성하고 번역함으로서 생성된다.

[0190] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 지닌 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 염기성 측쇄(예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예를 들어 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향성 측쇄(예를 들어 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한 유사한 측쇄를 지닌 아미노산 잔기 패밀리는 당분야에 정의되어 있다. 따라서 면역글로불린 폴리펩타이드 내 비피루 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 측쇄 패밀리 유래의 또다른 아미노산 잔기로 대체된다. 또다른 실시태양에서 일련의 아미노산은 측쇄 패밀리 멤버의 순서 및/또는 조성이 상이한 구조적으로 유사한 열로 대체될 수 있다.

[0191] 또한 또다른 실시태양에서 돌연변이는 포화 돌연변이유발에 의해 면역글로불린 코드화 서열의 전보 또는 일부를 따라 무작위로 도입되고, 수득된 돌연변이체는 본원에 개시된 치료 방법에 사용하기 위해 C35 또는 HER2 항체 내로 통합될 수 있다.

[0192] V. 융합 단백질 및 항체 컨쥬게이트

[0193]

또한 본 발명의 방법에 사용되는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 N-또는 C-말단에서 이종의 폴리펩타이드에 재조합으로 융합되거나 폴리펩타이드 또는 다른 조성물에 화학적으로 컨쥬게이트된다(공유결합 및 비-공유결합 컨쥬게이션 포함). 예를 들어 본 발명의 항체는 검출 분석 표지물질로 유용한 문자 및 이종의 폴리펩타이드, 약물, 방사성핵종 또는 독소와 같은 효과기 분자에 재조합으로 융합 또는 컨쥬게이트된다. 예를 들어 PCT 공개공보 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허등록 번호 5,314,995; 및 EP 396,387 참조.

[0194]

본 발명의 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 공유결합 부착이 각각 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR의 항체 결합을 방해하지 않도록 항체에 모든 형태 분자의 공유결합 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 예를 들어 비제한적으로 항체 유도체는 예를 들어 당화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해성 분열, 세포 리간드 또는 다른 단백질로의 연결 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 어떠한 수많은 화학 변형도 특이적인 화학 절단, 아세틸화, 포르밀화, 대사성 투니카마이신 합성을 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 알려진 기술에 의해 수행된다. 더욱이 유도체는 하나 이상의 비-전형적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0195]

본 발명의 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 웨პ타이드 결합 또는 변형된 웨პ타이드 결합, 즉 웨პ타이드 동배체에 의해 서로 연결된 아미노산으로 구성되고, 20개 유전자-암호화 아미노산 이외의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체는 번역후 처리와 같은 자연적 방법 또는 당분야에 잘 알려져 있는 화학적 변형 기술에 의해 변된다. 변형은 기본 서적 및 더욱 상세한 전공 논문뿐만 아니라 여러 권의 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 변형은 웨პ타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함한 항체 내 어느 곳에서도 또는 탄수화물과 같은 모이어티 상에서 발생할 수 있다. 동일한 형태의 변형은 일정 항체의 여러 부위에 동일하거나 다양한 정도로 존재함이 인식될 것이다. 또한 일정 항체는 많은 형태의 변형을 포함한다. 항체는 예를 들어 유비퀴닌틴화의 결과로서 분지되고, 분지 존재 또는 부재와 함께 고리형이다. 고리형, 분지형 및 분지 고리형 항체는 번역후 자연적 방법에서 유래하거나 합성 방법에 의해 생성된다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-라이보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합 부착, 헴 모이어티의 공유결합 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유결합 부착, 교차-결합, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유결합성 교차-결합 형성, 시스테인 형성, 피로글루탐산 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 당화, GPI 고정 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 페길화, 단백질분해성 처리, 인산화, 페닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화와 같은 단백질로의 전달-RNA 매개 아미노산 첨가 및 유비퀴틴화를 포함한다(예를 들어 Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al, Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)) 참조).

[0196]

또한 본 발명은 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체 및 이종의 폴리펩타이드를 포함한 융합 단백질을 제공한다. 항체가 융합되는 이종의 폴리펩타이드는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 발현 세포에 기능하거나 이를 타겟하는데 유용하다. 하나의 실시태양에서 본 발명의 융합 단백질은 본 발명의 항체의 어떠한 하나 이상의 V_H 영역의 아미노산 서열 또는 본 발명의 항체 또는 그의 단편 또는 변이체의 어떠한 하나 이상의 V_L 영역의 아미노산 서열 및 이종의 폴리펩타이드 서열을 지닌 폴리펩타이드를 포함하거나 본질적으로 구성된다. 또 다른 실시태양에서 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용되는 융합 단백질은 C35-, HER2-, EGFR- 또는 IGFR-특이적 항체 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체의 1, 2, 3개의 V_H CDR의 아미노산 서열 또는 C35-, HER2-, EGFR- 또는 IGFR-특이적 항체 또는 그의 단편, 변이체 또는 유도체의 1, 2, 3개의 V_L CDR의 아미노산 서열 및 이종의 폴리펩타이드 서열을 지닌 폴리펩타이드를 포함하거나 본질적으로 구성된다. 하나의 실시태양에서 융합 단백질은 본 발명의 C35-특이적 항체 또는 그의 한편, 변이체 또는 유도체의 V_H CDR의 아미노산 서열 및 이종의 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 상기 융합 단백질은 C35의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시태양에서 융합 단백질은 본 발명의 C35-특이적 항체의 하나 이상의 V_H 영역의 아미-

노산 서열 및 본 발명의 C35-특이적 항체 또는 그의 단편, 유도체 또는 변이체의 하나 이상의 V_L 영역의 아미노산 서열 및 이종의 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는 융합 단백질의 V_H 및 V_L 영역은 C35의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일 공급원 항체(또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 또다른 실시태양에서 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용되는 융합 단백질은 C35-특이적 항체의 어떠한 1, 2, 3개 이상의 V_H CDR의 아미노산 서열 및 C35-특이적 항체 또는 그의 단편 또는 변이체의 어떠한 1, 2, 3개 이상의 V_L CDR의 아미노산 서열을 지닌 폴리펩타이드 및 이종의 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 V_H CDR 또는 V_L CDR은 본 발명의 단일 공급원 항체(또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 이를 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자도 본 발명에 포함된다.

[0197] 문헌에 보고된 예시적 융합 단백질은 T 세포 수용체(Gascoigne et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940); CD4(Capon et al. (1989) Nature 337:525-531; Traunecker et al. (1989) Nature 339:68-70; Zettmeissl et al. (1990) DNA Cell Biol. USA 9:347-353; 및 Byrn et al. (1990) Nature 344:667-670); L-셀렉틴(귀소 수용체)(Watson et al. (1990) J. Cell. Biol. 110:2221-2229; 및 Watson et al. (1991) Nature 349:164-167); CD44(Aruffo et al. (1990) Cell 61:1303-1313); CD28 및 B7(Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730); CTLA-4(Lisley et al. (1991) J. Exp. Med. 174:561-569); CD22(Stamenkovic et al. (1991) Cell 66:1133-1144); TNF 수용체(Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Lesslauer et al. (1991) Eur. J. Immunol. 27:2883-2886; 및 Peppel et al. (1991) J. Exp. Med. 174:1483-1489); 및 IgE 수용체 a(Ridgway and Gorman(1991) J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448)의 융합을 포함한다.

[0198] 본원에서 논의된 바와 같이 본 발명에 사용되는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 폴리펩타이드의 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 이종의 폴리펩타이드에 융합된다. 예를 들어 하나의 실시태양에서 PEG는 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 본 발명의 항체에 컨쥬게이트될 수 있다. Leong, S.R., et al., Cytokine 76:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:57, 1 (2002); 또는 Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

[0199] 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 컨쥬게이트되지 않은 형태로 사용되거나 예를 들어 분자의 치료 특성을 개선시키기 위해, 타겟 검출을 용이하게 하기 위해 또는 환자 치료의 영상화를 위해 다양한 분자들 중 하나 이상에 컨쥬게이트된다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 정제 수행 시 정제 전후에 표지되거나 컨쥬게이트될 수 있다.

[0200] 특히 본 발명의 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 치료제, 전구약물, 웨타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 변형제, 약제학적 작용제 또는 PEG에 컨쥬게이트된다.

[0201] 또한 본 발명은 진단제 또는 치료제에 컨쥬게이트된 본 발명의 방법에 사용되는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 더욱 포함한다. 항체는 예를 들어 일정 치료 및/또는 예방 요법의 효능을 측정하기 위해 임상 시험 절차의 일부로서 질환의 발병 또는 진행을 모니터링하는데 진단학적으로 이용될 수 있다. 검출은 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 검출 가능한 물질과 결합함으로서 촉진될 수 있다. 검출 가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보조군, 형광 물질, 발광 물질, 생발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용한 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 예를 들어 본 발명에 따른 진단제로서 사용되는 항체에 컨쥬게이트될 수 있는 금속 이온의 경우 미국 특허등록 번호 4,741,900 참조. 적합한 효소의 예는 당근 과산화효소, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적당한 보조군 복합체의 예는 스트렙트아미딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적당한 형광 물질의 예는 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 염화단실 또는 피코에리트린을 포함하고; 적당한 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생발광 물

질의 예는 루시페라제, 루시페린 및 에쿠오린을 포함하고; 적당한 방사성 물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In 또는 ^{99}Tc 를 포함한다.

[0202] VI. 항체 폴리펩타이드의 발현

[0203] 잘 알려진 바와 같이 RNA는 구아니디늄 이소티아네이트 추출 및 침전 후 원심분리 또는 크로마토그래피와 같은 표준 기술에 의해 본래 하이브리도마 또는 다른 형질전환 세포에서 분리된다. 바람직한 경우 mRNA는 올리고 dT 셀룰로스 상의 크로마토그래피와 같은 표준 기술에 의해 총 RNA에서 분리된다.

[0204] DNA, 일반적으로 플라스미드 DNA는 당분야에 알려진 기술을 이용하여 세포로부터 분리되고 제한효소 지도화되고 재조합 DNA 기술과 관련한 전술된 참고문헌에 상세하게 나타난 잘 알려진 표준 기술에 따라 서열분석된다. 물론 DNA는 분리 과정 동안 또는 후속 분석 시 어떠한 시점에서도 본 발명에 따라 합성된다.

[0205] 본 발명의 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 제공하기 위해 분리된 유전자 물질의 조작 후 상기 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 본 발명의 항체의 바람직한 양을 생성하는데 사용되는 숙주 세포 내로 도입하기 위한 발현 벡터 내로 삽입된다.

[0206] 본 발명의 항체 또는 그의 단편, 유도체 또는 유사체 예를 들어 본원에 기재된 타겟 분자에 결합하는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합 발현은 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터의 구축을 필요로 한다. 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄 또는 그의 일부(바람직하게는 중쇄 또는 경쇄의 가변도메인)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 수득되면 항체 분자의 생성을 위한 벡터는 당분야에 잘 알려진 기술을 이용한 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 따라서 뉴클레오타이드 서열을 암호화하는 항체를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 발현함으로서 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 당업자에게 잘 알려진 방법은 항체 코드화 서열 및 적당한 전사 및 번역 제어 신호를 포함하는 발현 벡터를 구축하는데 이용될 수 있다. 이들 방법은 예를 들어 시험관 내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체 내 유전자 재조합을 포함한다. 따라서 본 발명은 프로모터에 실시 가능하게 연결된 본 발명의 항체 분자, 그의 중쇄나 경쇄 또는 중쇄나 경쇄의 가변도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고(예를 들어 PCT 공개 WO 86/05807; PCT 공개 WO 89/01036; 및 미국 특허등록 번호 5,122,464 참조), 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위해 이러한 벡터 내로 클론된다.

[0207] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 본원에서 숙주 세포 내에 바람직한 유전자를 도입하고 발현시키기 위한 운반체로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미한다. 당업자에 알려진 바와 같이 이러한 벡터는 플라스미드, 과지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성된 군에서 용이하게 선택된다. 일반적으로 본 발명에 적합한 벡터는 선별 마커, 바람직한 유전자의 클로닝을 촉진시키기 위한 적당한 제한효소 부위 및 진핵 또는 원핵 세포 내로의 진입 및/또는 복제 능력을 포함할 것이다.

[0208] 더욱 일반적으로는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체의 단량체 서브유니트를 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되면 발현 벡터는 적당한 숙주 세포 내로 도입된다. 숙주 세포 내로 플라스미드의 도입은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들은 트랜스펙션(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침강, 피막화 DNA와의 세포 융합, 미세주입 및 완전한 바이러스로의 감염을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Chapter 24.2, pp. 470-472 (1988) 참조. 일반적으로 숙주 내 플라스미드 도입은 전기천공을 통해 이루어진다. 발현 컨스트럭트를 지닌 숙주 세포는 경쇄 및 중쇄의 제조에 적합한 조건 하에서 성장되고, 경쇄 및/또는 중쇄 단백질 합성에 대해 분석된다. 분석 기술의 예는 효소-결합 면역흡착 분석

(ELISA), 방사면역분석(RIA) 또는 형광-활성화된 세포 분류 분석(FACS), 면역조직화학방법 등을 포함한다.

- [0209] 발현 벡터는 통상적인 기술에 의해 숙주 세포에 전달되고 이후 트랜스펙트된 세포는 통상적인 기술에 의해 배양되어 본원에 기재된 방법에 사용되는 항체를 생성한다. 따라서 본 발명은 이종의 프로모터에 실시 가능하게 연결된 본 발명의 항체 또는 그의 단편 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한 숙주 세포를 포함한다. 이중-사슬화 항체 발현의 바람직한 실시태양에서 하기 상세하게 설명된 바와 같이 중쇄 및 경쇄 모두를 암호화하는 벡터는 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위한 숙주 세포 내에서 동시-발현된다.
- [0210] 본원에서 사용된 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 이용하여 구축되고 하나 이상의 이종의 유전자를 암호화하는 벡터를 지닌 세포를 나타낸다. 재조합 숙주로부터 항체를 분리하기 위한 방법의 설명에서 용어 "세포" 및 "세포 배양액"은 명확하게 명시되어 있지 않은 한 항체의 공급원을 나타내기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 즉 "세포"로부터 폴리펩타이드의 회수는 스픈다운된 전체 세포 또는 배지와 혼탁된 세포 모두를 포함하는 세포 배양액으로부터의 회수를 의미한다.
- [0211] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본원에 기재된 방법에 사용되는 항체 분자를 발현하는데 이용된다. 이러한 숙주-발현 시스템은 목적 코드화 서열이 생성된 후 정제되는 운반체를 나타내나 적당한 뉴클레오타이드 코드화 서열로 형질전환되거나 트랜스펙트된 경우 본 발명의 항체 분자를 정위치에서 발현하는 세포도 나타낸다. 이들은 항체 코드화 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어 *E. coli*, *B. subtilis*); 항체 코드화 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어 사카로마이세스, 퍼키아); 항체 코드화 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어 베콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코드화 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어 Ti plasmid)로 감염된 식물 세포 시스템; 포유류 세포의 계놈(예를 들어 메탈로티온인 프로모터) 또는 포유류 바이러스(예를 들어 아데노바이러스 후기 프로모터, 베시나 바이러스 7.5K 프로모터)에서 유래한 프로모터를 포함하는 재조합 발현 컨스트럭트를 지닌 포유류 세포 시스템(예를 들어 COS, CHO, BLK, 293, 3T3 세포)과 같은 미생물을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 박테리아 세포, 더욱 바람직하게는 진핵 세포가 재조합 항체 분자 발현에 사용된다. 예를 들어 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유류 세포는 인간 사이토메갈로바이러스 유래의 주요 즉시 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al. (1986) Gene 45:101; Cockett et al. (1990) Bio/Technology 8:2).
- [0212] 단백질 발현에 사용되는 숙주 세포주는 흔히 포유류 기원이고; 당업자는 바람직한 유전자 생성물이 그 안에서 발현되기에 가장 적당한 특정 숙주 세포주를 우선적으로 측정정할 수 있는 능력이 있는 것으로 간주된다. 예시적인 숙주 세포주는 CHO(중국 햄스터 난소), DG44 및 DUXB11(중국 햄스터 난소 세포주, DHFR 마이너스), HEla(인간 자궁경부 암종), CVI(원숭이 신장 세포주), COS(SV40 T 항원을 지닌 CVI 유도체), VERO, BHK(베이비 햄스터 신장), MDCK, 293, WI38, R1610(중국 햄스터 섬유아세포), BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 신장 세포주), SP2/0(마우스 골수종), P3x63-Ag3.653(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피세포), RAJI(인간 림프구) 및 293(인간 신장)을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 숙주 세포주는 일반적으로 상업적인 서비스, 미국표준균주배양수록보존소 또는 공개된 문헌으로부터 이용 가능하다.
- [0213] 더욱이 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 바람직한 특이적인 양상으로 유전자 생성물을 변형하고 처리하는 숙주 세포 균주가 선택된다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어 당화) 및 가공(예를 들어 분열)은 단백질 기능에 중요하다. 다른 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 변역후 가공 및 변형에 대한 특성 및 특정 메커니즘을 지닌다. 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보증하기 위해 적당한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택된다. 이에 의해 유전자 생성물의 1차 전사, 당화 및 인산화에 대한 적당한 처리를 위한 세포 장치를 지닌 진핵 숙주 세포가 사용된다.

- [0214] 재조합 단백질의 장기간 고수율의 생성을 위해 안정적 발현이 바람직하다. 예를 들어 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주가 조작된다. 바이러스 복제 기원을 포함하는 밸현 벡터를 이용하기보다는 숙주 세포는 적당한 발현 제어 요소(예를 들어 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별 마커에 의해 제어되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA 도입 후 조작된 세포는 농화 배지 내에서 1~2일간 성장된 후 선별 배지로 교체된다. 재조합 플라스미드 내 선별 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고 세포가 플라스미드를 그의 염색체 내로 안정하게 삽입하고 결국 세포주 내로 클론되고 증식될 수 있는 초점을 형성하며 증식 가능하게 한다. 이러한 방법은 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주를 조작하는데 유리하게 사용된다.
- [0215] 항체 분자의 발현 수치는 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(조사를 위해 Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)) 참조). 항체를 발현하는 벡터 시스템 내 마커가 증폭 가능한 경우 숙주 세포의 배양액 내에 존재하는 저해제 수치 증가는 마커 유전의 복사체 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 결합되어 있기 때문에 항체의 생성도 증가될 것이다(Crouse et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3:257).
- [0216] 시험관 내 생성은 규모 확대가 대량의 바람직한 폴리펩타이드를 제공 가능하게 한다. 조직 배양 조건 하에서의 포유류 세포 배양 기술은 당분야에 알려져 있고 예를 들어 공수 반응기 또는 연속 교반기 반응기 내에서의 균질성 혼탁 배양 또는 예를 들어 유공 마이크로파이버, 마이크로캡슐, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 내에 고정되거나 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요하고 또는 바람직한 경우 폴리펩타이드 용액은 예를 들어 합성 헌지 영역 폴리펩타이드의 우선적 생합성 이후 또는 본원에 기재된 HIC 크로마토그래피 이전 또는 이후에 통상의 크로마토그래피 방법, 예를 들어 젤 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 상에서의 크로마토그래피 또는 (면역-)친화력 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다
- [0217] 또한 본 발명의 방법에 사용되는 C35, HER2, EGFR 또는 IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 유전자는 박테리아, 효모 또는 식물 세포와 같은 비-포유류 세포에서 발현될 수 있다. 핵산을 용이하게 처리하는 박테리아는 대장균 또는 살모넬라(*Salmonella*) 균주와 같은 엔테로박테리아과 (enterobacteriaceae) 멤버; 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스과; 뉴모코커스 (*Pneumococcus*); 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)를 포함한다. 박테리아 내에서 발현되는 경우 이종의 폴리펩타이드는 일반적으로 봉입체(inclusion body)의 일부가 됨은 추가적으로 인식될 것이다. 이종의 폴리펩타이드는 분리되고 정제된 후 기능성 분자 내로 조립되어야 한다. 3가 형태의 항체가 바람직한 경우 서브유니트는 3가 항체 내로 자가-조립될 것이다(WO 02/096948A2).
- [0218] 박테리아 시스템에서 발현 벡터의 수는 발현되는 항체 분자의 의도된 용도에 따라 유리하게 선택된다. 예를 들어 항체 분자의 약제학적 조성을 위해 다양한 단백질이 생산되어야 하는 경우 용이하게 정제되는 용합 단백질 생성물의 높은 수치 발현을 지시하는 벡터가 바람직하다. 이러한 벡터는 용합 단백질이 생성되도록 항체 코드화 서열이 lacZ 코드화 영역과 함께 인 프레임으로 벡터 내에 개별적으로 라이제이트되는 *E. coli* 발현 벡터 pUR278(Ruther et al. (1983) EMBO J. 2:1791); pIN 벡터(Inouye and Inouye(1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke and Schuster(1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509) 등을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 또한 pGEX 벡터도 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)와의 용합 단백질로서 외래 폴리펩타이드를 발현하는데 사용된다. 일반적으로 이러한 용합 단백질은 용해성이고, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드로의 흡착 및 결합 후 유리 글루타티온의 존재 하에서의 용출에 의해 용해된 세포에서 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 분열 부위를 포함하도록 고안되어 클론된 타겟 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다.
- [0219] 원핵생물 이외에 진핵 미생물도 사용된다. 예를 들어 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 같은 많은 다른 균

주가 일반적으로 사용 가능하나 진핵 미생물 중 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 일반적인 뺑 효모가 가장 일반적으로 사용된다.

[0220] 사카로마이세스 내 발현의 경우 예를 들어 플라스미드 YRp7(Stinchcomb et al., *Nature* 252:39 (1979); Kingsman et al, *Gene* 7: 141 (1979); Tschemper et al, *Gene* 10: 157 (1980)))이 가장 일반적으로 사용된다. 이러한 플라스미드는 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1(Jones, *Genetics* 55: 12 (1977))과 같이 트립토판 내에서 성장할 수 있는 능력이 결여된 돌연변이 효모 균주에 대한 선별 마터를 제공하는 TRP1 유전자를 이미 포함한다. 효모 숙주 세포 계놈의 특성으로서 trp1 손상의 존재는 트립토판 부재시 성장에 의한 형질전환 검출에 대한 유효한 환경을 제공한다.

[0221] 곤충 시스템의 경우 오토그라파 캘리포르니카(*Autographa californica*) 세포핵 폴리헤드론형성 바이러스(AcNPV)가 외래 유전자를 발현하는 벡터로서 일반적으로 사용된다. 상기 바이러스는 스포돕테라 프루기페라드(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장된다. 항체 코드화 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들어 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클린되고 AcNPV 프로모터(예를 들어 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 위치된다.

[0222] 본 발명의 방법에 사용되는 항체 분자가 재조합으로 발현되면 면역글로불린 분자의 정제의 경우 당분야에 알려진 어떠한 방법에 의해서도, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어 이온 교환, 친화력, 특히 특이적인 항원과 이후의 단백질 A에 대한 친화력 및 크기차 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도 또는 단백질 정제를 위한 어떠한 다른 표준 기술에 의해 정제된다. 또한 본 발명의 항체의 친화력을 증가시키는 바람직한 방법은 US 2002 0123057 A1에 개시되어 있다.

VII. 항-C35 항체를 포함한 병용 치료법을 이용한 치료 방법

[0224] 본 발명은 과다증식성 질환 예를 들어 암을 치료하기 위한 본 발명의 항체 조합의 용도에 관한 것이다. 일부 실시태양에서 하나 이상의 항-C35 항체와 하나 이상의 항-HER2 항체가 투여된다. 특정 실시태양에서 하나의 항-C35 항체와 하나의 항-HER2 항체가 투여된다. 더욱 특정한 실시태양에서 항-C35 항체는 1B3 또는 1F2 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 또 다른 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맵이다. 또 다른 실시태양에서 하나 이상의 항-C35 항체와 하나 이상의 항-EGFR 항체가 투여된다. 특정 실시태양에서 하나의 항-C35 항체와 하나의 항-EGFR 항체가 투여된다. 더욱 특정한 실시태양에서 항-C35 항체는 1B3 또는 1F2 또는 그의 변이체 또는 유도체이다. 또 다른 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세툭시맵이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다.

[0225] 또 다른 실시태양에서 2 이상의 항-C35 항체 및/또는 2 이상의 항-HER2 및/또는 2 이상의 항-EGFR 항체가 투여된다. 또 다른 실시태양에서 하나 이상의 항-IGFR 항체가 하나 이상의 항-C35 항체와 함께 투여된다. 또한 추가적인 실시태양에서 어떠한 전술된 항체 조합도 치료제와 함께 투여된다. 특정한 실시태양에서 치료제는 화학치료제이다. 더욱 특정한 실시태양에서 화학치료제는 파클리탁셀이다. 또 다른 특정한 실시태양에서 화학치료제는 아드리아마이신이다. 또 다른 특정한 실시태양에서 화학치료제는 시스플라틴이다. 또 다른 실시태양에서 치료제는 방사선이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다.

[0226] 특정 폴리펩타이드에 지시된 2 이상의 항체(예를 들어 2개의 항-C35, 2개의 항-HER2, 2개의 항-EGFR 및/또는 2개 항-IGFR 항체)가 투여되는 실시태양에서 항체는 각각 폴리펩타이드 내의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어 C35의 경우 하나의 항체는 C35의 잔기 105~115(서열번호: 2) 내에 위치한 에피토프에 결합할 수 있는 반면 또 다른 것은 C35의 잔기 48~104(서열번호: 2) 내에 위치한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정한 실시태양에서 C35의 이들 영역 내의 에피토프에 결합하는 C35 항체는 1B3 및 1F2 또는 그의 변이체 또는 유도체(예를 들어 인간화 1B3 및/또는 인간화 1F2)이다.

[0227] 또한 본 발명은 동일한 에피토프에 결합하는 2개의 항체를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어 C35의 잔기 105 ~115(서열번호: 2) 내에 위치한 에피토프에 결합하는 2개의 상이한 C35 항체가 투여될 수 있다. 유사하게는 C35의 잔기 48~104(서열번호: 2) 내에 위치한 에피토프에 결합하는 2개의 상이한 C35 항체가 투여될 수 있다.

[0228] 일부 실시태양에서 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 기준 단일클론 항체의 해리 상수(K_D) 이하인 K_D 를 특징으로 하는 친화력을 지닌 C35, HER2 또는 EGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 C35, HER2 또는 EGFR 변이 폴리펩타이드에 결합하는 그의 능력을 기반으로 선택될 수 있다. 본 발명은 이들 실시태양의 목적으로 기준 단일클론 항체로서 본원에 개시된 모든 C35, HER2 또는 EGFR 항체를 포함한다. 특정한 실시태양에서 본원 및 미국 출원 공개번호 2005/0158323A1 및 20040063907A1(본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨)에 개시된 단일클론 항체 1B3 및 1F2는 기준 항체이다. 또다른 실시태양에서 기준 단일클론 항체는 동시 출원 중인 미국 출원번호 11/812,996(본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨)에 개시된 MAb 163이다. 따라서 일부 실시태양에서 C35 항체 또는 항체들은 MAb 1B3, MAb 1F2 또는 MAb 163의 해리 상수(K_D) 이하인 K_D 를 특징으로 하는 친화력으로 C35 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 C35 변이 폴리펩타이드에 결합한다. 또한 일부 실시태양에서 본 발명에 사용되는 항-C35 항체는 기준 항체 특히 미국 출원 공개번호 2005/0158323A1 및 20040063907A1 및 미국 출원번호 11/812,996에 개시된 항-C35 항체(예를 들어 MAb 1B3, MAb 1F2 또는 MAb 163)와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0229] 또다른 특정한 실시태양에서 항-EGFR 항체인 세특시맵은 기준 항체이다. 따라서 일부 실시태양에서 항-EGFR 항체 또는 항체들은 세특시맵의 해리 상수(K_D) 이하인 K_D 를 특징으로 하는 친화력으로 EGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 EGFR 변이 폴리펩타이드에 결합한다. 또다른 특정한 실시태양에서 항-HER2 항체인 트라스투추맵은 기준 항체이다. 따라서 일부 실시태양에서 항-HER2 항체 또는 항체들은 트라스투추맵의 해리 상수(K_D) 이하인 K_D 를 특징으로 하는 친화력으로 HER2 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 EGFR 변이 폴리펩타이드에 결합한다.

[0230] 또다른 실시태양에서 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 IGFR에 특이적으로 결합하는 기준 단일클론 항체의 해리 상수(K_D) 이하인 K_D 를 특징으로 하는 친화력으로 IGFR 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 IGFR 변이 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 능력을 기반으로 선택될 수 있다. IGFR 항체의 예는 미국 특허등록 번호 7,217,796에 기재된 1H3, 15H12, 19D12, 15H12/19D12 LCA, 15H12/19D12 LCB, 15H12/19D12 LCC, 15H12/19D12 LCD, 15H12/19D12 LCE, 15H12/19D12 LCF, 15H12/19D12 HCA 또는 15H12/19D12 HCB; α -IR3(Ku11 et al, J. Biol Chem. 255:6561 (1983)); 1H7(Li et al, Biochem. Biophys. Res. Comm. 196:92-9% (1993), Santa Cruz biotechnology, Inc. Santa Cruz, Calif.) 및 MAB391(R&D Systems; Minneapolis, Minn.)을 포함한다.

[0231] 일부 실시태양에서 본 발명은 예를 들어 암과 같은 과다발현 질환을 치료하기 위한 추가적인 치료제의 존재 또는 부재시 하나의 항-C35 항체 및 하나의 항-HER2 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 것으로 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 C35 또는 HER2에 특이적으로 결합하는 어떠한 항체도 이러한 방법에 사용된다. 일부 실시태양에서 항체는 치료제의 투여 전, 후 또는 동시에 투여된다. 하나의 실시태양에서 MAb 1F2 또는 1B3은 트라스투추맵 및 치료제와 함께 투여된다. 하나의 실시태양에서 치료제는 파클리탁셀, 아드리아마이신 및 시스플라틴으로 구성된 군에서 선택된 화학치료제이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다.

[0232] 일부 실시태양에서 본 발명은 예를 들어 암과 같은 과다발현 질환을 치료하기 위한 추가적인 치료제의 존재 또는 부재시 하나의 항-C35 항체 및 하나의 항-EGFR 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 것으로 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 C35 또는 EGFR에 특이적으로 결합하는 어떠한 항체도 이러한 방법에 사용된다. 일부 실시태양에서 항체는 치료제의 투여 전, 후 또는 동시에 투여된다. 하나의 실시태양에서 MAb 1F2 또는 1B3은 세특시맵 및 치료제와 함께 투여된다. 하나의 실시태양에서 치료제는 파클리탁셀, 아드리아마이신 및 시스플라틴으로 구성된 군에서 선택된 화학치료제이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양

에서 유방암은 내관성 암종이다.

[0233] 일부 실시태양에서 본 발명은 예를 들어 암과 같은 과다발현 질환을 치료하기 위한 추가적인 치료제의 존재 또는 부재시 하나의 항-C35 항체 및 하나의 항-IGFR 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 것으로 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 C35 또는 IGFR에 특이적으로 결합하는 어떠한 항체도 이러한 방법에 사용된다. 일부 실시태양에서 항체는 치료제의 투여 전, 후 또는 동시에 투여된다. 하나의 실시태양에서 MAb 1F2 또는 1B3은 세특시맵 및 치료제와 함께 투여된다. 하나의 실시태양에서 치료제는 파클리탁셀, 아드리아마이신 및 시스플라틴으로 구성된 군에서 선택된 화학치료제이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다.

[0234] 일부 실시태양에서 상기-기재된 C35/HER2 또는 C35/EGFR 병용 치료법은 IGFR 항체와 함께 투여된다. C35/HER2/IGFR 또는 C35/EGFR/IGFR 항체 조성물은 치료제의 투여와 함께 또는 이 없이 투여될 수 있다.

[0235] 일부 시스플라틴 본 발명은 치료제와 함께 2 이상의 C35 항체와 하나의 HER2 항체를 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시태양에서 2 이상의 C35 항체와 2 이상의 HER2 항체는 치료제와 함께 투여된다. C35와 HER2 항체의 어떠한 조합도 투여되고 모든 조합은 본 발명에 포함된다. 일부 바람직한 실시태양에서 본 발명은 치료제와 함께 2 이상의 C35 항체와 하나의 EGFR 항체를 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시태양에서 2이상의 C35 항체와 2 이상의 EGFR 항체는 치료제와 함께 투여된다. C35와 EGFR 항체의 어떠한 조합도 본 발명에 포함되고 모든 조합은 본 발명에 포함된다. 또한 서로 및 치료제(예를 들어 화학치료제)와 함께 이들 항체의 변이체(예를 들어 인간화 버전, 친화력 최적화 버전) 또는 유도체의 투여도 본 발명에 포함된다. 또한 치료제의 존재 또는 부재시 항체 조합을 포함한 조성물도 본 발명에 포함된다.

[0236] 암 환자가 인간인 실시태양에서 투여되는 항체는 바람직하게는 완전한 인간 또는 인간화된다. 이를 인간화 항체는 1F2 및/또는 1B3의 인간화 버전과 같은 본원에 개시된 어떠한 항체의 인간화 형태도 포함할 수 있다. 또한 1B3 및 1F2를 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 항체의 친화력 최적화 버전도 본 발명에 포함된다.

[0237] 본 발명의 방법 및 조성물은 종양을 포함한 과다증식 질환, 장애 및/또는 이상을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 과다증식 질환, 장애 및 이상의 예는 전립선, 결장암, 복부, 골격, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 안구, 두경부, 신경(중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 및 비뇨생식기에 위치한 종양을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0238] 이러한 과다증식 질환의 또다른 예는 급성 소아 림프모세포성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, 성인(원발성) 간세포암, 성인(원발성) 간암, 성인 급성 림프구성 백혈병, 성인 급성 골수성 백혈병, 성인 호지킨병, 성인 호지킨 림프종, 성인 림프구성 백혈병, 성인 비-호지킨 림프종, 성인 원발성 간암, 성인 연조직 육종, AIDS-관련 림프종, ADDS-관련 악성종양, 항문암, 성상세포종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌 간교 세포종, 뇌종양, 유방암, 신우요관암, 중추신경계(원발성) 림프종, 중추신경계 림프종, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종, 자궁경부암, 소아(원발성) 간세포암, 소아(원발성) 간암, 소아 급성 림프구성 백혈병, 소아 급성 골수성 백혈병, 소아 뇌 간교 세포종, 소아 소뇌 성상세포종, 소아 대뇌 성상세포종, 소아 두 개의 생식세포 종양, 소아 호지킨병, 소아 호지킨 림프종, 소아 시상하부시로 신경교종, 소아 림프구성 백혈병, 소아 수도세포종, 소아 비-호지킨 림프종, 소아 송과체 천막상 원시신경 외배엽 종양, 소아 원발성 간암, 소아 횡문근육종, 소아 연조직 육종, 소아 시로시상하부 신경교종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장암, 피부 t-세포 림프종, 내분비 췌장 섬세포 암종, 자궁내막암, 뇌실막세포종, 상피암, 식도암, 유방 육종 및 관련 종양, 외분비 췌장암, 두개의 생식세포 종양, 고환의 생식세포 종양, 간의 담관암, 안암, 여성 유방암, 고세병, 담관암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 종양, 생식세포 종양, 임신성 영양막종양, 모발상 세포 백혈병, 두경부암, 간세포암, 호지킨병, 호지킨 림프종, 고감마글로불린혈증, 하인

두암, 장암, 안내 흑색종, 섬세포 암종, 섬세포 췌장암, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 구순구강암, 간암, 폐암, 림프세포증식성 질환, 고분자글로불린혈증, 남성 유방암, 악성 중피종, 악성 흉선종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 전이 임재 원발성 편평세포 경부암, 전이 원발성 편평 경부암, 전이 편평세포 경부암, 다발성 골수종, 다발성 골수종/형질세포 종양, 골수형성이상 증후군, 골수성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수증식 질환, 비강부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 임신중 비-호지킨 림프종, 비흑색종 피부암, 비-소세포 폐암, 임재 원발성 전이 편평세포 경부암, 구인두암, 골-/악성 섬유 육종, 골육종/악성 섬유 조직구종, 골의 골육종/악성 섬유 조직구종, 난소 상피암, 난소 생식세포 종양, 난소 저악성 임재 종양, 췌장암, 파라프로테인혈증, 자색반증, 부갑상선암, 음경암, 크롬친화세포종, 하수체 종양, 형질세포 종양/다발성 골수종, 원발성 중추신경계 림프종, 원발성 간암, 전립선암, 직장암, 신세포암, 신우요관암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 사르코이도증 육종, 세자리 증후군, 피부암, 소세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 경부암, 위암, 천막상 원시 신경외배엽 및 송파체 종양, T-세포 림프종, 고환암, 흉선종, 갑상선암, 신우 및 요관의 이행세포암, 이행신우요관암, 영양막 종양, 요관신우암, 요관암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 시로시상하부 신경교종, 외임부암, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증, 월름 종양 및 상기 기입된 장기에 위치한 종양을 제외한 어떠한 다른 과다증식 질환 기관을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0239] 일부 특정한 실시태양에서 과다증식 장애는 유방, 방광, 간, 결장, 난소 및 피부로 구성된 군에서 선택된 조직 또는 기관의 암이다. 특정한 실시태양에서 암은 유방암이다. 더욱 특정한 실시태양에서 유방암은 내관성 암종이다. 일부 실시태양에서 과다증식 장애는 상기-언급된 암 중 하나의 전이이다.

[0240] 본 발명의 방법 및 조성물은 상기 기재된 장애를 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 전암성 이상을 치료하고 종양 또는 악성 상태로의 진행을 예방하는데 사용될 수 있다. 이러한 용도는 특히 증식증, 화생증, 가장 특별하게는 이형성증으로 구성된 비-종양성 세포 성장이 발생한 경우 종양 또는 암으로의 진행 예측의 알려지거나 짐작된 이상에서 나타난다(이러한 비정상 성장 이상의 조사를 위해 Robbins and Angel, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 참조).

[0241] 증식증은 구조 또는 기능의 유의적인 변경 없이 조직 또는 기관 내 세포수의 증가를 포함한 제어된 세포 증식 형태이다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 과다형성 장애는 혈관여포양 림프절 증식증, 호산구증가 혈림프관 증식증, 비정형 멜라닌세포 증식증, 기저세포 증식증, 양성 거대 림프절 증식증, 시멘트질 증식증, 선천성 부신 증식증, 선천성 피지선 증식증, 낭성 증식증, 유방 낭성 증식증, 의치 증식증, 유관 증식증, 자궁내막 증식증, 섬유근성 증식증, 국소상피 증식증, 치은 증식증, 섬유 염증성 증식증, 염증성 유두 증식증, 혈관내 유두양 내피세포 증식증, 전립선 결절 증식증, 결절 재생 증식증, 가성상피종성 증식증, 노인성 피지선 증식증 및 사마귀양 증식증을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0242] 화생증은 하나의 형태의 성체 또는 완전하게 분화된 세포가 또다른 형태의 성체 세포로 대체되는 제어된 세포 성장의 형태이다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 화생 장애는 원인불명 골수 화생증, 아포크린 화생증, 비정형 화생증, 자가실질경 화생증, 결합 조직 화생증, 상피성 화생증, 창자 화생증, 화생성 빈혈, 화생성 골화, 화생성 폴립, 골수 화생증, 원발성 골수 화생증, 속발성 골수 화생증, 편평상피 화생증, 양막 편평상피 화생증 및 증후성 골수 화생증을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0243] 이형성증은 주로 암의 전신이고, 상피에서 주로 발견된다; 이는 개별적 세포 균일성 및 세포의 구조적 배향의 소실을 포함한 가장 무질서한 비-조양성 세포 성장 형태이다. 이형성 세포는 흔히 비정상적인 크고 짙게 염색된 세포핵을 지니고 다형성을 나타낸다. 이형성증은 만성적 자극 또는 염증이 존재하는 경우 특징적으로 발생한다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 이형성 장애는 무한성 외배엽 이형성증, 전면안면 이형성증, 질식 흉부 이형성증, 심방수지 이형성증, 기관지폐 이형성증, 대뇌 이형성증, 자궁경부 이형성증, 연골외배엽 이형성증, 쇄골두개골 이형성증, 선천성 외배엽 이형성증, 두개골간 이형성증, 두 개수족근골 이형성증, 두개골중간부 이형성증, 상아질 이형성증, 골간 이형성증, 외배엽 이형성증, 사기질 이형성증, 대뇌-안구 이형성증, 골단 편지 이성형증, 다발성 골단 이형성증, 점상 골단 이형성증, 상피 이형성증, 안면수지생식기 이형성증, 악골 가족성

섬유 이형성증, 가족성 백색 중첩 이형성증, 섬유근 이형성증, 골섬유성 이형성증, 개화성 골 이형성증, 유전성 신장-망박 이형성증, 발한성 외배엽 이형성증, 발한저하성 외배엽 이형성증, 램프구감소성 흉선 이형성증, 유방 이형성증, 하악안면 이형성증, 골중간부 이형성증, 몬디니 이형성증, 방사 단골섬유성 이형성증, 점막상피 이형성증, 다발성 골단 이형성증, 안이척추 이형성증, 안이지 이형성증, 안척추 이형성증, 치원성 이형성증, 안하악 이형성증, 치근단 백악질 이형성증, 다골 섬유 이형성증, 가성연골발육부전 척추골단 이형성증, 망막 이형성증, 중격-시신경 이형성증, 척추골단 이형성증 및 뇌실방사 이형성증을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0244] 본 발명의 방법 및 조성물로 치료될 수 있는 추가적인 전종양 장애는 양성 증식이상 장애(예를 들어 양성 종양, 섬유낭성 이상, 조직 비대, 장 폴립, 결장 폴립 및 식도 이형성증), 백색판증, 각화증, 보웬병, 농부 피부, 일광 입술염 및 일광 각화증을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0245] 바람직한 실시태양에서 본 발명의 방법 및 조성물은 특히 상기 기입된 암의 성장, 진행 및/또는 전이를 저해하는데 사용된다.

[0246] 바람직한 실시태양에서 본 발명의 방법 및 조성물은 암, 특히 유방암, 난소암, 방광암, 전립선암, 혀장암, 결장암 및 흑색종으로 구성된 군에서 선택된 암의 성장, 진행, 및/또는 전이를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0247] 과다증식 질환을 치료하기 위해 투여되는 항체 또는 항체들은 선택적으로는 아폽토시스 유도 가능 작용제와 함께 투여된다. 아폽토시스-유도 치료법은 화학치료제(또한 항종양제로도 알려짐), 방사선 치료법 및 방사선치료법과 화학치료법의 병용을 포함한다.

[0248] 일부 바람직한 실시태양에서 과다증식 질환 예를 들어 암을 치료하기 위해 투여되는 본 발명의 항체는 화학치료제와 함께 투여된다. 예를 들어 본 발명은 치료제와 함께 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 HER2 항체를 투여하는 단계뿐만 아니라 치료제와 함께 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함한 암 치료 방법을 포함한다.

[0249] 예시적인 치료제는 빈카 알칼로이드, 에피포도필로톡신, 안트라사이클린 항생제, 악토마이신 D, 플리카마이신, 퓨로마이신, 그라미시딘 D, 파클리탁셀(TaxolTM, Bristol Myers Squibb), 콜히친, 사이토칼라신 B, 에마틴, 메이탄시네 및 암사크린(또는 "mAMSA")이다. 빈카 알칼로이드 종류는 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), (1985), pp. 1277-1280에 기재되어 있다. 빈카 알칼로이드의 예는 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 빈데신이다. 에피포도필로톡신 종류는 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), (1985), pp. 1280-1281에 기재되어 있다. 에피포도필로톡신의 예는 에토포사이드, 에토포사이드 오르토퀴논 및 테니포사이드이다. 안트라사이클린 항생제 종류는 Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), (1985), pp. 1283-1285에 기재되어 있다. 안트라사이클린 항생제의 예는 다우노루비신, 독소루비신, 마이톡산트라온 및 비산트렌이다. 닥티노마이신으로도 명명되는 악티노마이신 D는 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), (1985), pp. 1281-1283에 기재되어 있다. 마이트라마이신으로도 명명되는 파클리마이신은 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), (1985), pp. 1287-1288에 기재되어 있다. 추가적인 화학치료제는 시스플라틴(PlatinolTM, Bristol Myers Squibb), 카보플라틴(ParaplatinTM, Bristol Myers Squibb), 마이토마이신(MutamycinTM, Bristol Myers Squibb), 알트레타민(HexalenTM, U.S. Bioscience, Inc.), 사이클로포스파마이드(CytoxanTM, Bristol Myers Squibb), 로무스틴(CCNU)(CeeNUTM, Bristol Myers Squibb), 카무스틴(BCNU)(BiCNUTM, Bristol Myers Squibb)을 포함한다.

[0250]

또한 예시적인 화학치료제는 아클라티노마이신 A, 아클라루비신, 아크로닌, 아크로나이신, 아드라아마이신, 알데스류킨(인터류킨n-2), 알트레타(헥사미에틸멜라민), 아미노글루테트이미드, 아미노글루테트이미드(사이타드렌), 아미노이미다졸 카르복스아마이드, 암사크린(m-AMSA; 암시딘), 아나스트라졸(아리미텍스), 안시타빈, 안트라사이클린, 아트라마이신, 아스파라기나제(엘스파), 아자시트딘, 아자시티딘(라다카마이신), 아자구아닌, 아자세린, 아자우리딘, 1,1',1"-포스피노티오일리딘트리스 아지리딘, 아지리노(2', 3':3,4)페롤(1,2-a)인돌-4,7-디온, BCG(트랄시스), BCNU, BCNU 클로로에틸 니트로소우레아스, 벤즈아마이드, 4-(비스(2-클로로에틸)아미노)벤젠부타노의 애시드, 비칼루타마이드, 비스클로로에틸 니트로소우레아, 블레오마이신, 블레오마이신(베노잔), 블레오마이신, 브로모데옥시우리딘, 브록스우리딘, 부술판(마이레란), 카바미애시드 에틸 에스테르, 카보플라틴, 카보플라틴(파라플라틴), 카무스틴, 카무스틴(BCNU; BiCNU), 클로람부실(류케란), 클로로에틸 니토로소우레아, 코로조톡신(DCNU), 크로모마이신 A3, 시스-레티노산, 시스플라틴(시스-ddpl; 플라티놀), 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신; 2cda; 휴스타틴), 코포마이신, 사이클로류신, 사이클로포스파마이드, 무수사이클로포스파마이드, 클로람부실, 사이타라빈, 사이타라빈 HC1(cytosar-u), 2-데옥시-2-(((메틸니트로소아미노)카르보닐)아미노)-D-글루코스, 다카바진, 닥티노마이신(코스메겐), 다우노루비신, 다우노루비신 HC1(세루비딘), 테카바진(DTIC-돔), 테메콜신, 텍사메타손, 디안하이드로갈락티톨, 디아조옥소노르류신, 디에틸스틸베스트롤, 도세탁셀(탁소테레), 독소루비신 HC1(아드라이마이신), 염산독소루비신, 에플로미틴, 에스트라무스틴, 에스트라무스틴 인산 나트륨(emcyt), 에티오디제드 오일, 이토글루시드, 에틸 카바메이트, 에틸 메탄슬포네이트, 에토포사이드(VP 16-213), 펜레티니드, 플록수리딘, 플록수리딘(fudr), 플루다라딘(fladara), 플루오로우라실(5-FU), 플루옥시메스테론(할로테스틴), 플루타마이드, 플루타마이드(에우렉신), 플록수리딘, 질산갈륨(그라니트), 겹시타빈(겹자), 게니스테인, 2-데옥시-2-(3-메틸-3-니트로소우레이도)-D-글루코파라노스, 고세렐린(졸라텍스), 헥세스트롤, 하이드록시우레아(하이드라), 이다루비신(이다마이신), 이소프파俭시타빈, 이포스파마이드(이플렉스), 메스타를 지닌 이포스파마이드(MAID), 인터페론, 인터페론 알파, 인터페론 알파-2a, 알파-2b, 알파-n3, 인터류킨-2, 이오벤구안, 이오벤구안, 이오벤구안, 이리노테칸(캄프토사r), 이소트레티노인(아큐坦), 캐토코나졸, 4-(비스(2-클로로에틸)아미노)-L-페닐알라닌, L-세린 디아조아세테이트, 렌티난, 류코보린, 류프롤라이드 아세테이트(LHRH-아날로그), 라바미솔(에가미솔), 로무스틴(CCNU; cee-NU), 만노무스틴, 마이탄신, 메클로렉타민, 메클로렉타민 HC1(질소 머스타드), 메드록시프로게스테론 아세테이트(프로베라, 데포 프로베라), 메게스트롤 아세테이트(메나세), 멜렌게스트롤 아세테이트, 멜팔란(알카란), 메노가릴, 머캅토퓨린, 머캅토퓨린(퓨린톨), 무수머캅토퓨린, MESNA, mesna(mesne), 메탄슬픈산, 에틸 에스테르, 메토스렉세이트(mtx; 메토스렉세이트), 메틸-ccnu, 미모신, 미소니다졸, 미트라마이신, 미토안트론, 미토브로니톨, 미토구아존, 미토락톨, 미토마이신(뮤타마이신), 미토마이신 C, 미토탄(o,p'-DDD; 리소드렌), 미톡산트론, 미톡산트론 HC1(노반트론), 모피다몰, N,N-비스(2-클로로에파하일)테트라하이드로-2H-1,3,2-옥사자포스포린-2-아민-2-옥사이드, N-(1-메틸에틸)-4-((2-메틸하이라지노)메틸)벤즈아마이드, N-메틸-비스(2-클로로에틸)아민, 니카디핀, 닐루타마이드(닐란드론), 니무스틴, 니트라크린, 질소 머스타드, 노코다졸, 노갈라마이신, 옥트레오티드(산도스타틴), 파클리탁셀(탁솔), 파클리탁셀, 파크타마이신, 폐가스파가스(PEGx-I), 펜토스타틴(2'-데옥시코포마이신), 폐플로마이신, 페토케미오, 포토포레시스, 피카마이신(미트라신), 피시바닐, 피포브로만, 플리카마이신, 포도필록스, 포도필로톡신, 포피로마이신, 프레드니손, 프로카바진, 프로카비진 HC1(마툴란), 프로스피дум, 퓨로마이신, 퓨로마이신 아미노뉴클레오사이드, PUVA(프소랄렌+자외선 a), 피란코폴리머, 라파마이신, s-아자사이티딘, 2,4,6-트리스(1-아지리디닐)-s-트리아진, 세무스틴, 쇼도마이신, 시롤리무스, 스트렙토조신(자노사), 수라민, 구연산타목시펜(놀바텍스), 탁순, 테가파, 테니포사이드(VM-26; 부몬), 테누아조닉 애시드, TEPA, 테스톨락톤, 티오-테파, 티오구아닌, 티오테파(티오플렉스), 티롤론, 토포테칸, 트레티노인(베사노이드), 트리아큐온, 트리코데민, 트리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아마이드, 트리에틸렌티오포스포르아마이드, 트리메트랙세이트(뉴트렉신), 트리스(1-아지리디닐)포스핀 옥사이드, 트리스(1-아지리디닐)포스핀 설파이드, 트리스(아지리디닐)-p-벤조퀴논, 트리스(아지리디닐)포스핀 설파이드, 우라실 머스타드, 비다라빈, 인산비다라빈, 빈블라스틴, 황산빈블라스틴(벨반), 황산빈크리스틴(온코빈), 빈데신, 비노렐빈, 주석산비노렐빈(나벨빈), (1)-미모신, 1-(2-클로로에틸)-3-(4-메틸사이클로헥실)-1-니트로소우레아, (8S-시스)-10-((3-아미노-2,3,6-트리데옥시-알파-L-일옥소-헥소파라노실)옥시)-7,8,9,10-테트라하이드로-6,8, 11-트리하이드록시-8-(하이드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타세네디온, 131-메타-이도벤질 구아니딘(1-131 MIBG), 5-(3,3-디메틸-1-트리아제닐)-1H-이미디졸-4-카르복스아마이드, 5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-2,4(1H,3H)-페리미디디온, 2,4,6-트리스(1-아지리디닐)-s-티이진, 2,3,5-트리스(1-아지리디닐)-2,5-사이클로헥사디엔-1,4-디온, 2-클로로-N-(2-클로로에틸)-N-메틸에탄아민, N,N-비스(2-클로로에틸)테트라하이드로-2H-1,3,2-옥스아자포스포린-2-아민-2-옥사이드, 3-데아자우리딘, 3-이오도벤질 구아니딘, 5,12-나프타세네디온, 5-아자사이티딘, 5-플루오로우라실, (1aS,8S,8aR,8bS)-6-아미노-8-(((아미노카르보닐)옥시)메틸)-

1, 1a, 2, 8, 8a, 8b-헥사하이드로-8a-메톡시-5-메틸아지리노(2', 3'): 3, 4) 피롤(1, 2-a)인돌-4, 7-디온, 6-아자우리딘, 6-머캅토퓨린, 8-아자구아닌 및 그의 조합을 포함한다.

[0251] 특정한 실시태양에서 본 발명의 방법에 사용되는 화학치료제는 파클리탁셀이다. 또 다른 특정한 실시태양에서 본 발명의 방법에 사용되는 화학치료제는 아드리아마이신이다.

[0252] 바람직한 치료제 및 그의 조합은 독소루비신 및 도세탁셀, 토포테칸, 파클리탁셀(탁솔), 카보플라틴과 탁솔, 시스플라틴과 방사선, 5-플루오로우라실(5-FU)과 방사선, 톡소터, 플루다라빈, Ara C, 에토포사이드, 빙크리스틴 및 빙블라스틴을 포함한다.

[0253] 본 발명의 방법에서 투여되는 화학치료제는 항생 유도체(예를 들어 독소루비신, 블레오마이신, 다우노루비신 및 닥티노마이신); 항에스트로겐(예를 들어 타목시펜); 항대사물질(예를 들어 플루오로우라실, 5-FU, 메토트렉세이트, 플록스우리딘, 인터페론 알파-2b, 글루탐산, 폴리카마이신, 머캅토퓨린 및 6-티오구아닌); 세포독성제(예를 들어 카무스틴, BCNU, 로무스틴, CCNU, 사이토신 아라비노사이드, 사이클로포스파마이드, 에스트라무스틴, 하이드록시우레아, 프로카바진, 미토마이신, 부술판, 시스플라틴 및 황산빈크리스틴); 호르몬(예를 들어 메드록시프로게스테론, 에스트라무스틴 인산 나트륨, 에티닐 에스트라디올, 메게스트롤 아세테이트, 메틸테스토스테론, 디에틸 스틸베스트롤 디포스페이트, 클로로트리아니센 및 테스토락톤); 질소 머스타드 유도체(예를 들어 메팔렌, 코람부실, 메클로레타민(질소 머스타드) 및 티오텐파); 스테로이드 및 조합(예를 들어 베타메타손 인산나트륨) 및 그 외(예를 들어 디카바진, 아스파라기나제, 미토탄, 황산빈크리스틴, 황산빈블라스틴 및 에토포사이드)를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0254] 특정한 실시태양에서 본 발명의 항체는 CHOP(사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레디니손) 또는 CHOP의 구성성분의 어떠한 조합과도 함께 투여된다.

표 2: 주요 암 치료에 대해 일반적으로 사용되는 화학치료 약물

1. 유방암: 보조치료법(수술에 대한 보조 또는 부가적 전신 치료법). 독소루비신(아드리아마이신), 사이클로포스파마이드 및 탁산(파클리탁셀(탁솔) 및 도세탁셀(탁소터). 또한 이들 3개 약물은 전이성 유방암에 활성적이나 환자가 이미 이를 보조치료법으로 수용한 경우 일반적으로 사용되는 약물은 카페시타빈(젤로다), 켐시타빈(켐자), 비노렐빈(나벨빈)이다. 호르몬 수용체 양성 종양의 골 전이에 대해 일반적으로 처방되는 호르몬제는: 타목시펜 및 아로마타제 저해제(아리미텍스, 페마라, 아로마신)이다.
2. 결장암: 5-FU + 류코보린, 이리노테칸(캄프토사), 옥살리플라틴 및 카페시타빈
3. 폐암: 시스플라틴, 카보플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 켐시타빈, 비노렐빈
4. 전립선암: 도세탁셀, 에스트라무스틴, 미톡산트론(노반트론) 및 프레드니손
5. 비-호지킨 림프종: 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빙크리스틴(온코빈) 및 프레드니손

[0255]

[0256] 일부 실시태양에서 본 발명의 방법은 치료적 방사선과 함께 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 HER2 항체를 투여하는 것에 관한 것이다. 또 다른 실시태양에서 본 방법은 치료 방사선과 함께 하나 이상의 C35 항체와 하나 이상의 EGFR 항체를 투여하는 것에 관한 것이다. 선택적으로는 이들 방법은 화학치료제의 투여도 포함할 수 있

다. 예를 들어 일부 실시태양에서 본 발명은 화학치료제 또는 치료 방사선과 함께 C35 항체와 하나 이상의 HER2 항체를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 또다른 실시태양에서 본 발명은 화학치료제 또는 치료 방사선과 함께 C35 항체와 하나 이상의 EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0257] 치료 방사선은 예를 들어 분할 방사선치료, 비분할 방사선치료 및 과다분할 방사선치료 및 방사선과 화학치료의 병용을 포함한다. 또한 방사선 형태는 이온화(감마) 방사선, 입자 방사선, 저에너지 투파(LET), 고에너지 투파(HET), 자외선 방사선, 적외선 방사선, 가시광선 및 광감작 방사선을 포함한다. 본원에 사용된 화학치료법은 단일 화학치료제 또는 약제의 조합으로의 치료를 포함한다. 치료 목적으로 화학치료법은 수술 치료 또는 방사선 치료법 또는 항종양 치료법과 병용된다.

[0258] 또다른 실시태양에서 본 발명의 항체 또는 그의 조합은 항바이러스제와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 투여되는 항바이러스제는 아시클로버, 리바비린, 아만타딘 및 레만티딘을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0259] 또한 본 발명의 항체 또는 그의 조합은 2-(에틸티오)-10-(3-(4-메틸-1-피페라지닐)프로필)-10H-페노티아진(에틸티오페라진), 1-(p-클로로-알파-페닐벤질)-4-(m-메틸벤질)-피페라진(메클로진, 메클리진) 등 및 그의 조합과 같은 항구토제와 함께 투여된다. 또한 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 본원에 개시되거나 당분야에 알려진 다른 치료제 또는 그의 조합과 함께 투여된다.

[0260] 본 발명의 항체 또는 그의 조합과 함께 투여되는 통상의 비특이적 면역억제제는 스테로이드, 사이클로스포린, 사이클로스포린 유사체, 사이클로포스파마이드 메틸프레드니손, 프레드니손, 아자티오프린, FK-506, 15-데옥시스페구알린 및 T 세포에 대한 반응 기능을 억제함으로서 작용하는 다른 면역억제제를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0261] 특정한 실시태양에서 본 발명의 항체 또는 그의 조합은 면역억제제와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 면역억제제 제제는 ORTHOCLONE™ (OKT3), SANDMMUNE™ /NEORAL™ /SANGDYA™ (사이클로스포린), PROGRAF™ (타크롤리무스), CELLCEPT™ (마이코페놀레이트), 아지티오프린, 글루코티코스테로이드 및 RAPAMUNE™ (시롤리무스)를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 특정한 실시태양에서 면역억제제는 기관 또는 골수 이식 거부반응을 방지하는데 사용된다.

[0262] 또다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 단독으로 또는 하나 이상의 정맥내 면역글로불린 제제와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 정맥내 면역글로불린 제제는 GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™ 및 GAMEVrUNE™을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 특정한 실시태양에서 본 발명의 항체는 이식 치료법(예를 들어 골수 이식)에서 정맥내 면역글로불린 제제와 함께 투여된다.

[0263] 또다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 단독으로 또는 항-염증제와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 항-염증제는 글루코코르티코이드 및 비스테로이드성 항-염증제, 아미노아릴카르복실산 유도체, 아릴아세트산 유도체, 아릴부티르산 유도체, 아릴카르복실산, 아릴프로피온산 유도체, 피라졸, 피라졸론, 살리실산 유도체, 티아진카르복스아마이드, e-아세트아미도카프로산, S-아데노실메티오닌, 3-아미노-4-하이드록시부티르산, 아미젝트린, 벤다작, 벤지드아민, 부코롬, 디펜피라마이드, 디티졸, 에모파존, 구아이아줄렌, 나부메톤, 니메술리드, 오르고테인, 옥사세프롤, 파라닐린, 페리속살, 페폭심, 프로쿠아존, 프록사졸 및 테니답을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0264] 또다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 사이토카인과 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 사이토카

인은 IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, 항-CD40, CD40L, IFN-감마 및 TNF-알파를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 또 다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 IL-1알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, BL-11, IL-12, LL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20 및 IL-21을 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 인터류킨과 함께 투여된다.

[0265] 또 다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 혈관형성 단백질과 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 혈관형성 단백질은 유럽 특허 번호 EP-399816에 개시된 신경아교종 유래 성장 인자(GDGF); 유럽 특허 번호 EP-6821 10에 개시된 혈소판 유래 성장 인자-A(PDGF-A); 유럽 특허 번호 EP-282317에 개시된 혈소판 유래 성장 인자-B(PDGF-B); 국제 공개번호 WO 92/06194에 개시된 태반 성장 인자(PIGF); Hauser et al., *Growth Factors*, 4:259-268 (1993)에 기재된 태반 성장 인자-2(PIGF-2); 국제 공개 번호 WO 90/13649에 개시된 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 유럽 특허 번호 EP-506477 혈관 내피 성장 인자-A(VEGF-A); 국제 공개 번호 WO 96/39515에 개시된 혈관 내피 성장 인자-2(VEGF-2); 혈관 내피 성장 인자 B(VEGF- 3); 국제 공개 번호 WO 96/26736에 개시된 혈관 내피 성장 인자 B-186(VEGF-B 186); 국제 공개 번호 WO 98/02543에 개시된 혈관 내피 성장 인자-D(VEGF-D); 국제 공개 번호 WO 98/07832에 개시된 혈관 내피 성장 인자-D(VEGF-D); 및 독일 특허 번호 DE 19639601에 개시된 혈관 내피 성장 인자-E(VEGF-E)를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 상기 언급된 참고문헌은 본원에 참고문헌으로 포함된다.

[0266] 또 다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 조혈 성장 인자와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 조혈 성장 인자는 LEUKINETM(SARGRAMOSTIMTM) 및 NEUPOGENTM(FILGRASTIMTM)을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0267] 또 다른 실시태양에서 본 발명의 항체는 섬유아세포 성장 인자와 함께 투여된다. 본 발명의 항체와 함께 투여되는 섬유아세포 성장 인자는 FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14 및 FGF-15를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

투여 시점

[0269] 본원에 기재된 어떠한 아폽토시스 유도 치료제도 본 발명의 하나 이상의 항-C35 항체 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다. 특정한 실시태양에서 아폽토시스-유도제는 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 및 항-IGFR 항체에서 선택된 항체이다. 일부 실시태양에서 항-C35 항체와 하나 이상의 아폽토시스-유도 항체는 동시에 투여된다. 예를 들어 항-C35 항체는 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체와 동시에 투여된다. 또 다른 실시태양에서 상기 항체는 개별적으로 투여된다. 예를 들어 항-HER2 항체가 먼저 투여된 후 항-C35 항체는 동일한 일자 이후에 또는 첫 번째 항체가 투여된 일자의 1일 이상 이후에 투여될 수 있다. 유사하게 항-EGFR 항체가 먼저 투여된 후 항-C35 항체는 동일한 일자 이후에 또는 첫 번째 항체가 투여된 일자의 1일 이상 이후에 투여될 수 있다. 항-IGFR 항체가 먼저 투여된 후 항-C35 항체는 다른 항체(예를 들어 항-HER2, 항-EGFR 또는 항-IGFR)가 투여되지 않은 일자 예를 들어 하나 이상의 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 또는 항-IGFR 항체 또는 이의 조합의 투여 이전 일자 또는 하나 이상의 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 또는 항-IGFR 항체 또는 이의 조합의 투여 이후 일자에 투여될 수 있다.

[0270] 또 다른 실시태양에서 다수의 항체(예를 들어 항-C35 항체 및 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체) 투여는 예를 들어 페클리탁셀(TaxolTM), 아드리아마이신, 시스플라틴 또는 본원에 기재된 어떠한 약제와 같은 화학치료제의 투여 이전, 이후 또는 동시에 발생한다. 예를 들어 1 또는 2 이상의 항체는 페클리탁셀, 아드리아마이신, 시스플라틴 또는 다른 약제와 동일 시간 또는 동일 일자에 투여될 수 있다. 또한 페클리탁셀, 아드리아마이신, 시스플라틴 또는 다른 약제는 항체가 투여되지 않은 일자 예를 들어 하나 이상의 항체 투여 이전 일자 또는 하나 이상의 항체 투여 이후 일자에 투여될 수 있다.

[0271]

일부 실시태양에서 아폽토시스 유도제(예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 하나 이상의 항-C35 항체의 투여 이전에 투여될 수 있다. 예를 들어 아폽토시스 유도제(예를 들어 예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 치료를 요하는 피험체로 하나 이상의 항체 투여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 이전에 투여될 수 있다. 일부 실시태양에서 아폽토시스 유도제(예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 본 발명의 하나 이상의 항-C35 항체의 투여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 31일 이전에 투여될 수 있다. 특정한 실시태양에서 아폽토시스 유도제는 항체, 특히 예를 들어 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 또는 항-IGFR 항체이다. 특정한 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맵이다. 또다른 특정한 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세톡시맵이다. 또다른 실시태양에서 아폽토시스-유도제는 화학치료제 예를 들어 파클리탁셀 또는 아드리아마이신 또는 시스플라틴이다.

[0272]

일부 실시태양에서 아폽토시스 유도제(예를 들어 예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 하나 이상의 항-C35 항체의 투여 이후에 투여될 수 있다. 예를 들어 아폽토시스 유도제(예를 들어 예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 치료를 요하는 피험체로 하나 이상의 항-C35 항체 투여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 이후에 투여될 수 있다. 일부 실시태양에서 아폽토시스 유도제(예를 들어 항-HER2 항체 및/또는 항-EGFR 항체 및/또는 항-IGFR 항체)는 본 발명의 하나 이상의 항-C35 항체의 투여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 31일 이후에 투여될 수 있다. 특정한 실시태양에서 아폽토시스 유도제는 항체, 특히 예를 들어 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체 또는 항-IGFR 항체이다. 특정한 실시태양에서 항-HER2 항체는 트라스투추맵이다. 또다른 특정한 실시태양에서 항-EGFR 항체는 세톡시맵이다. 또다른 실시태양에서 아폽토시스-유도제는 화학치료제 예를 들어 파클리탁셀 또는 아드리아마이신 또는 시스플라틴이다.

[0273]

하나의 실시태양에서 항체는 치료 진행 동안 주 간격으로 투여된다. 특정한 실시태양에서 항체는 치료 진행 동안 2주간 주 1회 투여된다. 더욱 특정한 실시태양에서 항체는 치료 진행의 첫 번째 2주 동안 주 1회 투여된다. 일부 실시태양에서 항체는 치료 진행 동안 주 1회, 2회 또는 3회 투여된다. 특정한 실시태양에서 항체는 치료 진행 동안 주 2회 투여된다.

[0274]

하나의 실시태양에서 항체는 주 2회 투여된다. 또다른 실시태양에서 치료제(예를 들어 파클리탁셀, 아드리아마이신 또는 시스플라틴과 같은 화학치료제)는 주 1회 투여된다. 하나의 실시태양에서 치료제는 치료 첫 번째 일자에 투여되고 치료제의 두 번째 용량은 1주 후에 투여되고, 항체 조합은 주 2회 투여된다.

[0275]

특정한 실시태양에서 치료 진행은 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 1년이 될 수 있다. 치료 진행 기간은 암 형태, 사용된 항체, 화학치료제, 환자 연령 등에 따라 달라질 것이다. 이를 파라미터는 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0276]

치료 활성 입증

[0277]

본 발명의 방법 및 항체는 인간에 사용하기 전 바람직한 치료 또는 예방 활성에 대해 시험관 내 및 생체 내에서 시험될 수 있다. 예를 들어 화합물 또는 약제학적 조성물의 치료 또는 예방 유용성을 입증하기 위한 시험관 내 분석은 세포주 또는 환자 조직 표본 상의 화합물의 효과를 포함한다. 세포주 및/또는 조직 표본 상의 화합물 또는 조성물의 효과는 세포 증식 분석 및 세포 용해 분석을 포함하나 이에 한정적인 것은 아닌 당분야에 알려진 기술을 이용하여 측정될 수 있다. 본 발명에 따라 특정 화합물의 투여가 표시되는지 여부를 측정하는데 사용될

수 있는 시험관 내 분석은 환자 조직 표본이 배양액 내에서 성장되고 화합물에 노출되거나 투여되는 시험관 내 세포 배양 분석을 포함하고, 조직 표본 상의 이러한 화합물의 효과가 관찰된다.

[0278] 본 발명은 상기 방법에서 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 하나의 실시태양에서 키트는 하나 이상의 용기 내의 하나 이상의 C35 및 하나 이상의 HER2 항체 또는 하나 이상의 EGFR 항체 또는 하나 이상의 IGFR 항체, 바람직하게는 하나 이상의 정제된 항체를 포함한다.

[0279] VIII. 약제학적 조성물 및 투여 방법

[0280] 필요한 피험체에 대해 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체를 제조하고 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고 용이하게 측정될 수 있다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여 경로는 예를 들어 경구, 비경구, 흡입 또는 도포이다. 본원엔 사용된 용어 비경구는 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복막내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 이들 투여 형태 모두는 본 발명의 범위 내에 존재하는 것으로 명백하게 간주되고, 투여 형태는 주사, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적주입을 위한 용액이 될 것이다. 일반적으로 주사에 적당한 약제학적 조성물은 완충액(예를 들어 초산염, 인산염 또는 구연산염 완충액), 계면활성제(예를 들어 폴리소르베이트), 선택적으로는 안정화제(예를 들어 인간 알부민) 등을 포함한다. 그러나 본원에 나타난 바와 양립 가능한 또 다른 방법에서 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 유해한 세포군의 부위로 직접 전달되어 질환 조직의 치료제로의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0281] 종전 논의된 바와 같이 본 발명의 하나 이상의 항-C35 항체 및 하나 이상의 항-HER2 항체 또는 하나 이상의 항-EGFR 항체 또는 하나 이상의 항-IGFR 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 암, 특히 유방암과 같은 과다증식 질환의 생체 내 치료에 약제학적으로 효과적인 함량으로 투여된다.

[0282] 이러한 관점에 있어서, 개시된 항체는 투여를 촉진시키고 활성 약제의 안정성을 증진시키기 위해 제형화될 것임이 인식될 것이다. 바람직하게는 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 생리 식염수, 비-독성 완충액, 방부제 등과 같은 약제학적으로 허용 가능한 비-독성 멸균 담체를 포함한다.

[0283] 본 출원의 목적으로 컨쥬게이트되거나 컨쥬게이트되지 않은 약제학적으로 효과적인 함량의 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 타겟에 대한 효과적인 결합을 달성하고 이익을 달성하는 예를 들어 질환 또는 장애 증상을 개선시키거나 물질 또는 세포를 검출하는데 충분한 함량을 의미한다.

[0284] 하나의 실시태양에서 전체 항체 용량은 단일 볼루스(bolus) 내에 제공된다. 또한 용량은 확대 주입 방법과 같은 다수의 투여에 의해 또는 시간 또는 일의 기간 예를 들어 약 2 내지 약 4일의 기간 동안 투여되는 반복 주입에 의해 제공될 수 있다.

[0285] 일부 실시태양에서 하나 이상의 항-C35 항체와 하나 이상의 항-HER2 항체 또는 항-EGFR 항체 또는 항-IGFR 항체는 동일한 약제학적 제제 내에 함께 투여된다. 또 다른 실시태양에서 항체는 개별적인 약제학적 제제로 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0286] 화합물이 상기 기재된 혼산 또는 면역글로불린을 포함하는 경우 사용될 수 있는 제형 및 투여 방법; 추가적인 적당한 제형 및 투여 경로는 본원에 하기 기재된 것 중에서 선택될 수 있다.

- [0287] 예를 들어 리포솜 내 피막화, 극미립자, 미소캡슐, 화합물을 발현 가능한 재조합 세포, 수용체-매개 세포내이입(예를 들어 Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987) 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서 핵산 구축과 같은 다양한 전달 시스템이 알려져 있고 본 발명의 화합물을 투여하는데 사용될 수 있다. 도입 방법은 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 화합물 또는 조성물을 어떠한 편리한 경로 예를 들어 주입 또는 볼루스 주입에 의해, 상피 또는 점막피부내충(예를 들어 구강 점막, 직장 및 창자 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여되고 다른 생물학적 활성 약제와 함께 투여된다. 투여는 전신 또는 국소가 될 수 있다. 더욱이 심실내 및 경막내 주사를 포함한 어떠한 적당한 경로에 의해서도 본 발명의 약제학적 화합물 또는 조성물을 중추 신경계 내로 도입시키는 것이 바람직하다; 심실내 주사는 Ommaya 저장소와 같은 저장소에 부착된 심실내 카테테르에 의해 촉진된다. 또한 흡입기 또는 분무기 및 분무제를 지닌 제형의 이용에 의해 폐 투여도 이용될 수 있다.
- [0288] 특정한 실시태양에서 본 발명의 약제학적 화합물 또는 조성물을 치료를 요하는 범위로 국소적으로 투여하는 것이 바람직하다; 이는 예를 들어 제한 없이 수술 동안 국소 주입, 예를 들어 수술 후 상처 드레싱과 함께 도포 적용에 의해, 주사에 의해, 카테테르에 의해, 좌약에 의해 또는 시알라스틱 맴브레인(sialastic membrane) 또는 섬유와 같은 맴브레인을 포함한 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴 물질인 이식물에 의해 달성된다. 바람직하게는 본 발명의 항체를 포함한 단백질을 투여하는 경우 단백질이 흡수하지 않는 물질을 사용하는 것이 고려되어야 한다.
- [0289] 또 다른 실시태양에서 화합물 또는 조성물은 운반체 특히 리포솜 내에서 전달될 수 있다(Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327 참조).
- [0290] 또 다른 실시태양에서 화합물 또는 조성물은 제어된 방출 시스템 내에서 전달될 수 있다. 하나의 실시태양에서 펩프가 사용된다(Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989) 참조). 또 다른 실시태양에서 폴리머 물질이 사용될 수 있다(*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983) 참조; 또한 Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71 :105 (1989) 참조). 또 다른 실시태양에서 제어된 방출 시스템은 치료 타겟 즉 뇌 부근에 위치할 수 있고, 따라서 전신 용량의 분획만을 필요로 한다(예를 들어 Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 또 다른 제어된 방출 시스템은 Langer(*Science* 249:1527-1533 (1990))에 의한 논문에서 논의된다.
- [0291] 또한 본 발명은 약제학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 치료적으로 효과적인 함량의 화합물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 특정한 실시태양에서 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 동물 및 더욱 특별하게는 인간에 사용하기 위한 다른 일반적으로 인식되는 약전에 기입된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 운반체를 나타낸다. 이러한 약제학적 담체는 물 및 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원을 포함한 오일과 같은 멸균 액체가 될 수 있다. 약제학적 조성물이 정맥내로 투여되는 경우 물이 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 데스트로스 및 글리세롤 수용액도 특히 주사 가능 용액으로 액체 담체로서 이용될 수 있다. 적당한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 석회분말, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 모노스테아르산글리세롤, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 바람직한 경우 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충제도 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 혼탁액, 애밀전, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 일관된-방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 통상의 바인더 및 트리글리세라이드와 같은 담체와 함께 좌약으로 제

형화될 수 있다. 경구 제형은 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적당한 약제학적 담체의 예는 "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin 내에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 환자에게 적당한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 바람직하게는 정제 형태로 적당한 함량의 담체와 함께 치료적으로 효과적인 함량의 화합물을 포함할 것이다. 제형은 투여 방법에 적합해야 한다.

[0292] 바람직한 실시태양에서 조성물은 인간으로의 정맥내 투여를 위해 개조된 약제학적 조성물로서 통상의 절차에 따라 제형화된다. 일반적으로 정맥태 투여를 위한 조성물은 멸균 등장 수성 완충액 내 용액이다. 필요한 경우 조성물은 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위해 안정화제 및 국소 마취제도 포함한다. 일반적으로 성분은 활성 약제의 양을 표시하는 앰플 또는 sachette로서 밀폐 밀봉된 용기 내의 동결건조 분말 또는 수분 부재 농축물로서 단위 용량 형태 내에 개별적으로 또는 함께 혼합되어 제공된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우 멸균 약제학적 등급 물 또는 식염수를 포함한 주입병으로 투약될 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우 성분이 투여 전에 혼합되도록 주입용 멸균수 또는 식염수 앰플이 제공될 수 있다.

[0293] 본 발명의 화합물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 염산, 인산, 아세트산, 수산, 주석산 등에서 유래한 것과 같은 음이온으로 형성된 것 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제 이철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등에서 유래한 것과 같은 양이온으로 형성된 것을 포함한다.

[0294] 본 발명의 폴리펩타이드의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질환 또는 장애의 치료, 저해 및 예방에 효과적일 본 발명의 화합물의 함량은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 더욱이 시험관 내 분석은 선택적으로는 최적 용량 범위를 확인하는데 이용된다. 또한 제형화에 사용되는 정확한 용량은 투여 경로 및 질환 또는 장애의 경중도에 따라 달라질 것이고, 의사 및 각 환자의 상황 판단에 따라 결정되어야 한다. 효과적인 용량은 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템에서 유래한 용량-반응 곡선으로부터 추정된다. 하나의 실시태양에서 화학치료제의 최대 내성 용량의 측정 및 대표적인 화학치료법 프로토콜은 미국 특허 출원 번호 2005/0158323 A1(본원에 참고문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0295] 항체의 경우 환자에 투여되는 용량은 일반적으로 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 환자 체중이다. 바람직하게는 환자에 투여되는 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 환자 체중, 더욱 바람직하게는 약 1 mg/kg 내지 10 mg/kg 환자 체중이다. 일부 실시태양에서 항체는 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 환자 체중의 총 용량으로 투여된다. 또 다른 실시태양에서 항체는 약 20 mg/kg 내지 약 40 mg/kg 환자 체중의 총 용량으로 투여된다. 일반적으로 인간 항체는 외래 폴리펩타이드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종 유래의 항체보다 인간 신체 내에서 더 긴 반감기를 지닌다. 따라서 낮은 용량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여가 가능하다. 또한 본 발명의 항체의 용량 및 투여 빈도는 예를 들어 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 침투를 강화시킴으로서 감소된다.

[0296] 상기 논의된 바와 같이 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물의 하나 이상의 성분으로 충전된 하나 이상의 용기를 포함한 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 예를 들어 약제학적 팩 또는 키트는 2 이상의 항체(예를 들어 하나 이상의 항-C35, 항체와 하나 이상의 항-HER2 항체 또는 하나 이상의 항-EGFR 항체 또는 하나 이상의 항-IGFR 항체) 및 파클리탁셀 또는 아드리아마이신과 같은 화학치료제를 포함한 항체 제제를 포함한다. 일부 실시태양에서 항체는 동일한 용기 내에 존재한다. 또 다른 실시태양에서 항체는 개별적 용기 내에 존재한다. 일부 실시태양에서 화학치료제는 항체 제제와 동일한 용기 내에 존재한다. 또 다른 실시태양에서 화학치료제는 개별적 용기 내에 존재한다. 선택적으로는 약제학적 또는 생물학적 생성물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지가 이러한 용기(들)와 결합될 수 있고, 이러한 통지는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0297]

항체는 당업자에게 알려진 통상의 면역조직화학 방법을 이용하여 생물학적 표본 내 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 수치를 분석하는데 사용될 수 있다(예를 들어 Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101 :976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987) 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하는데 유용한 또 다른 항체-기반 방법은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 및 방사면역측정법(RIA)과 같은 면역분석을 포함한다. 적당한 항체 분석 표지는 당분야에 알려져 있고 글로코스 옥시다제; 요오드(¹³¹I), ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹¹⁵mIn, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In) 및 테크네튬(⁹⁹Tc, ⁹⁹mTc), 탈륨(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³Pd), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 크세논(¹³³Xe), 불소(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru 와 같은 방사성 동위원소; 루미놀과 같은 발광 표지; 및 플루오레세인, 로다민 및 비오틴과 같은 형광 표지를 포함한다.

[0298]

생물학적 표본 내 본 발명의 폴리펩타이드 수치 분석 이외에 단백질은 영상화에 의해 생체 내에서도 검출될 수 있다. 단백질의 생체 내 영상화를 위한 항체 표지 또는 마커는 X-방사선촬영, NMR 또는 ESR에 의해 검출 가능한 것을 포함한다. X-방사선촬영의 경우 적당한 표지는 검출 가능한 방사선을 방출하나 피험자에 명백하게 유해하지 않은 바륨 또는 세슘과 같은 방사선 동위원소를 포함한다. NMR 또는 ESR에 적당한 마커는 관련 하이브리도마에 대한 영양소를 표지함으로서 항체 내로 통합되는 중수소와 같은 검출 가능한 특징적인 회전을 지닌 것을 포함한다.

[0299]

방사선 동위원소(예를 들어 ¹³¹I, ¹¹²In, ⁹⁹mTc, (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹¹⁵mIn, ¹¹³mIn, ¹¹²In, ¹¹¹In) 및 테크네튬(⁹⁹Tc, ⁹⁹mTc), 탈륨(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³Pd), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 크세논(¹³³Xe), 불소(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru), 방사선-비투과 물질 또는 핵자기공명에 의해 검출 가능한 물질과 같은 적당한 검출 가능한 영상화 모이어티를 지닌 표지로 표지된 단백질-특이적 항체 또는 항체 단편은 면역 체계 장애에 대해 조사되는 포유류 내로 도입된다(예를 들어 비경구, 피하 또는 복막내). 피험체의 크기 및 사용되는 영상화 시스템은 진단 영상을 생성하는데 필요한 영상화 모이어티 양을 결정할 것임은 당분야에서 이해될 것이다. 방사선 동위원소 모이어티의 경우 인간 피험체에서 주입되는 방사능 양은 일반적으로 약 5 내지 20 밀리큐리의 ⁹⁹mTC의 범위일 것이다. 이후 표지된 항체 또는 항체 단편은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 위치에서 우선적으로 축적될 것이다. 생체 내에서 종양 영상화는 S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))에 기재되어 있다.

[0300]

당분야에 알려진 기술은 본 발명의 폴리펩타이드(항체 포함)를 표지하는데 응용된다. 이러한 기술은 이중기능성 컨쥬게이트 작용제(예를 들어 미국 특허등록 번호 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; 및 5,808,003; 각각의 내용은 본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함됨)의 이용을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

[0301]

본 발명의 실행은 나타나지 않는 한 당분야 내에 존재하는 세포생물학, 세포 배양, 분자생물학, 형질전환 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상의 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌 내에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. U.S. Pat. No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987);

Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N. Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods In Enzymology, VoIs. 154 and 155 (Wu et al. eds.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1986); and in Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) 참조.

[0302] 항체 조작의 일반적인 원리는 Antibody Engineering, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995)에 나타나 있다. 단백질 조작의 일반적인 원리는 Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995)에 나타나 있다.. 항체 및 항체-합텐 결합의 일반적인 원리는 Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); and Steward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984)에 나타나 있다. 더욱이 당분야에 알려져 있으나 상세하게 기재되지 않은 면역학 표준 방법은 일반적으로 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al (eds), Basic and Clinical - Immunology (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980)에 나타난 바와 같이 수행된다.

[0303] 면역학의 일반적인 원리를 나타내는 표준 참고 연구는 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., et al, eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., et al, eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), Kuby Immunology 4th ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, H. Freedman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., Immunology 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann and Dubel, Antibody Engineering, Springer Verlag (2001); Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, Genes VIII, Prentice Hall (2003); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer Cold Spring Harbor Press (2003)을 포함한다.

[0304] 상기 인용된 모든 문헌 및 본원 및 하기에 인용된 모든 문헌은 본원에 그 전체가 참고문헌으로 포함된다.

[0305] 실시예

[0306] 실시예 1

[0307] C35-양성 유방 종양 내 EGFR 및 HER2의 발현

[0308] C35-양성 인간 유방암 내 EGFR 및 HER2 발현 프로파일이 분석되었다. 일반적으로 모든 HER2-양성 종양은 C35-양성이다. 그러나 C35-양성 종양은 모두 HER2-양성은 아니다. C35-양성 종양의 임상 프로파일을 더 잘 이해하기 위해 HER2 과발현(HER2^{hi} 종양) 및 EGFR 발현에 대한 면역조직학 득점에 의한 C35^{hi} 발현의 상관관계가 표 3에

나타나 있다. C35^{hi} 종양은 득점 2+ 또는 3+로 정의되었다.

[0309]

종양 표본

[0310]

종양 조직 표본은 겨드랑이 수술을 받고 보조 치료법을 받지 않고 병리학 상에 음성 텁프절을 지닌 유방암으로 진단된 환자에서 유래하였다. 유방암 조직의 3개의 0.6 mm² 핵심이 대표적인 종양 영역으로부터 채취되었다. 이들 핵심은 3반복의 종양 마이크로-어레이를 구축하는데 사용되었다.

[0311]

면역조직화학

[0312]

C35는 0.42 µg/ml의 친화력 정제 토키 폴리클론 항체 78.2로 검출되었다. 항원 복구는 구연산나트륨 완충액(18 µM 구연산, 82 µM 구연산나트륨, pH 6.0)을 이용하여 수행되었다. 사이토케라틴 5/6(CK5/6)은 1:50 희석의 토키 폴리클론 항체(Dako, Carpinteria, CA)로 검출되었다. 항원 복구는 Tris/EDTA 완충액(1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl Base, pH 8.0)을 이용하여 수행되었다.

[0313]

EGFR은 37°C에서 10분간 항원 복구(0.1% 트립신, 0.1% 염화칼슘)로 마우스 항체(31G7 클론, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 검출되었다. C35 및 EGFR에 대한 표준 면역조직화학 프로토콜은 제조사 지침에 따라 REAL EnVision 마우스/토키 키트(Dako)를 이용하여 수행되었다.

[0314]

HER2 면역조직화학은 96°C에서 40분간 항원 복구로 제조사의 지침에 따라 HercepTest(Dako)를 이용하여 수행되었다. 염색은 Autostainer(Dako) 상에서 수행되었다.

[0315]

Fisher 정확 양측 검정에 의한 통계 분석은 C35^{hi} 그룹 내 EGFR 발현은 HER2^{hi} 서브세트와 HER^{-/low} 서브세트 사이에 유의적으로 상이하다: p=0.0048.

[0316]

30개 C35 양성 종양은 Her2/neu 및 EGFR의 발현에 대해 득점 기록되었다. 30개 종양 중 7개는 C35+/Her2+/EGFR-이고, 17/30은 C35+/Her2-/EGFR+이고, 3/30은 C35+/Her2+/EGFR+이고, 3/30은 C35+/Her2-/EGFR-이었다. 90%의 C35 양성 종양은 HER2 또는 EGFR 양성이었다.

표 3. HER2hi 및 HER2-/low 종양 조직 표본 내 EGFR 발현

	EGFR-	EGFR+
HER2-/low	3	17
HER2hi	7	3

[0317]

상기 표 3에 나타난 결과는 C35 형질전환 활성이 두 번째 형질전환 유전자와 결합되는 경우 가장 큼을 나타낸다.

[0319]

실시예 2

[0320]

암 치료를 위한 C35 및 HER2 항체의 병용

[0321]

도 1 및 2에 나타나고 본 실시예에 기재된 바와 같이 항-C35 항체와 항-HER2 항체의 투여에 관한 암 치료 방법이 시험되었다. 본 실시예는 천연 Her2+/C35+ 인간 유방암 이종이식 모델 BT474-MD 내 트라스투추맵 병용된 항-C35 마우스 단일클론 항체, 1F2 및 1B3의 효과를 나타낸다.

[0322]

1F2 및 1B3 항체의 생성

[0323]

72시간 원액 배양을 이용하여 총 3.5L의 CD 하이브리도마가 2.0 x 105 세포수/ml에서 분주되었다. 배양액은 700 ml/플라스크에서 3 L 진탕 플라스크 중에서 분할되었다. 플라스크는 어떠한 공급 배지 추가 없이 7일간 90~120 rpm으로 진탕되면서 37°C의 7% CO2 인큐베이터 내에 위치하였다. 7일째에 표본은 수화 전 세포 계측을 위해 각각의 플라스크로부터 채취되었다. 계측은 트립판 블루 배제에 의해 이루어졌다. 3.5 L의 세포 배양액 모두는 3200 rpm(2100 x g)에서 원심분리에 의해 정화되었다. 정화된 조절 배지는 0.22 μ m 필터 유니트를 이용하여 여과 멸균되었다. 정제 동안 정화되고/여과된 상청액은 4°C에서 밤새 보관되었다.

[0324]

항체 1B3의 경우 상청액은 약 10~12 ml/채취/제작소로 매주 채취되었다. 항체 로트는 첫 번째 6개 연속 채취물로 구성되었다.

[0325]

항체 정제

[0326]

상청액 내 항체는 Gammabind G(GE Healthcare) 컬럼에 결합되었다. 결합된 항체는 내독소를 감소시키기 위해 1 M NaCl을 함유한 PBS pH 7.2로 세척되었다. 세척된 항체는 1 M Tris, pH 8.0의 1:5 부피를 함유한 분획으로 0.1 글리신, pH 2.7로 용출되었다. 용출된 항체를 함유한 분획은 G25 PD10 컬럼(GE Healthcare)을 이용하여 완충액 교환되었다. 완충액 교환 항체는 수집되고 Centricon Plus-70 초미세여과(Millipore, 30 kDa MWCO)를 이용하여 7.5 mg/mL로 농축되었다. 농축 항체는 음이온 교환 Mustang Q(Pa11) 멤브레인을 통과하였다. 항체 함유 유량이 수집되었다. 이러한 최종 제형화 항체는 0.2 μ m 주사기 필터(Pa11)를 이용하여 생물안전 후드 내에서 멸균 여과되었다. 단백질 농도는 Nanodrop 분광광도계를 이용하여 A280에 의해 측정되었다.

[0327]

세포 배양

[0328]

천연 C35+/HER2+ 인간 유방 종양 BT474-MD 세포주는 Jose Baselga의 허가로 전달된 MD Anderson의 Ronald Bast의 기증이었다. 세포주의 발생력: BT474는 Jose Baselga 실험실 내 ATCC에서 획득되었고, 이는 마우스에서 계대 접종되고 생체 내에서 종양을 일관되게 형성 가능한 세포주를 생성하기 위해 생체 외에서 배양되었다. 세포주는 희석을 제한함으로서 서브클론되었고 적합한 성장 동력학을 지니고 생체 내에서 속도를 측정하는 클론이 확인되었다. 세포주는 BT474-MD로 지정되었고, Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen) 내에서 배양되고 10% 우태아 혈청을 함유하도록 조정되었다. 이식을 위해 제조시 세포는 트립신-EDTA로 탈착되고 PBS로 세척되고 10⁸/ml 부피로 재현탁되었다.

[0329]

동물

[0330]

4주령 Swiss 누드 마우스는 Taconic Farms에서 구입하였다. 동물은 특정 병원균-부재, 올타리 시설 조건 하에서 수용되었다. 모든 실험은 대학 위원회 동물 자원-승인 프로토콜 하에서 수행되었다.

[0331]

아폽토시스-유도 약물

[0332]

항-HER2 항체인 트라스투추맵(Herceptin, Genentech)은 공급된 운반체 내에 21 mg/ml로 희석되었다. 최종 용량의 트라스투추맵은 10 또는 100 μ g/용량(~0.5 또는 5 mg/kg)이었고, 이식 12일 후 시작하여 3주의 지속 기간 동안 주 2회 정맥내 주사로 투여되었다.

[0333]

이식 및 치료

[0334]

천만개의 C35-양성 BT474-MD 종양 세포가 4주령 Swiss 누드 마우스의 유방 지방 패드에 피하로 이식되었다. 90-일 방출 에스트로겐 펠렛은 이식 24시간 전 각 동물에 이식되었다. 6 내지 9마리 마우스 그룹 각각은 하기 치료 중 하나를 수용하였다:

[0335]

1. 치료 없음(대조군)

[0336]

2. 12일에 시작되고 3주간 주 2회 지속된 10 μ g/용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사

[0337]

3. 12일에 시작되고 3주간 주 2회 지속된 10 μ g/용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사 및 800 μ g(40 mg/kg) 1F2 마우스 단일클론 항체 i.v. 주사

[0338]

4. 12일에 시작되고 3주간 주 2회 지속된 10 μ g/용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사 및 800 μ g(40 mg/kg) 1B3 마우스 단일클론 항체 i.v. 주사

[0339]

평균 마우스 종양 부피는 이식 후 다양한 시점에 측정되었다(도 1). 2개의 측정치는 각 종양 상에 버니어 캘리퍼스(vernier calipers)로 수득되었고; 종양 부피는 공식 ($\text{길이} \times \text{폭}^2/2$)을 이용하여 계산되었다. 종양 부피의 퍼센트 변화는 (종양 부피 일자 X/종양 부피 일자 11) x 100으로 각 종양에 대해 계산되었다. 도 1에 나타난 바와 같이 1F2 또는 1B3 항-C35 항체 없이 표시된 용량으로 그 자체만(IgG와)으로 투여된 트라스투추맵은 항-C35 항체와 함께 투여된 트라스투추맵만큼 마우스 종양 성장을 저해하는데 효과적이지 않았다. 트라스투추맵과 병용된 2개의 시험된 마우스 항-C35 항체 1F2 및 1B3의 각각은 생체 내에서 약 5-배로 C35-양성 종양의 성장을 저해하였다. 더욱이 이를 병용-치료 마우스는 종양 복귀의 지연을 입증하였다(도 2). 따라서 항-C35 항체와 항-HER2 항체의 병용은 종양 성장 감소에 유의적인 효과를 지녔다.

[0340]

실시예 3

[0341]

항-HER2 항체 치료 후 C35 전위의 도입 및 득점

[0342]

도 3에 나타나고 본 실시예에 기재된 바와 같이 항-HER2 항체인 트라스투추맵은 C35 단백질을 외부 세포막으로 전위시키는 것으로 나타났고, 이는 항체 염색에 의해 검출될 수 있다. BT474 세포는 완전 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10% 우테아 혈청) 내에 2.5×10^5 세포수/플라스크로 분주되었다. 트라스투추맵은 4 ug/ml(37.5 μ M)의 최종 농도로 완전 배지에 첨가되었다. 세포는 37°C에서 5일간 인큐베이트된 후 트립신-

EDTA로 부유 세포를 포함하여 채취되었다.

[0343] 항체 염색:

[0344] 100만개 세포는 PAB(인산염 완충 식염수, 0.01% 아지드, 1% BSA)로 세척되고 0.5 μ g 토끼 항-C35 폴리클론 항체 78-2 또는 토끼 IgG 대조군으로 30분간 인큐베이트된 후 당나귀 항-토끼 항체에 의해 Cy5에 컨쥬게이트되었다. 세포는 1X Annexin 결합 완충액 내에서 세척되고 4 μ l Annexin-PE(BD Pharmingen, 아폽토시스 세포 상에 포스파티딜세린에 결합) 및 0.1 μ M Sytox Green(DNA 염료, 생존 세포에 의해 배제됨)과 함께 실온에서 15분간 인큐베이트되었다.

[0345] FACS 분석:

[0346] 세포군은 조직파편을 제외시키기 위해 FSC/SSC 상에 폐쇄되었다. 이후 표본은 Annexin V/Sytox green 염색에 의해 2D로 표시되었고 하기 군으로 분류되었다:

[0347] a. 생존: Annexin V-/ Sytox Green DNA 염료⁻

[0348] b. 초기 아폽토시스: Annexin V⁺/ Sytox Green DNA 염료⁻

[0349] c. 후기 아폽토시스: Annexin V⁺/ Sytox Green DNA 염료^{low}

[0350] d. 사멸: Annexin V⁺/ Sytox Green DNA 염료^{hi}

[0351] 하기 표 4는 아폽토시스를 진행하고/또는 사멸된 트라스투추맵-처리 BT474 세포의 비율이 비처리 세포 보다 더 큼을 나타낸다.

표 4. 아폽토시스를 진행하는 트라스투추맵-처리 BT474 세포의 비율

	비처리	트라스투추맵
생존	96.80%	91.45%
초기 아폽토시스	0.24	0.65
후기 아폽토시스	0.91	2.91
사멸	1.73	4.28

[0353] 도 3에 나타난 바와 같이 생존 BT474 세포군은 항-C35 항체 염색에 대해 음성적인 반면(폐널 A) 후기 아폽토시스 세포는 항-C35 항체 염색에 대해 양성적이었다(폐널 B). 상기 논의된 바와 같이 내부 세포막과 정상적으로 결합되는 C35 항원은 방사선 및/또는 화학치료법에 의해 아폽토시스를 진행하도록 유도된 종양 세포의 표면 세포막 상에 노출되게 된다. 미국 출원 공개 번호 2005/0158323 A1, 도 1-3 참조. 표 4에 나타난 바와 같이 트라스투추맵 처리는 후기 아폽토시스 세포군을 증가시켰고, 후기 아폽토시스 세포는 C35에 대해 양성적으로 염색되었다. 따라서 트라스투추맵은 아폽토시스를 유도하고 C35 단백질을 세포막의 외부 표면으로 전위시킬 수 있다. 따라서 항-HER2 항체와 C35 항체의 병용 치료의 하나의 이점은 항-HER2 항체도 아폽토시스를 유도하고 C35를 외부 종양 세포막으로 전위시킨다는 점이다.

[0354] 실시예 4

[0355]

상대적으로 큰 종양을 치료하기 위한 HER2 항체와 병용된 C35 항체

[0356]

도 4 및 5에 나타나고 본 실시예에 기재된 바와 같이 BT474-MD-이식 마우스로의 항-HER2 항체와 병용된 항-C35 항체의 투여는 상대적으로 큰 종양의 성장을 저지하거나 저해한다. 약 50 mm^3 의 종양 크기에서 치료가 시작되는 경우 종양 성장을 저지하거나 감소시키기 위한 1F2 항-C35 항체 단독 및 트라스투추맵의 병용 사용은 도 4에 나타나 있다. 도 5는 치료 시작 시점에 종양 크기가 약 100 mm^3 으로 더 큰 경우에도 항-C35 마우스 단일클론 항체 1F2는 트라스투추맵과 함께 종양 성장을 저해함을 나타낸다.

[0357]

트라스투추맵 단독, 1F2 단독 또는 1F2와 병용된 트라스투추맵으로 처리된 마우스의 평균 종양 부피가 시험되었다. 평균 종양 부피의 측정 방법은 본 실시예에서 평균 종양 크기가 각각 약 50 mm^3 또는 100 mm^3 인 경우 15일에 치료가 시작되었다는 점을 제외하고는 실시예 2에 기재된 방법과 유사하였다.

[0358]

15일에 시작한 치료의 경우 9 내지 12마리의 마우스 그룹 각각은 하기 치료 중 하나를 수용하였다:

[0359]

1. 치료 없음(식염수 대조군)

[0360]

2. 15일에 시작되고 약 2주간 주 2회 지속된 10 μg /용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사

[0361]

3. 15일에 시작되고 2주간 주 2회 지속된 10 μg /용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사 및 800 μg (40 mg/kg) 1F2 마우스 단일클론 항체 i.v. 주사

[0362]

4. IgG 단독 대조군

[0363]

5. 15일에 시작되고 2주간 주 2회 지속된 800 μg (40 mg/kg) 1F2 마우스 단일클론 항체 i.v. 주사

[0364]

22일에 시작된 치료의 경우 7 내지 12마리 마우스 그룹 각각은 하기 치료를 수용하였다:

[0365]

1. 치료 없음(식염수 대조군)

[0366]

2. 22일에 시작되고 약 2주간 주 2회 지속된 10 μg /용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사

[0367]

3. 22일에 시작되고 2주간 주 2회 지속된 10 μg /용량(약 0.5 mg/kg) 트라스투추맵 i.v. 주사 및 800 μg (40 mg/kg) 1F2 마우스 단일클론 항체 i.v. 주사

[0368]

평균 마우스 종양 부피는 이식 후 다양한 시점에 측정되었다(도 4). 15일의 치료 시작시 종양 부피는 약 50 mm^3 이었다. 평균 종양 부피는 이식후 45일 이상 이후에 측정되었다. 도 4에 나타난 바와 같이 트라스투추맵과 1F2 항-C35 항체의 병용은 트라스투추맵, 1F2 항-C35 항체 단독, IgG 단독 및 비처리와 비교시 종양 부피의 성장을 감소시켰다.

[0369]

종양 성장을 감소시키기 위한 트라스투추맵과 병용된 1F2 항-C35 항체의 사용은 치료 시작시 종양 부피가 약 100 mm^3 인 경우 종양 성장을 저지하거나 감소시키는데도 효과적이었다. 평균 마우스 종양 부피는 이식후 다양한 시점에 측정되었다(도 5). 트라스투추맵과 1F2 항-C35 항체의 병용은 트라스투추맵 단독 또는 비처리와 비교시 종양 부피를 저지하거나 감소시켰다.

[0370]

하기 표 5는 항-C35 항체와 항-HER2 항체의 병용은 항-HER2 항체 단독과 비교시 종양 성장 방지에 더욱 효과적임을 나타낸다. 표 5에 나타난 바와 같이 정지 종양 즉 성장하지 못하거나 치료 시작부터 조사 종료까지 비교적 일정하게 유지되는 종양을 지닌 마우스의 비율은 항-C35 1F2 또는 트라스투추맵 단독과 비교시 1F2 항-C35 항체와 트라스투추맵 병용 치료시 증가되었다. 증가는 15일에 시작된 치료(종양 부피 약 50 mm^3) 또는 22일에 시작된 치료(종양 부피 약 100 mm^3)인 경우에도 나타났다.

표 5: 치료 후 종양 크기 비교

	정지 종양	총 마우스	%
15일 치료			
트라스투추맵 + 마우스 IgG	2	9	22%
트라스투추맵 + 1F2	8	9	89%
마우스 IgG	0	9	0%
1F2	1	9	11%
22일 치료			
트라스투추맵 + 마우스 IgG	2	7	29%
트라스투추맵 + 1F2	9	11	82%

[0371]

따라서 본 실시예는 15일에 시작된 치료(종양 부피 약 50 mm^3) 또는 22일에 시작된 치료(종양 부피 약 100 mm^3)에 관계없이 항-C35 항체와 항-HER2 항체의 병용이 항-HER2 항체 단독 또는 항-C35 항체 단독과 비교시 평균 종양 성장 저해에 더욱 효과적임을 나타낸다. 따라서 본 실시예 및 상기 실시예는 항-C35 항체와 항-HER2 병용 치료는 단독 치료보다 비교적 작고 큰 종양의 송양 성장의 저해 또는 저지에 더욱 효과적임을 나타낸다.

[0373]

본원에 인용된 모든 문헌(특허, 특허 출원, 논문, 실험 매뉴얼, 서적 또는 다른 문헌 포함)의 전체 개시물은 참고문헌에 포함된다.

수탁번호

[0374]

기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-5637

수탁일자 : 20031111

기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-5638

수탁일자 : 20031111

기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-5639

수탁일자 : 20031111

기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-5640

수탁일자 : 20031111

기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

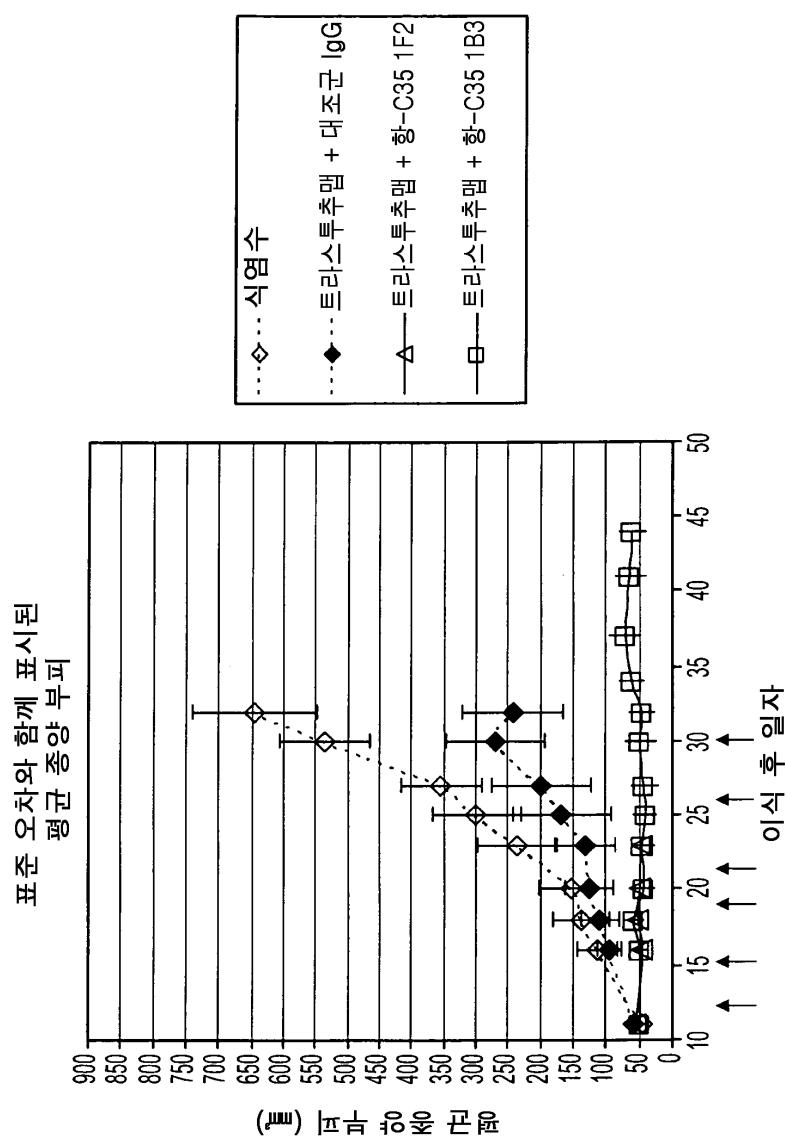
수탁번호 : PTA-5641

수탁일자 : 20031111

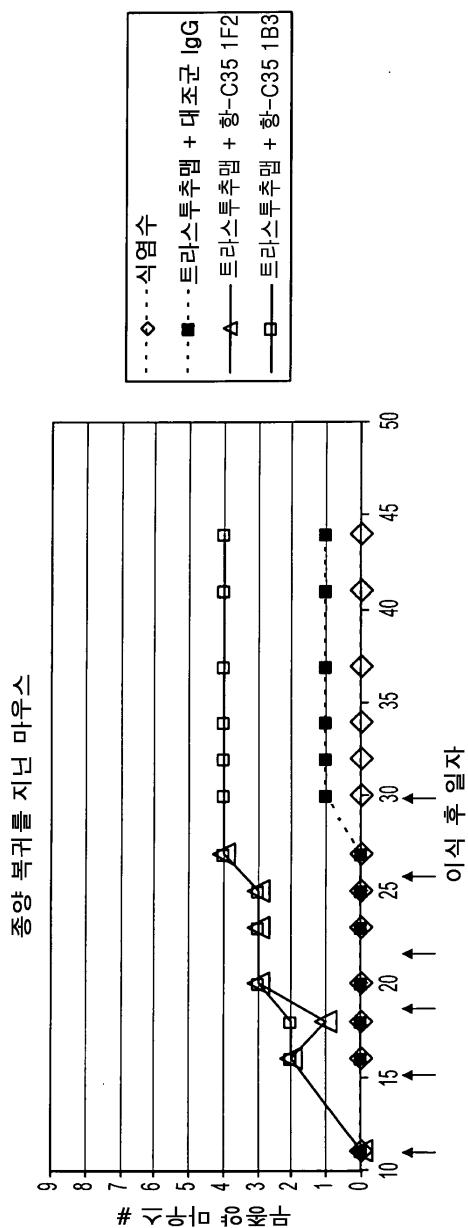
기탁기관명 : American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-5642

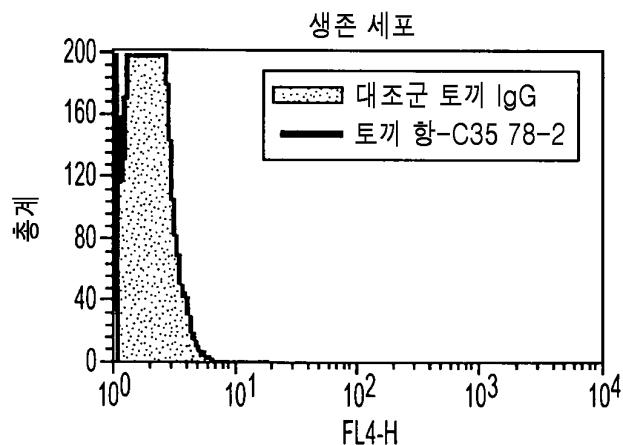
수탁일자 : 20031111

도면**도면1**

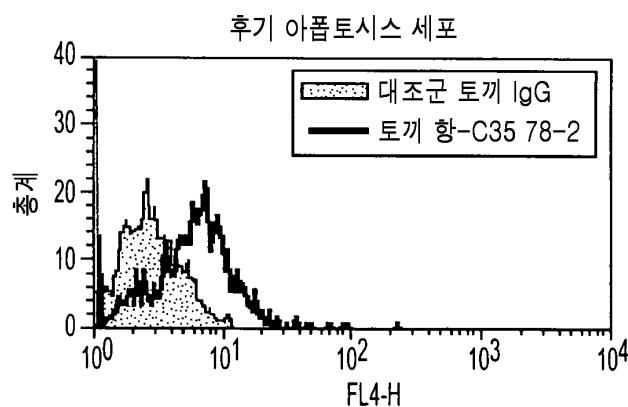
도면2



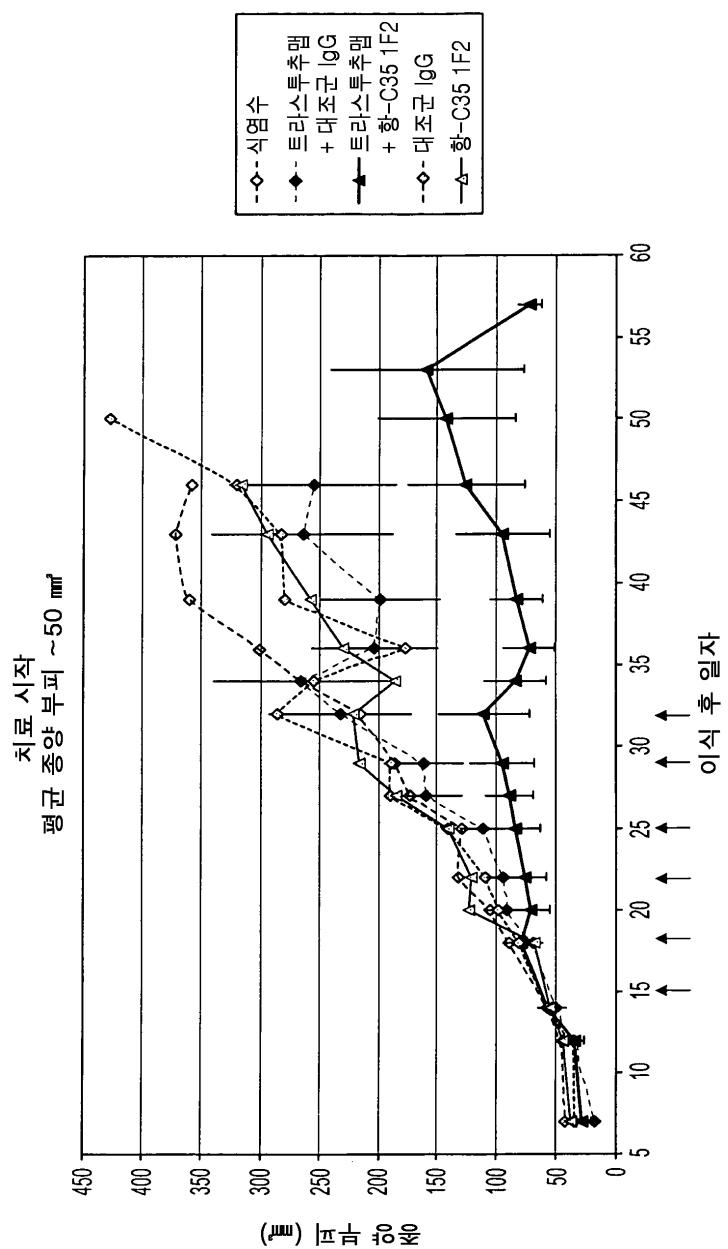
도면3a



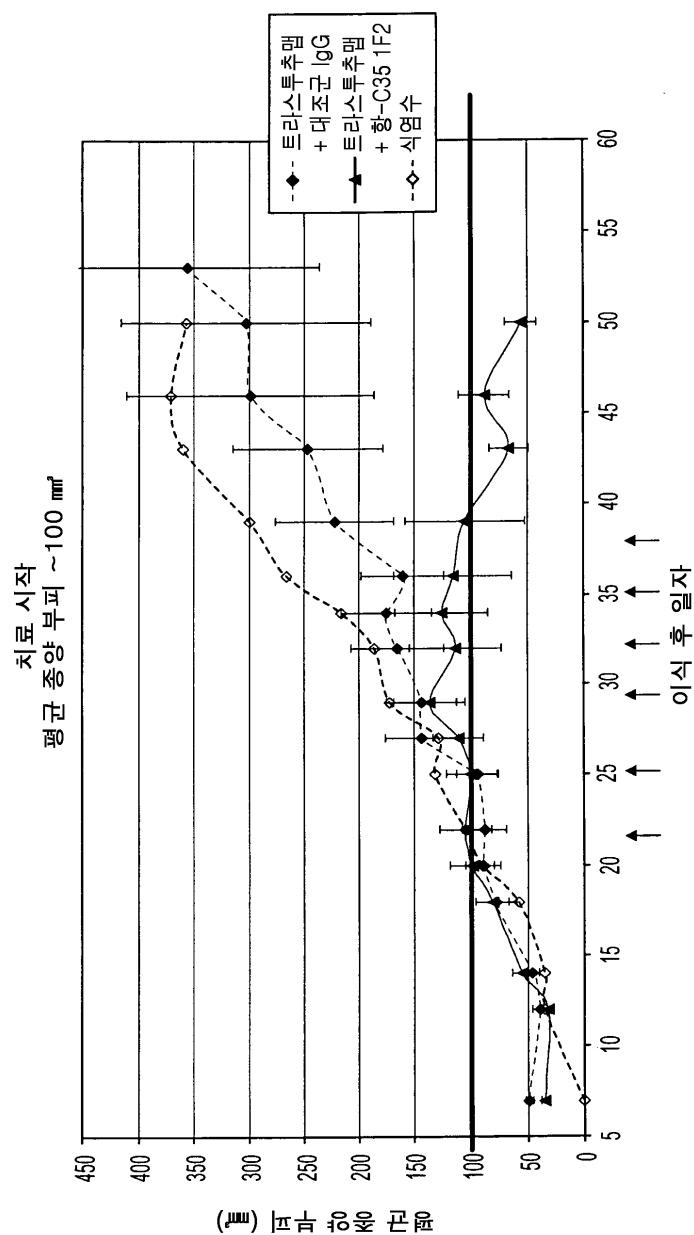
도면3b



도면4



도면5



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Vaccinex, Inc.

<120> Anti-C35 Antibody Combination Therapies and Methods

<130> 1843.054PC01

<150> US 61/016,763

<151> 2007-12-26

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (7)..(354)
 <400> 1

gccgcg	atg	agc	ggg	gag	ccg	ggg	cag	acg	tcc	gta	gcg	ccc	cct	ccc	48
Met Ser Gly Glu Pro Gly Gln Thr Ser Val Ala Pro Pro Pro															
1	5	10													
gag gag gtc gag ccg ggc agt ggg gtc cgc atc gtg gtg gag tac tgt 96															
Glu Glu Val Glu Pro Gly Ser Gly Val Arg Ile Val Val Glu Tyr Cys															
15	20	25	30												
gaa ccc tgc ggc ttc gag gcg acc tac ctg gag ctg gcc agt gct gtg 144															
Glu Pro Cys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Leu Glu Leu Ala Ser Ala Val															
35	40	45													
aag gag cag tat ccg ggc atc gag atc gag tcg cgc ctc ggg ggc aca 192															
Lys Glu Gln Tyr Pro Gly Ile Glu Ile Glu Ser Arg Leu Gly Thr															
50	55	60													
ggt gcc ttt gag ata gag ata aat gga cag ctg gtg ttc tcc aag ctg 240															
Gly Ala Phe Glu Ile Glu Ile Asn Gly Gln Leu Val Phe Ser Lys Leu															
65	70	75													
gag aat ggg ggc ttt ccc tat gag aaa gat ctc att gag gcc atc cga 288															
Glu Asn Gly Gly Phe Pro Tyr Glu Lys Asp Leu Ile Glu Ala Ile Arg															
80	85	90													
aga gcc agt aat gga gaa acc cta gaa aag atc acc aac agc cgt cct 336															
Arg Ala Ser Asn Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Ser Arg Pro															
95	100	105	110												
ccc tgc gtc atc ctg tga 354															
Pro Cys Val Ile Leu															
115															

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gly Glu Pro Gly Gln Thr Ser Val Ala Pro Pro Pro Glu Glu

1 5 10 15

Val Glu Pro Gly Ser Gly Val Arg Ile Val Val Glu Tyr Cys Glu Pro

20 25 30

Cys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Leu Glu Leu Ala Ser Ala Val Lys Glu

35 40 45

Gln Tyr Pro Gly Ile Glu Ile Glu Ser Arg Leu Gly Gly Thr Gly Ala

50 55 60

Phe Glu Ile Glu Ile Asn Gly Gln Leu Val Phe Ser Lys Leu Glu Asn

65 70 75 80

Gly Gly Phe Pro Tyr Glu Lys Asp Leu Ile Glu Ala Ile Arg Arg Ala

85 90 95

Ser Asn Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Ser Arg Pro Pro Cys

100 105 110

Val Ile Leu

115

<210> 3

<211> 627

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 3

gaatttagcg	gccgcgaatt	cgccttcga	ctggagcacg	ggacactgac	atggactgaa	60
ggagtagaaa	acatctct	cattagaggt	tgatcttga	ggaaaacagg	gtgttgctta	120
aaggatgaaa	gtgttagtc	tgttgacact	gttgacagcc	attcctggta	tcctgtctga	180
tgtacagctt	caggagttag	gacctggcct	cgtgaaacct	tctcagtc	tgtctctcac	240
ctgcctgtc	actggctact	ccatcaccag	tggattttc	tggaaactgga	tccggcagtt	300
tccagggAAC	aaactggaat	ggatggctaa	cataagctac	gacggtagca	ataactccaa	360

cccatctctc aaaaatcgaa ttccttcac tcgtgacaca tctaagaacc agttttcct 420

gaagtttaat tctgtgacta ctgacgactc agctgcatat tactgtacaa gaggaactac 480

ggggtttgc tactggggcc aaggactct ggtcactgtc tctgcagcca aaacgacacc 540

cccatctgtc tatecactgg cccctggatc tgctgccccaa actaactcca agggcgaatt 600

cgttaaacc tgccaggacta gtccctt 627

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu Lys Phe Asn Ser Val Thr Thr Asp Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 5

<211> 540

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 5

cgcgaattcg cccttcgact ggagcacgag gacactgaca tggactgaag gagtagaaaa 60

attagctagg gaccaaaatt caaagacaga atggatttc aggtgcagat tttcagttc 120
 ctgctaatca gtgcctcagt cagaatgtcc agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca 180

gcaatcatgt ctgcacatcc aggggagaag gtcaccatat cctgcagtgc cagctcaagt 240
 gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag ccaggatcct cccccaacc ctggatttat 300
 cacacatcca acctggcttc tggagtcct gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc 360
 tcttactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcca 420
 cagtatcata gttacccacc cacgttcgga gggggacca agctgaaat aaaacggct 480
 gatgctgcac caactgtatc catttccca ccatccagt agcaaaggc gaattcgtt 540

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 6

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

His Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 618

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 7

cgcaattcg ccctcgact ggagcacgag gacactggac atggactgaa ggagtggaaa 60
 atctctctca ctggaggctg attttgaag aaaggggtg tagcctaaaa gatgatggtg 120

ttaagtcttc tgtacctgtt gacagccctt ccgggtatcc tgcagaggt gcagcttcag 180
 gagtcaggac ctgcctcgtaaaacccctt cagactctgt ccctcacctg ttctgtcact 240
 ggcactcca tcaccagtgg ttactggaac tggatccgaa aattccagg aaataaactt 300
 gaatacgtgg ggtacataag ctacagtggt ggcacttact acaatccatc tctcaaaagt 360
 cgaatctcca tcactcgaga cacatccaag aaccactact acctgcagtt gaattctgt 420
 actactgagg acacagccac atattactgt gcaagaggtg cttactacgg gggggcctt 480
 tttccttact tcgatgtctg gggcgctggg accacggtca ccgtctcctc agccaaaacg 540

acaccccat ctgtctatcc actggccctt ggatctgctg cccaaactaa ctccaaggc 600
 gaattcgaaaacctgc 618

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Val

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Tyr Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Tyr Tyr Gly Gly Ala Phe Phe Pro Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115	120	
<210> 9		
<211> 528		
<212> DNA		
<213> Mus sp.		
<400> 9		
gaattcgccc ttccctgga gcacgaggac actgacatgg actgaaggag tagaaaatca	60	
gttctctgcca ggacacagtt tagatatgg gttccagggtt caggttctgg ggctccttct	120	
gctctggata tcaggtgccc actgtgatgt ccagataacc cagtctccat ctttttttgc	180	
tgcatctcct ggagaaacca ttactattaa ttgcagggca agtaagtaca ttagcaaaca	240	

tttagtctgg ttcaggaga aacctggaga aactaaaaag ctttttatct actctggatc	300	
cactttgcaa tctggacttc catcaagggtt cagttggcagt ggatctggta cagatttac	360	
tctcaccatc agtagcctgg agcctgaaga ttttcaatg tattactgtc aacagcataa	420	
tgaataccgg ctcacgttgc gtgctggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgtgc	480	
accaactgtt tccatcttcc caccatccag tgagcaaagg gcgaattc	528	
<210> 10		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 10		

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Tyr Ile Ser Lys His

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Glu Thr Lys Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105