(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월01일
(11) 등록번호 10-1088661
(24) 등록일자 2011년11월25일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7006262
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년10월09일
심사청구일자 2008년10월09일
(85) 번역문제출일자 2005년04월11일
(65) 공개번호 10-2005-0062612
(43) 공개일자 2005년06월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/011164
(87) 국제공개번호 WO 2004/032960
국제공개일자 2004년04월22일
(30) 우선권주장
02022389.7 2002년10월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
02022390.5 2002년10월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
US05558864 A1*
US06129915 A1*
WO1994000136 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메르크 파텐트 게엠베하
독일 64293 다름스타트 프랑크푸르터 스트라세 250
(72) 발명자
크레쉬 한스-게오르크
독일 55130 마인츠 부르군더벡 16
슈미트 위르겐
독일 64331 바이테르슈타트 루드비히슈트라쎄 17
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 박정민

(54) ＥＲＢ－Ｂ１ 수용체를 표적으로 하는 약학적 조성물

(57) 요 약

본 발명은, 각각, 동일한 ErbB1 수용체 도메인의 상이한 에피토프들에 동시에 결합하는 에피토프들을 포함하는 상이한 생물학적 분자, 바람직하게는 단일클론 항체들을 함유하는 약학적 조성물 관한 것이다. 본 발명에 따른 바람직한 항체는, 각각 마우스 버전, 키메라화 버전 및 인간화 버전으로의 MAb 425 및 MAb 225 이다. 본 발명은 상기 조성물의, 바람직하게는 종양의 치료 개선을 위한 용도 및 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

동일한 EGF 수용체 (EGFR) 분자에 위치하는 상이한 에피토프에 결합하는 능력을 갖는, 제 1 및 제 2 항체 분자를 포함하는 종양 질환 치료를 위한 약학적 조성물로서,

상기 제 1 항체 분자가 상기 EGFR 분자 상의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하고, 상기 제 2 항체 분자가 상기 EGFR 분자 상의 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하고,

상기 제 1 항체 분자는 마우스, 키메라화 또는 인간화된 MAb 225 또는 이의 Fab', F(ab')2 또는 Fv 절편이고,

상기 제 2 항체 분자는 마우스, 키메라화 또는 인간화된 MAb 425 또는 이의 Fab', F(ab')2 또는 Fv 절편인, 종양 질환 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 세포독성제를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 세포독성제가 화학요법제인 약학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

하기를 포함하는 종양 질환 치료를 위한 약학적 키트:

(i) EGF 수용체 (EGFR) 분자 상에 존재하는 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하는, 마우스, 키메라화 또는 인간화된 MAb 225 또는 이의 Fab', F(ab')2 또는 Fv 절편인 제 1 항체 분자를 포함하는 제 1 포장품, 및

(ii) EGF 수용체 (EGFR) 분자 상에 존재하는 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하는, 마우스, 키메라화 또는 인간화된 MAb 425 또는 이의 Fab', F(ab')2 또는 Fv 절편인 제 2 항체 분자를 포함하는 제 2 포장품.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 세포독성제를 포함하는 제 3 포장품을 추가로 포함하는 약학적 키트.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 세포독성제가 화학요법제인 약학적 키트.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 각각, 동일한 ErbB 수용체 도메인, 특히 ErbB1 수용체 도메인의 상이한 에피토프들에 동시에 결합하는 에피토프들을 포함하는 상이한 생물학적 분자, 바람직하게는 단일클론 항체들을 함유하는 약학적 조성물 관한 것이다. 본 발명에 따른 바람직한 항체는, 각각 마우스 버전, 키메라화 버전 및 인간화 버전으로의 MAb 425 및 MAb 225 이다. 본 발명은 상기 조성물의, 바람직하게는 종양의 치료 개선을 위한 용도 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종양 세포 표면의 다양한 수용체 및 기타 항원에 대해 생성된 작은 화학적 화합물 뿐만 아니라 생물학적 분자, 예컨대 단일클론 항체 (MAb) 또는 기타 단백질/폴리펩티드는 20 년 이상 종양 치료를 위하여 적합한 것으로 공지되어 왔다. 항체 접근법에 있어서는, 대부분의 상기 MAb 가 인간 면역계에 대한 관용성을 향상시키기 위해 키메라화 또는 인간화된다. Mab 또는 상술된 화학적 단위체는 종양 세포 및 대부분의 경우 또한 정상 조직 상의 이들의 표적 구조에 특이적으로 결합하며, 이들의 에피토프 특이성 및/또는 특정 항원의 기능적 특징에 따라 상이한 효과를 유도할 수 있다. 고아 수용체 (orphan receptor: 기능이 규명되지 않은 수용체) 또는 다른 비기능적 세포 표면 분자에 대한 MAb 뿐만 아니라 기능적으로 활성인 수용체 (예컨대 키나아제 활성을 갖는 성장 인자 수용체) 의 리간드 결합 부위 밖의 구조에 대한 MAb 는 표적 세포에 대해 일차적으로 면역 효과기 (effector) 기능을 유도할 것으로 추정된다 (항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC), 보체-의존적 세포독성 (CDC)). 부가적으로, 항원 및 MAb 의 특성에 따라, 항체의 결합으로 수용체의 가교가 일어날 수 있다. 그 이후의 수용체-항체 복합체의 내입(internalization)은 세포 표면 상에서 수용체 밀도의 지속적인 하향 조절을 일으킬 수 있다.

[0003] 리간드 결합 부위 내 또는 그 직접적 근방에서 에피토프에 결합하는 MAb 또는 소형 화학적 화합물은 이들 수용체에 대한 천연 리간드의 결합과 경쟁하여, 리간드 결합을 감소시키거나 완전히 억제하며, 이들의 수용체로부터 이미 결합한 리간드를 대체할 수 있다. 이러한 수용체 차단은 리간드-의존적 수용체 활성화 및 하류 신호전달을 저해한다. 예를 들어, 단일클론 항체에 의한 ErbB 수용체, 예컨대 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 의 차단은 DNA 합성 및 증식의 저해, 세포 주기 정지 및 세포사멸의 유도 뿐만 아니라 항전이(antimetastic) 및 항혈관형성 효과를 포함하는 다양한 세포성 효과를 일으킨다.

[0004] ErbB 수용체는 1980 년대에 암과 연관된 것으로 밝혀진 전형적 수용체 티로신 키나아제이다. 티로신 키나아제는 단백질 기질 내 티로신 잔기에 아데노신 트리포스페이트의 말단 포스페이트 전달을 촉매하는 효소 집단이다. 티로신 키나아제는 기질 인산화를 통해, 여러 세포 기능에 대한 신호 전달에 결정적 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 신호 전달의 정확한 기전은 여전히 밝혀져 있지 않지만, 티로신 키나아제는 세포 증식, 암 형성 및 세포 분화에서 중요한 기여 인자인 것으로 나타나 있다. 티로신 키나아제는 수용체 유형 또는 비수용체 유형으로 분류될 수 있다. 수용체-유형 및 비-수용체 유형 티로신 키나아제 모두 암, 건선 및 과면역 반응을 포함하는 수많은 병원성 상태를 야기하는 세포성 신호전달 경로에 관여한다. 여러 티로신 키나아제는 세포 성장 뿐만 아니라 혈관형성에 관여한다. 티로신 키나아제의 비-수용체 유형은 또한 Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, 및 LIMK 를 포함하는 여러 서브패밀리를 포함한다. 상기 각각의 서브패밀리는 다시 다양한 수용체로 하위분류된다. 예를 들어, Src 서브패밀리가 가장 큰 것으로서, Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr, 및 Yrk 를 포함한다. 효소의 Src 서브패밀리는 종양형성에 연관되어 있다. 티로신 키나아제의 비수용체 유형에 대한 보다 상세한 논의는 [Bolen, Oncogene, 8: 2025-2031 (1993)] 를 참고한다.

[0005] 수용체 유형 티로신 키나아제는 세포외, 막통과 및 세포내 부위를 갖는 반면, 비-수용체 유형 티로신 키나아제

는 전체적으로 세포내에 존재한다. 수용체-연결 티로신 키나아제는 세포외 리간드 결합 도메인, 막통과 서열 및 세포질 티로신 키나아제 도메인을 포함하는 막통과 단백질이다. 수용체-유형 티로신 키나아제에는 다양한 생물학적 활성을 갖는 다수의 막통과 수용체가 포함된다.

[0006] 수용체-유형 티로신 키나아제의 상이한 서브패밀리가 동정되어 있다. 관련되는 티로신 키나아제에는 ErbB 메이저 집단 패밀리의 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 수용체, 표피 성장 인자 (EGF) 수용체, 및 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 수용체가 포함된다. 또한 신경 성장 인자 (NGF) 수용체, 뇌 유래 향신경 인자 (BDNF) 수용체, 및 뉴로트로핀-3 (NT-3) 수용체, 및 뉴로트로핀-4 (NT-4) 수용체가 관련되어 있다.

[0007] HER 또는 ErbB 서브패밀리로 나타내는 하나의 수용체 유형 티로신 키나아제 서브패밀리에는 EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2 또는 p185neu), HER3 (ErbB3), 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2) 가 포함된다. 상기 수용체 서브패밀리의 리간드에는 상피 성장 인자 (EGF), TGF-α, 암피레굴린, HB-EGF, 베타셀룰린, 헤레굴린 및 뉴레굴린이 포함된다. PDGF 서브패밀리에는 키나아제 삽입 도메인 수용체 (KDR) 를 포함하는 FLK 패밀리가 포함된다.

[0008] erbB1 유전자가 코딩하는 EGFR 은 인간 악성암과 연관된 것으로 나타나 있다. 특히, EGFR 의 발현 증가는 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암 및 위암 뿐만 아니라 교모세포종에서 관찰된다. EGFR 수용체 발현의 증가는 종종 자가분비 자극 경로에 의해 수용체 활성화를 일으키는 동일한 종양 세포에 의한, EGFR 리간드인 전환 성장 인자 알파 (TGF-α) 의 생성 증가와 연관된다 (Baselga and Mendelsohn, Pharmac. Ther. 64: 127-154 (1994)).

[0009] EGF 수용체는 분자량 170.000 의 막통과 당단백질로, 여러 상피 세포 유형에서 발견된다. 이는 3 종 이상의 리간드 EGF, TGF-α (전환 성장 인자 알파) 및 암피레굴린에 의해 활성화된다. 표피 성장 인자 (EGF) 및 전환 성장 인자-알파 (TGF-α) 는 모두 EGF 수용체에 결합하여, 세포성 증식 및 종양 성장을 일으키는 것으로 나타나 있다. 상기 성장 인자는 HER2 에 결합하지 않는다 (Ulrich and Schlesinger, 1990, Cell 61, 203).

이들의 이량체성 성질에 의해 수용체 이량체화를 유도하는 여러 성장 인자 서브패밀리 (예컨대 PDGF) 와는 대조적으로, 단량체성 성장 인자, 예컨대 EGF 는 이들의 수용체에 대한 2 개의 결합 부위를 포함하여, 2 개의 인접 EGF 수용체를 가교시킬 수 있다 (Lemmon 등, 1997, EMBO J. 16, 281). 최근의 연구 (J. Schlessinger, 2002, Cell 110,669) 는 이웃하는 수용체들에서 돌출한 루프가 수용체 이량체화 및 활성화를 매개하는 수용체-수용체 상호작용에 의해 수용체 이량체화가 매개됨을 보여준다. 수용체 이량체화는 내재된 촉매 활성의 자극 및 성장 인자 수용체의 티로신 잔기 상에서의 자가 인산화에 있어서 필수적이다. 후자는, 여러 신호전달 캐스케이드를 동시에 개시시키는 다양한 어댑터 단백질 또는 효소에 대한 도킹(docking) 부위로서 작용한다.

고등 진핵생물에 있어서, 단순한 선형 경로는 복잡하게 상호작용하는 다층 네트워크로 진화하였는바, 발달 과정에서 성분들의 복합적인 발현 및 활성화로 인해 환경-특이적인(context-specific) 생물학적 반응이 가능하게 되었다. ErbB 네트워크는 그 자체 입력정보만이 아니라, 호르몬, 림포카인, 신경전달물질 및 스트레스 유도 물질을 포함하는 이종적 신호를 통합할 수 있을 것이다.

[0010] 수용체 단백질 티로신 키나아제 (PTK) 는 동종- 및 이종-이량체화를 모두 거칠 수 있다는 것이 주지되어야 한다 (여기서, 동종이량체성 수용체 조합이 대응하는 이종이량체성 조합보다 분열촉진성 및 형질전환 능력 (transforming)이 덜하다 (신호전달을 개시하지 않거나 약하게 개시함)). ErbB2 를 포함하는 이종이량체가 가장 강력한 복합체이다 (리뷰 문헌 [Yarden and Sliwkowski, 2001, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, volume 2, 127-137; Tzahar and Yarden, 1998, BBA 1377, M25-M37] 을 참고).

[0011] 항-EGF 수용체 항체는 EGF 및 TGF-α 의 수용체로의 결합을 차단하면서, 종양 세포 증식을 저해하는 것으로 나타났다. 상기 발견의 관점에서, EGF 수용체에 대한 여러 마우스 및 래트 단일클론 항체가 개발되어, 시험관내 및 생체 내에서 종양 세포의 성장을 억제하는 이들의 능력에 대해 평가되었다 (Modjtahedi and Dean, 1994, J. Oncology 4, 277). 인간화 단일클론 항체 425 (h MAb 425, US 5,558,864; EP 0531 472) 및 키메라 단일클론 항체 225 (c MAb 225, US 4,943,533 및 EP 0359 282) 는 둘 다 EGF 수용체에 대한 것으로, 임상 시험에서 그 효능을 나타내었다. C225 항체 (세툭시맵, Cetuximab) 는 시험관 내에서 EGF-매개 종양 세포 성장을 저해하고, 누드 마우스의 생체 내에서 인간 종양 형성을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 상기 항체, 뿐만 아니라 일반적으로 모든 항-EGFR 항체는 무엇보다도, 특정 화학치료제 (즉, 독소루비신, 아드리아마이신, 탁솔 및 시스플라틴) 와 상승 작용하여, 이종이식 마우스 모델의 생체 내에서 인간 종양을 근절하는 것으로 나타났다(예를 들어, EP0667165 참조). Ye 등 (1999, Oncogene 18, 731) 은 인간 난소암 세포가 키메라화 MAb 225 및 HER2 수용체에 대한 인간화 MAb 4D5 의 조합으로 성공적으로 치료될 수 있다고 보고하였다.

[0012] ErbB 패밀리의 두번째 멤버인 HER2 (ErbB2 또는 p185*neu*) 는 원래 화학 처리된 래트의 신경모세포종으로부터 형

질전환 유전자 산물로 동정되었다. *neu* 원종양 유전자의 활성화 형태는 코딩되는 단백질의 막통과 영역 내 점 돌연변이 (발린에서 글루탐산으로) 로 인한 것이다. *neu* 의 인간 동족체의 증폭이 유방암 및 난소암에서 관찰되며, 불량한 예후와 관련된다 (Slamon 등, *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon 등, *Science*, 244: 707-712 (1989); US 4,968,603). ErbB2 (HER2) 의 분자량은 약 185,000 으로, EGF 수용체 (HER1) 와 상당한 상동성을 보유하지만, HER2 에 대한 특이적 리간드는 현재까지 아직 동정되지 않고 있다. HER2 수용체에 대한 항체 4D5 는 또한 ErbB2-과발현 유방암 세포주를 TNFα의 세포독성 효과에 대해 민감화시키는 것으로 나타났다 (US 5,677,171). 마우스 항-ErbB2 항체 4D5 의 재조합 인간화 버전 (huMAb4D5-8, rhuMAbHER2 또는 HERCEPTIN®; US 5,821,337) 은 광범위한 선행 항암 치료법을 수여받은 ErbB2-과발현 전이성 유방암 환자에게서 임상적으로 활성을 보인다 (Baselga 등, *J. Clin. Oncol*. 14: 737-744 (1996)). HERCEPTIN® 은 ErbB2 단백질을 과발현하는 전이성 유방암 환자의 치료용으로 1998 년에 시판 허가를 받았다.

[0013] 항-ErbB 항체 이외에도, 천연 리간드 (상세한 설명 참고) 의 결합 부위를 차단하거나, 수용체 키나아제의 결합 부위의 티로신 잔기를 차단하여 인산화, 및 이후의 캐스케이드 신호전달을 방지하는 ErbB 수용체 분자의 강력한 억제제로서 공지된 여러 화학적 소분자가 있다. 임상 시험에서 높은 효능을 나타낸 하나의 대표물은 NSCLC 징후 (비소세포성 폐암) 에 대해 적용될 수 있는 Iressa™ (ZD-1839) 이다.

[0014] 이미 종양 치료를 위한 몇몇 전망있는 약물 및 방법이 개발 중이거나 시판 중이지만, 개선된 특성과 증강된 효능을 지닌 추가 제제 및 약학적 조성물 및 조합물에 대한 요구가 지속적으로 존재하고 있다.

발명의 상세한 설명

[0015] 본 발명의 개요

[0016] 본 발명은, 질환 세포의 표면, 예컨대 종양 세포에서 과발현되는 특정 수용체 티로신 키나아제, 예컨대 ErbB 수용체 항체 분자, 바람직하게는 ErbB1 수용체 (EGFR) 항체 분자들이 천연 리간드 결합 도메인 내에, 상이한 항체 분자들이 상호 간섭없이 또는 간섭이 거의 없이 동시에 결합할 수 있는 특이적 에피토프 부위를 갖는다는 발명자들의 발견에 근거한 것이다. 실제적으로, 이들 항체 분자들은 수용체 분자의 결합 도메인의 전체 크기와 비교할 때 이들의 3 차 구조에 대하여 비교적 작은 결합 에피토프를 보유한다. 이들은 경로 신호전달의 조절 활성을 증가시킴으로써, 바람직하게는 ErbB 수용체의 차단을 증가시킴으로써 전체 신호전달 캐스케이드의 차단을 증가시킨다. 본 발명은, 바람직하게는 동일 수용체의 천연 리간드 도메인 내의, 적어도 제 1 및 제 2 의 상이한 에피토프에 결합함으로써 ErbB 수용체, 바람직하게는 EGF 수용체 (EGFR) (ErbB1) 를 차단 또는 저해하는, 하나 이상의 생물학적 및 치료상 유효한 작용제를 개체에 투여하는, 종양 치료법에 있어서의 새로운 개념에 대해 최초로 기술한다. 예컨대, 둘 이상의, 바람직하게는 두 개의, 별개의 수용체-길항적 분자가, 바람직하게는 동일 수용체 분자의 동일 수용체 도메인에 상호 간섭 또는 경쟁없이 동시에 결합하여, 보다 고밀도의 길항제가 상기 수용체에 결합하여 (EGF 또는 TGF 등의 천연 (길항적) 리간드들을 결합시키는 능력이 보다 무능해짐으로써) 단량체 또는 2량체 단위로서의 해당 수용체 분자들의 신호전달 캐스케이드에 훨씬 더 강한 저해 영향을 미치도록 할 수 있다는 것을 발견할 수 있었다. 이는 종양 성장 및/또는 고형 종양의 증가된 사멸 (apoptosis) 또는 종양 전이를 더욱 강하게 저해할 것이다. 상기 분자들은 소형 화학 및 합성 화합물 또는 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드, 면역글로불린, 예컨대 항체 또는 이의 절편, 또는 면역접합체들일 수 있다.

바람직한 분자들은 항-ErbB 항체, 특히 상기 및 하기 상술되는 항-EGFR 및 항-Her2 항체, 및 이들의 절편, 바람직하게는 F(ab')2 이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 두 개의 상이한 항-EGFR 항체가 개체에 투여되는데, 바람직하게는 인간화 버전, 키메라화 버전 및 마우스 버전의 MAb 425 또는 이의 절편, 예컨대 F(ab')2, 및 인간화 버전, 키메라화 버전 및 마우스 버전의 MAb 225 또는 이의 절편, 예컨대 F(ab')2 이다. 가장 바람직한 것은, 완전한 항체로서 또는 F(ab')2 절편으로서, 인간화 MAb 425 및 키메라화 MAb 225 를 조합적으로 적용하는 것이다.

[0017] 그러나, 각 항체의 1 개, 2 개 또는 3 개의 CDR 의 아미노산 서열을 포함한 상기 항체 구축물로부터 유래하고 생산된 비교적 짧은 합성 (폴리)펩티드를 사용하는 것도 가능한데, 이때, 임의적으로는, 상기 수용체에 대한 결합 친화력 및/또는 결합력 (avidity) 을 증가시키기 위하여 상기 항원 결합 부위 내 또는 이의 바로 가까이에 있는 일부 아미노산들(1 내지 5 개 아미노산)을, 바람직하게는 치환으로 변형시킬 수 있다. 상기 각 항체들과 유사한 방식으로 상기 수용체에 결합할 수 있는 이러한 합성 펩티드들은 제조 방법이 간단하고 값이 저렴하다는 이점이 있다. 상기 제 1 분자 및 제 2 분자의 CDR-유래 아미노산 서열을 포함한 단 하나의 펩티드를 합성하는 것 또한 가능한데, 예를 들어, MAb 425 의 1 내지 3 개 CDR 및 MAb 225 의 1 내지 3 개 CDR 로부터

유래한 아미노산 서열을 포함한 (폴리)펩티드가 있다.

[0018] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 상기 결합 부위들 중 하나만을 포함한 단일 분자와 비교하여, 상이한 또는 동일한 ErbB 수용체 가교/2량체화 강화, ErbB 수용체 차단/저해 강화, 및 ErbB 수용체-특이적 경로 신호전달의 조절 유도 강화에 작용할 수 있다는 것을 발견하였다. 즉: 예를 들어, MAb 425 및 MAb 225 의 혼합물은 동일 농도의 단일 작용제로서 적용된 MAb 425 또는 225 와 비교하여, EGFR 의 저해 강화 및 하향-조절을 유도해낸다.

[0019] 상기 기술한 관찰이 표적 수용체 분자들로서의 ErbB 수용체들에 대하여만 이루어진 것이긴 하지만, 상기 및 하기 언급되는 본 발명자들에 의하여 발견된 과학적 원리는 ErbB 외의 다른 생물학적 수용체에 대하여도 적용될 수 있다는 것이 주목되어야 한다.

[0020] 임의적으로는, 본 발명에 따른 조성물은 상기 언급한 분자들의 효능을 지원하고 강화할 수 있는 추가적인 치료상 활성인 화합물을 포함한다. 상기 작용제는 세포독성 작용제 및 바람직하게는 길항적 분자들, 예컨대 티로신 키나아제 길항제, 다른 ErbB 길항제, 호르몬 성장 수용체 길항제, 단백질 키나아제 길항제, 항-혈관형성제 또는 사이토카인일 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 이러한 분자들은 하기에 좀 더 상세히 기술된다.

[0021] 본 발명에 따르면, 치료상 활성인 제제는 또한 상기 길항 제제 하나 이상을 1 개 또는 분리된 용기들에 포함하고 있는 포장품을 포함한 약학적 키트를 이용하여 제공될 수 있다. 이 조합을 이용한 치료법은 임의적으로 방사선을 이용한 치료를 포함할 수 있다. 대체로, 투여는 방사선 요법을 동반할 수 있으며, 이때 방사선 치료는 실질적으로 약물 투여와 동시에 또는 전 또는 후에 행해질 수 있다. 본 발명에 따른 조합 요법의 상이한 제제들의 투여는 또한, 실질적으로 동시에 또는 순차적으로 수행될 수 있다. 종양은, 자신의 세포 표면에 상기 종양의 혈관 발달에 관련된 수용체를 갖고 있어서, 본 발명의 조합 요법으로 성공적으로 치료될 수 있다.

[0022] 종양이 자신의 발달 및 성장에 대한 대안적인 경로를 이끌어낸다는 것은 공지되어 있다. 한 경로가 차단될 경우, 이들은 종종 다른 수용체 및 신호전달 경로를 발현 및 사용하여 또 다른 경로로 전환시키는 능력을 갖고 있다. 따라서, 본 발명의 약학적 조합물은 상기 종양의 이러한 가능한 발달 전략들 중 수 개를 차단할 수 있고, 결과적으로 다양한 이득을 제공한다. 본 발명에 따르는 조합물은, 종양 세포의 표면에 존재하는 관련 호르몬 수용체의 활성화에 의해 발달하고 성장하는 종양, 종양-유사 및 신생물 (neoplasia) 장애 및 종양 전이를 치료 및 예방하는데 유용하다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 상이한 조합 제제는 낮은 투여량, 즉, 임상적 상황에서 통상적으로 사용되어 온 것 보다 낮은 투여량으로 조합하여 투여된다. 개체에 투여되는 본 발명의 화합물, 조성물, 제제 및 치료제의 투여량을 낮춤으로 인한 이득에는, 보다 높은 투여량과 관련된 부작용 발생의 감소가 있다. 예를 들어, 상기 및 하기 기술되는 제제의 투여량을 낮춤으로써, 보다 높은 투여량으로 관찰되는 것과 비교할 때, 구역질 및 구토의 빈도 및 정도가 감소된 결과가 나타날 것이다. 부작용 발생을 낮춤으로써, 암환자의 삶의 질 향상이 예기된다. 부작용 발생을 낮춤으로 인한 추가적인 이득은 환자 순응 향상, 부작용 치료에 필요한 입원 회수 감소, 및 상기 부작용과 관련한 고통 치료에 필요한 진통제 투여 감소 등이 있다. 다르게는, 본 발명의 방법 및 조합은 또한 보다 높은 투여량으로 치료 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 조합물은 놀라운 상승 효과를 나타낸다. 상기 약물의 조합물의 투여시, 임상 연구 동안 실질적인 부정적 약물 반응이 검출가능하지 않으면서 실제 종양 수축 및 분해가 관찰될 수 있었다.

[0024] 상세하게는, 본 발명은 하기에 관한 것이다:

[0025] • ErbB 수용체 분자의 결합 도메인의 상이한 에피토프들에 결합하는 능력을 갖는 하나 이상의 생물학적으로 및/또는 치료상 유효한 항체 분자 (또는 그의 절편) 을 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 하나 이상의 항체 분자(들)가 적어도 상기 수용체 결합 도메인의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위 및 적어도 동일한 ErbB 수용체 결합 도메인의 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 또 다른 결합 부위를 포함하는 약학적 조성물.

[0026] • 두 개 이상의 항체 분자를 포함하는 대응 약학적 조성물로서, 하나의 항체 분자가 적어도 상기 수용체 도메인의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하고 적어도 또 다른 항체 분자가 적어도 동일한 수용체 결합 도메인의 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 다른 결합 부위를 포함하는 약학적 조성물.

[0027] • 대응 약학적 조성물로서, 하나 이상의 상기 항체 분자가 수용체의 천연 리간드가 결합하는 수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 결합하는, 약학적 조성물.

[0028] • 상기 결합 부위 중 하나만을 포함하는 단일 분자에 비해 ErbB 수용체의 차단 및/또는 저해 강화, 및 ErbB 수용체-특이적 경로 신호전달의 조절 유도 강화에 영향을 미치는, 대응 약학적 조성물.

[0029] • 동일하거나 상이한 특이성을 갖는 상이한 수용체 분자의 가교 및/또는 이량체화 (dimerization) 의 유도 강화에 영향을 미치는, 대응 약학적 조성물.

[0030] • 상기 ErbB 수용체가 EGF 수용체 (EGFR) 인, 대응 약학적 조성물.

[0031] • 각각 EGF 수용체의 상이한 에피토프를 표적으로 하는 제 1 및 제 2 단일클론 항체 또는 그의 생물학적으로 활성인 단편을 포함하는, 대응 약학적 조성물.

[0032] • 제 1 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 MAb 425 인, 대응 약학적 조성물.

[0033] • 제 2 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 MAb 225 인, 대응 약학적 조성물.

[0034] • 상기 제 1 항체가 인간화된 MAb 425 (h425) 이고 제 2 항체가 키메라화 MAb 225 (c225, Cetuximab) 인, 대응 약학적 조성물.

[0035] • 세포독성 약물을 추가로 포함하는, 대응 약학적 조성물.

[0036] • 하기를 포함하는 약학적 키트:

[0037] (i) ErbB 수용체 분자의 결합 도메인의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는, 적어도 제 1 생물학적 활성 항체 분자, 또는 그의 절편을 포함하는 제 1 포장품, 및 (ii) 동일한 ErbB 수용체 분자의 결합 도메인의 상이한 제 2 특이적 에피토프에 결합하는, 적어도 제 2 항체를 포함하는 제 2 포장품.

[0038] • 하나 이상의 상기 항체 분자가 수용체의 천연 리간드가 결합하는 수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 결합하는, 대응 약학적 키트.

[0039] • 상기 제 1 항체 분자가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 단일클론 항체 425 또는 그의 생물학적 활성 절편이고, 상기 제 2 항체 분자가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 항체 225 또는 그의 생물학적 활성 절편인, 대응 약학적 키트.

[0040] • 인간화된 MAb 425 (h425) 를 포함하는 제 1 포장품 및 키메라화된 MAb 225 (c225) 를 포함하는 제 2 포장품을 포함하는, 대응 약학적 키트.

[0041] • 제 1 및 제 2 포장품에 의해 제공되는 약물의 효능을 증가시키는 능력을 가진 추가적인 약물을 포함하는 제 3 포장품을 추가로 포함하는, 대응 약학적 키트.

[0042] • 상기 추가 약물이 세포독성 약물인, 대응 약학적 키트.

[0043] • (i) 적어도 ErbB 수용체 분자의 결합 도메인의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 제 1 항체 분자 (또는 그의 절편) 및 (ii) 적어도 동일한 ErbB 수용체 분자의 결합 영역의 상이한 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 제 2 항체 분자의 치료상 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 종양 관련 질병을 치료하는 방법.

[0044] • 하나 이상의 상기 항체 분자가 수용체의 천연 리간드가 결합하는 수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 결합하는, 대응하는 방법.

[0045] • 상기 에피토프에 결합하는 상기 항체 분자가 수용체를 차단하고/하거나 저해하여 수용체-특이적 경로 신호전달의 조절을 유도하는, 대응하는 방법.

[0046] • 상기 항체 분자의 결합이 동일하거나 상이한 특이성을 갖는 상이한 수용체 분자의 가교 및/또는 이량체화를 유도하는, 대응하는 방법.

[0047] • 상기 제 1 항체 분자가 인간화된 단일클론 항체 425 (h425) 또는 그의 생물학적 활성 절편이고, 상기 제 2 분자가 키메라화 또는 단일클론 항체 225 (c225) 또는 그의 생물학적 활성 절편인, 대응하는 방법.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에서, ErbB 는 EGF 수용체 (EGFR) 이고, 상기 수용체 상의 상이한 에피토프를 표적으로 하는 항체는 항-EGFR 항체이다.

[0049] 따라서, 본 발명은 상세하게는 하기에 관한 것이다:

[0050] • 동일하거나 상이한 ErbB 수용체 분자 타입들에 위치하는 상이한 에피토프들에 결합하는 능력을 갖는, 제 1 및 제 2 항체 분자, 또는 그의 일부를 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 제 1 항체 분자 또는 그의 일부가 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하고, 상기 제 2 항체 분자가 동일한 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 제 2 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하는 약학적 조성물.

[0051] • 적어도 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 상기 제 1 및 상기 제 2 에피토프가 ErbB1 수용체 결합 도메인 내에 위치하는 약학적 조성물.

[0052] • ErbB1 수용체 분자 타입 상의 상기 제 1 또는 상기 제 2 에피토프가 ErbB1 수용체 결합 도메인 내에 위치하는 약학적 조성물.

[0053] • 상기 수용체 결합 도메인이 상기 ErbB1 수용체 분자 타입의 천연 리간드의 결합 도메인인 약학적 조성물.

[0054] • 제 1 및 제 2 항체, 또는 그의 절편이 상기 ErbB1 수용체 분자 타입의 천연 리간드(들)의 결합 도메인 내의 상이한 에피토프들에 결합하는 약학적 조성물.

[0055] • 단지 상기 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 상기 제 1 또는 상기 제 2 에피토프에만 결합하는 단일 항체 분자를 포함하는 조성물에 비해, ErbB 수용체의 차단 및/또는 저해, 및 ErbB 수용체-특이적 경로 신호전달의 하향-조절 (down-regulation) 의 유도가 강화되는 약학적 조성물.

[0056] • 단지 상기 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 상기 제 1 또는 상기 제 2 에피토프에만 결합하는 단일 항체 분자를 포함하는 조성물에 비해, 동일하거나 상이한 특이성의 ErbB 수용체 분자들의 가교 및/또는 이량체화의 유도가 강화된 약학적 조성물.

[0057] • 상기 ErbB 수용체 분자들이 가교 및/또는 이량체화에 관여하고, ErbB1 및 ErbB2 (Her-2) 로부터 선택되는 약학적 조성물.

[0058] • 상기 제 1 및/또는 상기 제 2 항체가 일특이적 (monospecific) 항체인 약학적 조성물.

[0059] • 제 1 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 MAb 425 인 약학적 조성물.

[0060] • 제 2 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 MAb 225 인 약학적 조성물.

[0061] • 상기 제 1 항체가 인간화된 MAb 425 (h425) 이고 상기 제 2 항체가 인간화된 MAb 225 (c225) 인 약학적 조성물.

[0062] • 세포독성제를 추가로 포함하는, 특허청구범위 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물.

[0063] • 상기 세포독성제가 화학요법제인 약학적 조성물.

[0064] • 상기 화학요법제가 시스플라틴, 독소루비신, 겜시타빈, 도세탁셀, 파클리탁셀, 블레오마이신으로 이루어진 군의 화합물 중 어느 하나로부터 선택되는 약학적 조성물.

[0065] • 상기 세포독성제가 ErbB 수용체 저해제, VEGF 수용체 저해제, 티로신 키나아제 저해제, 단백질 키나아제 A 저해제, 항-혈관형성제 (anti-angiogenic agent), 또는 사이토카인인 약학적 조성물.

[0066] • 상기 제 1 및/또는 제 2 항체 분자가 면역접합체이고, 항체 부분이, 임의적으로 연결자 펩티드를 통해, 그의

C-말단이, 생물학적으로 유효한 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질에 융합된 약학적 조성물.

[0067] • 단백질이 사이토카인인 약학적 조성물.

[0068] • ErbB1 수용체 분자에 존재하는 제 1 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하는, 제 1 항체 분자 또는 그의 일부를 포함하는 제 1 포장품, 및 (ii) 동일한 ErbB1 수용체 분자 타입 상의 제 2 의 상이한 특이적 에피토프에 결합하는 결합 부위를 포함하는 제 2 항체 분자를 포함하는 제 2 포장품을 포함하는 약학적 키트.

[0069] • 적어도 ErbB1 수용체 상의 상기 제 1 또는 상기 제 2 에피토프가 ErbB1 수용체 결합 도메인 내에 존재하는 약학적 키트.

[0070] • ErbB1 수용체 상의 상기 제 1 및 상기 제 2 에피토프가 ErbB1 수용체 결합 도메인 내에 존재하는 약학적 키트.

[0071] • 하나 이상의 상기 분자가 수용체의 천연 리간드가 결합하는 ErbB1 수용체 결합 도메인 내의 에피토프에 결합하는 약학적 키트.

[0072] • 상기 제 1 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 단일클론 항체 425 이고, 상기 제 2 항체가 마우스, 키메라화된 또는 인간화된 단일클론 항체 225 인 약학적 키트.

[0073] • 인간화된 MAb 425 (h425) 를 포함하는 제 1 포장품 및 키메라화된 MAb 225 (c225) 를 포함하는 제 2 포장품을 포함하는 약학적 키트.

[0074] • 세포독성제를 포함하는 제 3 포장품을 추가로 포함하는, 특허청구범위 제 19 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 따른 약학적 키트.

[0075] • 상기 세포독성제가 화학요법제인 약학적 키트.

[0076] • 상기 화학요법제가 시스플라틴, 독소루비신, 겜시타빈, 도세탁셀, 파클리탁셀, 블레오마이신으로 이루어진 군의 화합물 중 어느 하나로부터 선택되는 약학적 키트.

[0077] • 상기 세포독성 약물이 ErbB 수용체 저해제, VEGF 수용체 저해제, 티로신 키나아제 저해제, 단백질 키나아제 A 저해제, 항-혈관형성제, 또는 사이토카인인 약학적 키트.

[0078] • ErbB, 특히 ErbB1 수용체의 과발현 (overexpression) 과 관련되는, 종양, 종양 전이 또는 종양 관련 질환의 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 정의한 바와 같으며 상기 청구항 중 어느 하나에 있는 약학적 조성물 또는 약학적 키트의 용도.

[0079] 발명의 상세한 설명

[0080] 본 발명은 상이한 면역성 구조에 대하여 특이성을 지닌 두 개 이상의 별개의 분자, 바람직하게는 단일클론 항체 (MAb) 들이, 동일한 ErbB, 바람직하게는 ErbB1, 수용체 도메인, 예컨대 ErbB (ErbB1) 리간드-결합 도메인 내에 위치할 수 있는 이의 에피토프와 동시에, 그리고 간섭 없이 결합할 수 있다는 관찰 결과를 기초로 한다. 상기 기술한 특성을 갖는 두 개 이상의 화학적 및 생물학적 분자들, 예컨대 1특이적 MAb 또는 동일 또는 상이한 수용체를 표적으로 하는 항체들의 조합을 응용함으로써, 단지 하나의 1특이적 항체를 이용한 치료법의 효능에 비해 치료적 효능을 상당히 개선할 수 있다:

[0081] • 두 개 이상의 MAb 가 이들의 표적 수용체 (예, EGFR) 상의 상이한 에피토프에 독립적으로 결합한다.

[0082] • 상이한 수용체 에피토프들에 대한 독립적인 결합에 기인하여, 수용체당 결합하는 항체의 양 및 따라서 세포당 결합하는 항체의 양은 동일 항체 투여량 또는농도에 따라 증가할 것이다. 각 항체에 대한 포화 농도 또는 투여량을 가진 최적 조건하에서, 수용체당 결합하는 항체의 수 및 따라서 세포당 결합하는 항체의 수는, 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 두 개의 항체를 사용하는 경우 이론적으로 두 배가 될 수 있을 것이다.

[0083] • 항체-의존 면역 효과기 기능에 역치 이하의 항원 밀도를 가지는 세포는 정상 조건하에서 항체 요법을 받기 쉽지 않으므로, 동일 수용체의 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 두 개 이상의 항체를 이용한 치료 후, 그 표면상에 증가된 양의 항체를 나타내며, 따라서, ADCC 및 CDC 에 영향받을 가능성이 있다.

[0084] • 단 하나의 단일 항체로 수득된 수용체 차단의 효율과 비교할 때, 리간드-결합 도메인 내의 또는 이의 부근의 상이한 에피토프들에 대한 특이성을 가진 두 개 이상의 1특이적 항체를 적용할 경우 수용체 차단 효능이 명백히 증가된다.

[0085] • 동일 수용체 도메인을 표적으로 하는 상이한 항체들의 조합에 의한 수용체 차단은 단 하나의 단일 항체에 의한 수용체 차단보다 더욱 효과적이기 때문에, 리간드-결합을 좀 더 효과적으로 저해할 수 있으며, 이는 상기 수용체를 좀 더 효과적으로 불활성화시킨다.

[0086] • 상기 좀 더 효율적인 수용체 불활성화의 결과로서, 하향 수용체 신호전달이 좀 더 효과적으로 저해되며, 결과적으로 리간드-의존 세포 기능에 미치는 영향이 증가된다.

[0087] • 상기 좀 더 효율적인 수용체 차단에 기인하여, 상기 적용된 항체들 각각의 투여량 (또는 농도) 은 효능 손실 없이 감소될 수 있다. 이는, 최적의 치료적 투여량 이하에서 이미 용량-제한적인 독성 또는 부작용을 보이는 치료 항체들을 적용할 때, 매우 흥미로울 수 있다.

[0088] • 수용체의 하나의 단일 에피토프와 반응하는 1특이적 항체는 두 개의 수용체 분자들로 이루어진 응집체 형성을 허용한다. 이와 반대로, 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 둘 이상의 항체들에 의하여 유도되는 수용체들의 가교는 수용체들의 수가 명백히 더 많은 수용체-항체 복합체를 초래한다.

[0089] • 둘 이상의 항체의 적용으로 유도된 좀 더 거대한 수용체-항체 복합체 형성은 수용체의 내입을 향상시키므로, 세포 표면으로부터 수용체의 제거 및 그 결과 수용체-의존적인 세포 기능의 하향조절에 있어서 더 효과적일 수 있다.

[0090] • 동일 또는 상이한 수용체에 대한 둘 이상의 항체의 조합은 적당한 수용체를 수반하는 종양 치료에 사용할 수 있다. EGFR 양성 종양이 전형적인 예이나, 본 발명에 기재된 치료 원리의 적용은 상기 증상에 제한되지 않는다. 따라서, 동일한 원리를 이용하여 다른 수용체, 수용체 패밀리 또는 기타 항원성 구조를 지닌 매우 다양한 종양을 치료할 수 있다.

[0091] • 동일 또는 상이한 수용체 상의 상이한 항원에 대한 둘 이상의 항체를 이용한 조합 치료는, 화학요법 약물 및/또는 방사선과 함께 병용 치료법으로서도 적용할 수 있다.

[0092] • 동일 또는 상이한 수용체 상의 상이한 항원에 대한 둘 이상의 항체를 이용한 조합 치료는, 호르몬 길항제 또는 호르몬 작용제, 혈관형성 억제제를 이용한 치료 및 기타 치료를 포함하는(그러나 이에 제한되지는 않는다) 다른 치료 원리와 병용하여 사용할 수도 있다.

[0093] 동일 또는 상이한 수용체 상의 상이한 항원 구조에 대한 상이한 특이성을 지닌 적당한 분자, 바람직하게는 항체를 이용한 조합 치료법의 원리는 본 명세서에서 EGFR 양성 종양의 치료를 예로 들어 설명한다. 그러나, 상기 원리는 EGFR 에 한정되지 않으며, 임의의 다른 표적 항원에 대하여 사용하기 위해 변형될 수 있다.

[0094] 달리 설명하지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 용어 및 구는 다음과 같은 의미를 지니며 정의된다. 또한, 이러한 정의 및 의미는 바람직한 구현예를 포함하여 본 발명을 더 상세히 설명한다.

[0095] "수용체" 또는 "수용체 분자" 는 리간드와 결합하여 수용체-리간드 복합체를 형성하는 하나 이상의 도메인을 포함한 수용성 또는 막 결합/연관(membrane bound/associated) 단백질 또는 당단백질이다. 작용제 또는 길항제일 수 있는 리간드와 결합함으로써, 상기 수용체는 활성화 또는 불활성화되어 경로 신호전달을 개시 또는 차단할 수 있다.

[0096] "수용체 분자 유형" 또는 "ErbB (ErbB1) 수용체 분자 유형" 은 ErbB1, ErbB2 등과 같은 특정 수용체 유형을 의미하나 이 수용체 유형의 특정한 단일 분자를 의미하지는 않는다. 다시 말해, 본 발명에 따른 2특이적 항체는 이의 제 1 항원 결합 부위에 의해 개별 ErbB1 수용체 분자의 제 1 에피토프와 결합할 수 있으며, 상기 항체의 제 2 항원 결합 부위는 동일한 개별 ErbB1 수용체 분자의 제 2 의 상이한 에피토프와 결합한다. 상기 항

체의 제 2 항원 결합 부위가 동일 유형의 다른 개별적인 수용체 분자(ErbB1)의 제 2 의 상이한 에피토프와 결합하는 것 또한 가능하다. 또한, 상기 항체의 제 2 항원 결합 부위가 상이한 ErbB 수용체 분자 유형(예컨대, ErbB2)의 다른 개별 수용체 분자의 제 2 의 상이한 에피토프와 결합하는 것도 가능하다.

[0097] "리간드" 또는 "수용체 리간드" 는 수용체 분자와 결합하여 수용체-리간드 복합체를 형성하는 천연 또는 합성 화합물을 의미한다. 리간드라는 용어는 작용제, 길항제, 및 부분적인 작용제/길항제 활성을 지닌 화합물을 포함한다.

[0098] "작용제" 또는 "수용체 작용제" 는 수용체와 결합하여 수용체-작용제 복합체를 형성함으로써 상기 수용체 및 수용체-작용제 복합체를 각각 활성화시켜서 경로 신호전달 및 이후의 생물학적 과정을 개시한다.

[0099] "길항제" 또는 "수용체 길항제" 는 길항제와는 반대되는 생물학적 효과를 지닌 천연 또는 합성 화합물을 의미한다. 길항제는 수용체에 결합하여 작용제와 경쟁함으로써 수용체 작용제의 작용을 차단한다. 길항제는 작용제의 작용을 차단하는 능력에 의해 정의된다. 수용체 길항제는 또한 항체 또는 면역치료적으로 유효한 이의 절편일 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 길항제는 하기에 인용 및 논의된다.

[0100] "ErbB 수용체" 는 이미 상술하였듯이 ErbB 수용체 패밀리에 속하는 티로신 키나아제 수용체 단백질이며, EGFR(ErbB1), ErbB2, ErbB3 및 ErbB4 수용체 및 앞으로 동정될 상기 패밀리의 다른 멤버도 포함한다. ErbB 수용체는 ErbB 리간드와 결합할 수 있는 세포외 도메인; 친지질성 막통과 도메인; 보존성 세포내 티로신 키아나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 여러 티로신 잔기를 함유한 카르복실-말단 신호전달 도메인. ErbB 수용체는 "원 서열(native sequence)" ErbB 수용체 또는 이의 "아미노산 서열 변형체" 이다. 바람직하게 ErbB 수용체는 원 서열인 인간 ErbB 수용체이다. ErbB1 은 EGFR 단백질 산물을 암호화하는 유전자를 나타낸다. 가장 바람직한 것은 EGF 수용체(EGFR, HER1)이다. "ErbB1" 및 "HER1"및 "EGFR" 이란 표현은 본 명세서에서 서로 혼용하며, 이는 인간 HER1 단백질을 나타낸다. "ErbB2" 및 "HER2" 란 표현은 본 명세서에서 서로 혼용하며, 이는 인간 HER2 단백질을 나타낸다. 본 발명에서는 ErbB1 수용체 (EGFR) 가 바람직하다.

[0101] "ErbB 리간드" 는 ErbB 수용체와 결합하고/하거나 활성화시키는 폴리펩티드이다. EGFR 에 결합하는 ErbB 리간드에는, 예를 들어, EGF, TGF-알파, 암피레굴린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에피레굴린, 바람직하게는 EGF 및 TGF-알파가 포함된다.

[0102] "ErbB 수용체 결합 도메인" 은 본 발명에 있어서, 천연 리간드 또는 길항성 또는 작용성 약물이 결합하는 ErbB 수용체의 일부 영역(결합 서열/루프/홈(pocket))이다. 상기 영역은 한 개의 특이적 결합 부위 또는 에피토프 뿐만 아니라 2 개 이상의 에피토프 및 결합 부위를 각각 포함할 수 있다. 도메인 내의 한 특이적 결합 에피토프는 한 가지 종류의 길항성 또는 작용성 약물 또는 리간드와 결합한다. 그럼에도, 동일 수용체 유형의 결합 도메인 내 또는 바로 근처의 상이한 에피토프에 대한 상이한 제제의 결합은, 억제 또는 활성화에 의해 상기 수용체에 있어서는 전형적인, 별개의 독특한 신호전달 경로를 유발한다. 또한, 본 상세한 설명 및 청구의 범위에서 사용되는 "결합 도메인 내" 라는 구절은 각 천연 리간드(들)의 실제 결합 도메인의 가까운 인접 부위도 또한 포함한다는 점을 명백히한다.

[0103] "ErbB 결합 에피토프 또는 결합 부위" 는 리간드 또는 수용체 길항제/작용제가 결합하는 ErbB 수용체 결합 도메인 내 또는 그에 인접한 아미노산의 형태 및/또는 배열을 의미한다.

[0104] "동일한 ErbB/ErbB1 수용체 분자" 는 반드시 동일한 수용체 분자일 필요는 없으며, 동일한 유형의 다른 수용체 분자 또한 포함한다. 바람직하게는, 동일한 수용체 분자를 의미한다.

[0105] "ErbB 수용체 길항제/억제제" 는 생물학적 유효 분자로서, ErbB 수용체와 결합하여 차단 또는 억제하는 분자를 의미한다. 따라서, 상기 수용체를 차단함으로써 길항제는 ErbB 리간드 (작용제)의 결합 및 작용제/리간드 수용체 복합체의 활성화를 방지한다. ErbB 길항제는 HER1 (ErbB1, EGFR), HER2 (ErbB2) 및 ErbB3 및 ErbB4 를 목표로 한 것일 수 있다. 본 발명의 바람직한 길항제는 EGF 수용체(EGFR,HER1)를 목표로 한다. ErbB 수용체 길항제는 항체 또는 이의 면역치료적으로 유효한 절편 또는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질과 같은 비면역학적 분자일 수 있다. 화학적 분자 또한 포함되나, 항-EGPR 항체 및 항-HER2 항체가 본 발명에 따른 바람직한 길항제이다.

[0106] 본 발명의 바람직한 항체는 항-Her1 및 항-Her2 항체, 더욱 바람직하게는 항-Her1 항체이다. 바람직한 항-Her1 항체는 MAb 425, 바람직하게는 인간화 MAb 425(hMAb 425, US 5,558,864; EP 0531472) 및 키메라화 MAb 225(CETUXIMAB®)이다. 가장 바람직한 것은 단일클론 항체 h425 로서, 이는 단일 약물 치료에 있어서 높은

효능 및 감소된 역작용 및 부작용을 나타내었다. 가장 바람직한 항-HER2 항체는 Genentech/Roche 가 시판중인 HERCEPTIN® 이다.

[0107] 본 발명에 따른 효과적인 EGF 수용체 길항제는 천연 또는 합성의 화학적 화합물일 수도 있다. 상기 범주에서 바람직한 분자의 일부 예에는, 유기 화합물, 유기금속성 화합물, 유기 및 유기금속성 화합물의 염이 포함된다. 화학적 HER2 수용체 길항제의 예는 다음과 같다: 시티릴 치환 헤테로아릴 화합물 (US 5,656, 655); 비스 1 및/또는 2환 아릴 헤테로아릴, 카르보시클리, 및 헤테롤카르보시클릭 화합물 (US 5,646,153); 3환 피리미딘 화합물 (US 5,679,683); 수용체 티로신 키나아제 억제 활성을 지닌 퀴나졸린 유도체 (US 5,616,582); 헤테로아릴에텐디일 또는 헤테로아릴에텐디일아릴 화합물 (US 5,196,446); EGFR,PDGFR, 및 FGFR 수용체 패밀리를 억제하는 6-(2,6-디클로로페닐)-2-(4-(2-디에틸-아미노에톡시)페닐아미노)-8-메틸-8H-피리도(2,3)-5-피리미딘-7-온으로 지칭하는 화합물 (Panek, 등, 1997, J. Pharmacol. Exp. Therap. 283,1433).

[0108] 본 발명에 따르면 "티로신 키나아제 길항제/억제제" 는 수용체 티로신 키아나제를 포함하여 티로신 키나아제를 억제 또는 차단할 수 있는 천연 또는 합성 물질을 의미한다. 따라서, 상기 용어는 상기 정의한 바와 같은 ErbB 수용체 길항제/억제제 자체를 포함한다. 상기 및 하기에 언급된 항-ErbB 수용체 항체를 제외하고, 상기 정의에 따른 더욱 바람직한 티로신 키나아제 길항제는, 유방암 및 전립선암용 단일-약물 치료법에서 효능을 나타낸 바 있는 화학적 화합물이다. 미국 특허 5,516,771; 5,654,427; 5,461,146; 5,650,407 과 같은 문헌에 기재된 정보를 이용하여 적절한 인돌로카르바졸-형 티로신 키나아제 억제제를 수득할 수 있다. 미국 특허 5,475,110; 5,591,855; 5,594,009 및 WO96/11933 은 피롤로카르바졸-형 티로신 억제제와 전립선암에 대해 개시하고 있다. 이러한 맥락에서 가장 유망한 항암제 중 하나는 제피티닙(gefitinib: IRESSA®, Astra Zeneca)으로서, 이는 비소세포성 폐암(NSCLC) 뿐만 아니라 진행성 두부암 및 경부암을 지닌 환자에 대해 뛰어난 치료적 효능과 탁월한 용인성을 보유한 것으로 보고되었다.

[0109] 바람직하게, 상기한 화학적 티로신 키나아제 억제제의 투여량은 하루당 체중의 1 pg/kg 내지 1 g/kg 이다. 더욱 바람직하게는, 티로신 키나아제 억제제의 투여량은 하루당 체중의 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 이다.

[0110] 본 발명에 따른 상기 생물학적 분자는 바람직하게는 항체 또는 이의 절편 또는 면역접합체와 같은 임의의 항체 변형체이다.

[0111] 본 명세서에서, "항체" 또는 "면역글로불린" 은 가장 넓은 의미로 사용되며, 특히 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 두 개 이상의 비손상(intact) 항체, 및 항체 절편으로부터 생성된 비손상 단일클론 항체, 폴리클론 항체, 다특이적 항체(예컨대, 2특이적 항체)를 포괄한다. 상기 용어는 결합 특이성이 상이한, 서로 연결된 두 개 이상의 항체 또는 이의 절편으로 이루어진 이종항체를 일반적으로 포함한다.

[0112] 이들의 불변부의 아미노산 서열에 따라, 비손상 항체를 서로 다른 "항체(면역글로불린)집단" 으로 정할 수 있다. 5 개의 주요한 비손상 항체 집단이 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들 중 일부는 다시 "하위집단" (동종형(isotype)), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2 로 나뉠 수 있다. 상이한 집단의 항체에 대응하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 부른다. 본 발명에 따른 항체에서 바람직한 주요 집단은 IgG 이고, 더 구체적으로는 IgG1 및 IgG2 이다.

[0113] 항체는 통상적으로 두 개의 동일한 경쇄(L) 및 두 개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진, 분자량이 약 150000 인 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 디설파이드 공유 결합에 의해 중쇄와 연결되며, 디설파이드 연결 개수는 상이한 면역글로불린 동종형의 중쇄 가운데 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 일정한 간격으로 사슬내 디설파이드 다리를 가진다.

[0114] 각 중쇄는 한 쪽 말단에 가변 도메인 (VH) 과 그 이후의 여러 불변 도메인을 가진다. 각 경쇄는 한 쪽 말단에 가변 도메인 (VL) 그리고 다른 쪽 말단에 불변 도메인을 가진다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제 1 불변 도메인과 평행을 이루며, 경쇄의 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 평행을 이룬다. 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인 사이에 특정 아미노산 잔기가 접점을 형성하는 것으로 생각된다. 임의의 척추동물 종에서 유래된 항체의 "경쇄" 를, 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 바탕으로 하여, 완전히 별개의 두 가지 유형, 일명 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나로 나눌 수 있다.

[0115] 본 명세서에서 사용되는 "단일클론 항체" 는 실질적인 상동 항체 집합에서 수득한 항체, 즉 미량으로 존재하는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이체를 제외하고는 집합을 이루는 개별 항체가 동일한 항체를 일컫는다. 단일클론 항체는 매우 특이적이서, 단일 항원성 부위를 표적으로 한다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)를

표적으로 하는 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와는 달리, 각 단일클론 항체는 항원의 단일 결정인자를 표적으로 한다. 특이성에 더하여, 단일클론 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 단일클론 항체의 제조 방법은 Kohler 와 Milstein (1975, Nature 256,495) 이 기술하고, "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" (1985, Burdon 등, Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam) 에 기재된 하이브리도마 기법을 포함하거나, 또는 주지된 재조합 DNA 기법 (예컨대, US 4,816,567 참조) 에 의해 제조될 수 있다. 또한, 예컨대 [Clackson 등, Nature, 352: 624-628 (1991)] 및 [Marks 등, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단일클론 항체를 분리할 수도 있다.

[0116] "키메라화 항체" 는 중쇄 및/또는 경쇄 부분이 특정 종에서 유래되거나 또는 특정 항체 집단 또는 하위집단에 속하는 항체의 대응되는 서열과 일치 또는 유사한 반면, 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 사슬(들)의 나머지 부분은 다른 종에서 유래되거나 또는 다른 항체 집단 또는 하위집단에 속하는 항체 및 그러한 항체 절편의 대응되는 서열과 일치 또는 유사한 항체를 의미한다 (예: US 4,816,567; Morrison 등, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)). 키메라화 및 인간화 항체의 제조 방법 또한 당업계에 공지되어 있다. 키메라화 항체의 제조 방법에는 예를 들어, Boss (Celltech) 와 Cabilly (Genentech) 의 특허에 기재된 것이 포함된다 (US 4,816,397; US 4,816,567).

[0117] "인간화 항체" 는 비인간 면역글로불린에서 유래된 극미량의 서열을 함유한 비인간(예컨대, 설치류) 키메라화 항체의 형태이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 과가변영역(CDRs)에서 유래된 잔기가, 목적하는 특이성, 친화력 및 수용능력을 지닌 마우스, 래트, 래빗 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종의 과가변영역에서 유래된 잔기(공여자 항체)로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부의 경우, 인간 면역글로불린의 골격 부분(FR) 잔기는 대응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다.

[0118] 항체 성능을 보다 정교하게 하기 위해서 이와 같은 개질을 행한다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 루프가 비인간 면역글로불린의 그것과 일치하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 이 인간 면역글로불린 서열인, 하나 이상의, 통상적으로는 두 개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함한다. 또한, 인간화 항체는 통상적으로는 인간 면역글로불린의 것인, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 최소한 일부분을 임의로 포함한다. 인간화 항체의 제조 방법은 예컨대, Winter (US 5,225,539) 와 Boss (Celltech, US 4,816,397) 에 의해 기재되어 있다.

[0119] "항체 절편" 은 비손상 항체 부분을 포함하며, 바람직하게는 항원-결합 또는 이의 가변 영역을 포함한다. 항체 절편의 예로는, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 및 Fc 절편, 디아보디(diabody), 선형 항체, 단쇄 항체 분자; 및 항체 절편(들)에서 형성된 다특이적 항체가 포함된다. "비손상" 항체는 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3 뿐만 아니라 항원-결합 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0120] 바람직하게, 상기 비손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가진다. 항체의 파파인 분해는, 각각 단일 항원-결합 부위 및 CL 및 CH1 영역을 포함하는 "Fab" 절편이라 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 절편, 및 쉽게 결정화시키는 능력을 반영하는 이름을 지닌 잔여 "Fc" 절편을 생성시킨다.

[0121] 항체의 "Fc" 영역은, 대체로 CH2, CH3 및 IgG1 또는 IgG2 항체 메이저 집단의 경첩(hinge) 영역을 포함한다. 상기 경첩 영역은 CH1 영역이 CH2-CH3 영역과 조합된, 약 15 아미노산 잔기의 군이다.

[0122] 펩신 처리로 두 개의 항원-결합 부위를 지니며, 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 "F(ab')2" 절편이 생성된다.

[0123] "Fv" 는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소한의 항원 절편이다. 상기 영역은 단단한, 비공유 결합을 형성하는 한 개의 중쇄 및 한 개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 상기 구조에서 각 가변 도메인의 세 개의 과가변 영역(CDR)이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면 상에 항원-결합 부위를 특정짓는다. 종합하여, 여섯 개의 과가변 영역이 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 조차도(또는 항원에 특이적인 세 개의 과가변 영역만을 포함하는 Fv 의 절반) 비록 전체 결합 부위보다는 낮은 결합력으로 이긴 하나, 항원을 인식하여 결합하는 능력을 지닌다.

[0124] "Fab" 절편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제 1 불변 도메인(CH1)을 포함하며, 오로지 한 개의 항원-결합 부위를 지닌다.

[0125] "Fab'" 절편은 항체 경첩 영역의 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기를 첨가함으로써 Fab 절편과는 다르다.

[0126] F(ab')2 항체 절편은 원래 그 사이에 경첩 시스테인을 지닌 켤레 Fab'절편으로서 제조되었다. 다른 항체 절편의 화학적 커플링도 또한 공지되어 있다 (예컨대, Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996;. US 4,342,566 참조).

[0127] "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 절편은 V 및 항체의 V 도메인을 포함하는 바, 상기 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬로서 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv 가 항원 결합을 위한 소기의 구조를 형성할 수 있도록 VH 와 VL 사이에 폴리펩티드 연결자를 추가로 포함한다. 단쇄 FV 항체는, 예컨대 Plueckthun (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)), WO 93/16185; US 5,571,894; US 5,587,458; Huston 등 (1988, Proc.Natl.Acad.Sci.85,5879) 또는 Skerra 와 Plueckthun (1988, Science 240,1038) 에 의해 공지되어 있다.

[0128] "가변" 또는 "FR" 은 가변 도메인의 일정 부분이, 항체들 사이에서 서열이 광범위하게 다르다는 것과 특정 항원을 위한 각 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 것을 나타낸다. 그러나, 그 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 모두에 있어서 "과가변" 영역이라고 불리는 세 개의 마디에 집중되어 있다. 가변 도메인의 가장 잘 보존된 부분을 골격 영역(FR)이라고 부른다. 원 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 네 개의 FR (FR1-FR4)을 포함하는 바, 이는 대부분 β-시트 배열을 채택하며, β-시트 구조의 일부를 연결하는, 일부의 경우 형성하는 루프를 형성하는 세 개의 과가변 영역에 의해 연결된다.
각 사슬의 과가변 영역은 FR 에 의해 서로 근접하여 고정되어 있고, 다른 사슬의 과가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991) 참조). 불변 도메인은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 참여하지는 않으나, 항체의 항체 의존적 세포독성 (ADCC)에의 참여와 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다. "과가변 영역" 또는 "CDR" 은 본 명세서에서 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 과가변 영역은 통상적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 의 아미노산 잔기를 포함한다 (예컨대, 경쇄 가변 도메인의 24-34(L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인의 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102 (H3) 잔기; 및/또는 "과가변 루프" 의 잔기 (예컨대, 경쇄 가변 도메인의 26-32(L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인의 26-32(H1), 53-55 (H2) 및 96-101(H3) 잔기; Chothia and Lesk J.Mol.Biol. 196:901-917(1987)).

[0129] "골격 영역" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에 정의된 과가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0130] "1특이적" 이란 항체의 두 결합 부위가 동일한 특이성을 가져서, 수용체 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 항체를 말한다. 본 발명에 따르면, 약학적 조성물은 바람직하게는 1특이적 항체를 포함한다.

[0131] "2특이적 항체" (BAbs) 란 두 개의 상이한 특이적 항원 결합 부위를 갖는 2가 항체(또는 면역치료적으로 유효한 이의 절편)이다.

[0132] 본 발명에 따르면 BAb 는 BAb < MAb 1, MAb 2 > 로서 특징지워지는 바, <MAb 1> 및 <MAb 2> 는 MAb 1 및 MAb 2 에서 유래한 항원-결합 부위를 나타낸다. 예를 들어, 제 1 항원 결합 부위는 혈관형성 수용체 (예컨대, 인테그린 또는 VEGF 수용체) 를 표적으로 하는 반면, 제 2 항원 결합 부위는 ErbB 수용체 (예컨대, EGFR 또는 HER2) 를 표적으로 한다. 2특이적 항체는 화학적 기법 (예컨대, Kranz 등 (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,5807 참조), "폴리도마" 기술 (US 4,474,893 참조) 또는 재조합 DNA 기술에 의해 제조할 수 있으며, 이들은 모두 그 자체로 공지되어 있다. 추가적 방법은 WO 91/00360, WO 92/05793 및 WO 96/04305 에 기재되어 있다. 2특이적 항체를 또한 단쇄 항체로부터 제조할 수도 있다 (예컨대, Huston 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85,5879; Skerra and Plueckthun (1988) Science 240,1038 참조). 이들은 단일 폴리펩티드 사슬로서 생성된 항체 가변 영역의 유사체이다. 2특이적 결합제를 형성하기 위해, 단쇄 항체를 당업계에 공지된 화학적 또는 유전 공학적 방법에 의해 서로 연결할 수 있다. 루신 지퍼(zipper)서열을 이용하여 본 발명에 따른 2특이적 항체를 제조하는 것도 가능하다. 사용되는 서열은 전사 인자 Fos 및 Jun 의 루신 지퍼 영역에서 유래된다 (Landschulz 등, 1988, Science 240,1759; 리뷰를 위해서는, Maniatis and Abel, 1989, Nature 341,24 참조). 루신 지퍼는 루신이 통상적으로 7 번째 잔기마다 등장하는 약 20 내지 40개 잔기의 특정한 아미노산 서열이다. 상기 지퍼 서열은 양친매성 α-나선을 형성하는 바, 여기서 루신 잔기는 이량체 형성을 위해 소수성 면에 정렬한다. Fos 및 Jun 단백질의 루신 지퍼에 대응하는 펩티드는 바람직하게는 이

종이량체를 형성한다 (O'Shea 등, 1989, Science 245,646). 2특이적 항체를 함유한 지퍼 및 이의 제조 방법은 또한 WO 92/10209 및 WO 93/11162 에 개시되어 있다.

[0133] "융합 단백질" 은 상기 정의한 하나 이상의 생물학적 분자로 이루어진 천연 또는 합성 분자로서, 상이한 특이성을 지닌 두 개 이상의 펩티드- 또는 단백질 기재 (당단백질 포함) 분자가 임의로 화학적 또는 아미노산 기재의 연결자 분자에 의해 서로 융합된 분자를 말한다. 상기 연결자는 C-N 융합 또는 N-C 융합 (5'- > 3'방향에서), 바람직하게는 C-N 융합에 의해 형성될 수 있다.

[0134] 그러나, 본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 하기에 설명한 바와 같이 면역접합체이다.

[0135] "면역접합체" 는 융합 단백질을 말하는 것으로, 공유 결합에 의해 비면역학적 유효 분자에 융합된 각 항체 또는 면역글로불린, 또는 이의 면역학적으로 유효한 절편을 의미한다. 바람직하게 상기 융합 파트너로는 글리코실화될 수 있는 펩티드 또는 단백질이 있다. 상기 비항체 분자는 항체의 불변 중쇄의 C-말단 또는 경쇄 및/또는 중쇄의 N-말단에 연결될 수 있다. 융합 파트너는 대체로 3 - 15 개 아미노산 잔기를 함유한 펩티드인 연결자 분자를 통해 연결될 수 있다. 본 발명에 따른 면역접합체는 ErbB 수용체를 표적으로 하는 면역글로불린 또는 이의 면역치료적 유효 절편, 및 바람직하게는 사이토카인, 예컨대 TNFα, IFNγ 또는 IL-2, 또는 다른 독성 물질로 이루어진 융합 단백질이다. 바람직하게, 이들 펩티드- 또는 단백질 기재 분자는 상기 면역글로불린의 Fc 부분인 N-말단 에서 C-말단 사이 부분에 연결되어 있다.

[0136] "이종항체" 는 필수적으로 두 개 이상의 항체 또는 항체-결합 절편으로 이루어진 융합 단백질로서, 상기 항체는 각각 상이한 결합 특이성을 지니며, 통상적으로 화학적 연결자에 의해 서로 융합되어 있다. 이종항체는 두 개 이상의 항체 또는 항체 절편을 서로 접합시켜서 제조할 수 있다. 바람직한 이종항체는 가교 결합된 Fab/Fab' 절편으로 이루어진다. 다양한 결합제 또는 가교제를 상기 항체의 접합에 사용할 수 있다. 그 예로는 단백질 A, 카르보이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA) 및 N-숙신이미딜-3- (2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) 가 있다 (예컨대, Karpovsky 등 (1984) J. EXP. Med. 160, 1686; Liu et a. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,8648 참조). 다른 방법으로는 [Paulus 저, Behring Inst. Mitt., No. 78,118 (1985); Brennan 등 (1985) Science 30,81, 또는 Glennie 등 (1987), J. Immunol. 139,2367] 에 개시된 것들이 포함된다. 다른 방법은 세 개의 Fab' 절편을 연결하기 위해 o-페닐렌디말레이미드(oPDM) 를 사용한다 (WO 91/03493). 본 발명에 있어서 다특이적 항체 또한 적합하며, 이를 예컨대 WO 94/13804 및 WO 98/50431 의 지시에 따라 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 이종항체는 상술한 바와 같이 서로 연결된 (예컨대, MAB 425-MAB 225) 두 개의 항 -EGFR 항체 (각 항체는 동일한 수용체의 상이한 에피토프를 향한다) 를 포함하는 융합 단백질이다.

[0137] "사이토카인" 은 하나의 세포 집합(population)에 의해 방출된 단백질로서, 세포간 매개체로서 다른 세포에 작용하는 단백질을 일컫는 일반적 용어이다. 그러한 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인, 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이 있다. 사이토카인 중에는 다음과 같은 물질 포함된다: 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체형성 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 젖샘자극 호르몬; 마우스 성선자극 호르몬 관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 인테그린; 프롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGFβ; 혈소판-성장 인자; 전환 성장 인자(TGF), 예컨대 TGFα 및 TGFβ; 에리프로포이에틴(EPO); 인터페론, 예컨대 IFNα, IFNβ, 및 IFNγ; 집락 자극 인자, 예컨대 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨, 예컨대 IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 및 TNF-α 또는 TNF-β. 본 발명에 따른 바람직한 사이토카인은 인터페론, TNFα 및 IL-2 이다.

[0138] 항체 "효과기 기능" 이란 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변형 Fc 영역) 에 기인한 생물학적 활성을 말한다. 항체 효과기 기능의 예에는 보체 의존적 세포독성, Fc 수용체 결합, 항체-의존적 세포매개 세포독성 (ADCC), 포식작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체) 의 하향 조절 등이 포함된다.

[0139] "ADCC" (항체-의존적 세포-매개 세포독성) 는 Fc 수용체 (FcR) 를 제시하는 비특이적 세포독성 세포 (예컨대, 자연세포독성 (NK) 세포, 호중구, 및 대식세포) 가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인지한 후 표적 세포의 용해를 초래하는 세포매개 반응을 말한다. ADCC, NK 세포 를 매개하는 1차 세포는 FcγRIII 만을 제시하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 를 제시한다. 관심 분자의 ADCC 활성을 측정하기 위해, 선행 기술 (US 5,500, 362; US 5,821, 337) 에 기재된 것과 같은 실험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기

분석을 위한 유용한 효과기 세포에는 말초혈 단핵세포(PBMC) 및 자연세포독성(NK) 세포가 포함된다.

[0140] "Fc 수용체" 또는 "FcR" 은 항체의 Fc 영역과 결합하는 수용체를 표현하는 데 사용되는 용어이다. 바람직한 FcR 은 천연 서열의 인간 FcR 이다. 또한, 바람직한 FcR 은 IgG 항체 (감마 수용체) 와 결합하는 것으로서, FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII 하위집단, 및 상기 수용체들의 대립유전자 변형체 및 대안적 스플라이싱 형태를 포함한다. FcR 은 예를 들어, [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991)]에서 연구되었다.

[0141] 본 발명의 치료적 접근법에는, 종양 독성 또는 세포증식 억제 효능과 같은 바람직한 효과를 지원하거나 또는 바람직하지 않은 부작용을 감소 또는 억제하는 치료적 유효 제제를 추가로 투여하는 방법이 특정한 구현예로서 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 및 하기에 정의 및 청구된 약학적 조성물을 포함한 상기 제제의 조합물을 포함하며, 여기서 상기 제제는 일반적으로 다른 ErbB 수용체 길항제, VEGF 수용체 길항체, 사이토카인, 사이토카인-면역접합체, 항-혈관형성제, 항-호르몬제, 또는 세포독성제일 수 있다. 본 발명의 또다른 목적은 본 명세서에 정의된 조성물을 공지된 방법에 따른 방사선 치료법과 조합하는 것이다.

[0142] 본 명세서에서 사용되는 "세포독성제" 란 용어는 매우 넓은 의미로 정의되며, 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴(세포사)를 초래하고/하거나 항-신생물/항-증식 효과, 예컨대 신생물성 종양 세포의 발달, 성숙 또는 확산을 직간접적으로 예방하는 효과를 발휘하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 특히 단지 세포 독성 효과가 아닌 세포증식 억제 효과만을 유발하는 제제 또한 포함한다. 상기 용어는 하기에 구체화된 화학요법제 뿐만 아니라, 다른 ErbB 길항제(예컨대, 항-ErbB 항체), 항-혈관형성제, 티로신 키나아제 억제제, 단백질 키나아제 A 억제제, 사이토카인 패밀리 멤버, 방사성 동위원소, 및 박테리아, 균류, 식물 또는 동물 유래의 효소적 활성 독소와 같은 독소를 포함한다.

[0143] "화학요법제" 는 "세포독성제" 의 부분 집합으로서, 바람직하게는 종양 세포에 직접, 그리고 생물학적 반응성 개질과 같은 기작을 통해 덜 간접적인 방법으로 항-신생물 효과를 발휘하는 화학적 제제를 구체적으로 의미한다. 본 발명에 따른 적절한 화학요법제는 바람직하게는 천연 또는 합성 화학적 화합물이다. 판매용으로서, 임상적 시험에 있어서 및 예비 임상 개발에 있어서, 사용가능한 항-신생물 화학적 제제는 다수 존재하며, 이는 종양/신생물의 치료법으로서 본 발명에 기술 및 청구된 바와 같은 수용체 길항제와의 병용 치료법으로서 본 발명에 포함될 수 있다. 상기 화학요법제는 임의로 본 발명에 따른 상기 ErbB 수용체 길항제와 함께, 바람직하게는 상기 항-EGFR 항체와 함께 투여될 수 있음을 지적한다.

[0144] 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예컨대 질소 머스터드, 에틸렌이민 화합물, 알킬 술포네이트 및 알킬화 작용을 하는 다른 화합물, 예컨대 니트로소유레아, 시스플라틴 및 다카르바진; 항대사물질, 예컨대 엽산, 퓨린 또는 피리미딘 길항제; 유사분열 억제제, 예컨대 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 및 포도필로톡신의 유도체; 세포독성 항생제 및 캄프토테신(camptothecin) 유도체가 포함된다.

[0145] 바람직한 화학요법제는 아미포스틴(에티올), 시스플라틴, 다카르바진(DTIC), 닥티노마이신, 메클로레타민(질소 머스터드), 스트렙토조신, 시클로포스파미드, 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 독소루비신(아드리아마이신), 독소루비신 리포(독실), 겜시타빈(겜자르), 다우노루비신, 다우노루비신 리포(다우녹솜), 프로카르바진, 미토마이신, 사이타라빈, 에토포시드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실(5-FU), 빈플라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 파크리탁셀(탁솔), 도세탁셀(탁소티어), 알데스루킨, 아스파라기나아제, 부술판, 카르보플라틴, 클라드리빈, 캄프토테신, CPT-11,10-히드록시-7-에틸-캄프토테신(SN38), 게피티니브(Iressa), 다카르바진, 플록스우리딘, 플루다라빈, 히드록시유레아, 이포스파미드, 이다루비신, 메스나, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 이리노테칸, 미톡산트론, 토포테칸, 류프롤리드, 메게스트롤, 멜팔란, 메르캅토퓨린, 플리카마이신, 미토탄, 페가스파르가제(pegaspargase), 펜토스타틴, 피포브로만, 플리카마이신, 스트렙토조신, 타목시펜, 테니포시드, 테스토락톤, 티오구아닌, 티오테파, 우라실 머스터드, 비노렐빈, 클로람부실 및 이의 조합물이다.

[0146] 본 발명에 따른 가장 바람직한 화학요법제는 시스플라틴, 겜시타빈, 독소루비신, 파크리탁셀 (탁솔) 및 블레오마이신이다.

[0147] "항-혈관형성제" 는 혈관 발달을 어느 정도 차단 또는 방해하는 천연 또는 합성 화합물을 말한다. 항-혈관형성 분자는, 예컨대 혈관형성 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하여 이를 차단하는 생물학적 분자일 수 있다. 본 명세서에서 바람직한 항-혈관형성 분자는 수용체, 바람직하게는 인테그린 수용체 또는 VEGF 수용체에 결합한다. 상기 용어는 본 발명에 따라 상기 혈관형성제의 전구약물도 포함한다. 상기 용어는 또한 세포독성제, 바람직하게는 화학요법제로서 분류된, 상술한 바와 같이 유효한 제제를 포함한다.

[0148] 항-혈관형성 특성을 유도하는 상이한 구조 및 유래를 지닌 다수의 분자가 존재한다. 본 발명에 적합한, 혈관형성 억제 또는 차단제로서 가장 적절한 집단은, 예컨대 하기와 같다:

[0149] (i) 항-유사분열제, 예컨대 플루오로우라실, 마이토마이신-C, 탁솔;

[0150] (ii) 에스트로겐 대사물질, 예컨대 2-메톡시에스트라디올;

[0151] (iii) 아연 메탈로프로티나아제(메탈로프로테아제)를 억제하는 매트릭스 메탈로프로티나아제 (MMP) 저해제 (예컨대 베티마스타트, BB16, TIMP, 미노사이클린, GM6001, 또는 "Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications" (Golub, Annals of the New York Academy of Science, Vol.878a; Greenwald, Zucker Eds., 1999) 에 기재된 것들);

[0152] (iv) 항-혈관형성 다기능제 및 인자, 예컨대 IFNα (US 4,530,901; US 4,503,035; 5,231,176); 안지오스타틴 및 플라스미노겐 절편 (예컨대, 크린글 1- 4, 크린글 5, 크린글 1-3 (O'Reilly, M. S. 등, Cell (Cambridge, Mass.) 79(2): 315-328, 1994; Cao 등, J.Biol.Chem.271: 29461-29467, 1996; Cao 등, J.Biol.Chem 272: 22924-22928, 1997); 엔도스타틴 (O'Reilly, M. S. 등, Cell 88 (2), 277, 1997 및 WO 97/15666), 트롬보스폰딘 (TSP-1; Frazier, 1991, Curr Opin Cell Biol 3(5): 792); 혈소판 인자 4 (PF4);

[0153] (v) 플라스미노겐 활성화제/유로키나아제 억제제;

[0154] (vi) 유로키나아제 수용체 길항제;

[0155] (vii) 헤파리나아제 ;

[0156] (viii) 루마길린 유사체, 예컨대 TNP-470;

[0157] (ix) 티로신 키나아제 억제제, 예컨대 SU10. 다수의 상기 및 하기에 언급한 ErbB 수용체 길항제 (EGFR/HER2 길항제) 는 또한 티로신 키나아제 억제제이기도 하며, 따라서 종양 성장을 저해하는 항-EGF 수용체 차단 활성, 및 혈관 및 내피 세포의 발달을 각각 억제하는 항-혈관형성 활성을 나타낼 수 있다;

[0158] (x) 수라민 및 수라민 유사체;

[0159] (xi) 지혈 스테로이드;

[0160] (xii) VEGF 및 bFGF 길항제;

[0161] (xiii) VEGF 수용체 길항제, 예컨대 항-VEGF 수용체 항체(DC-101);

[0162] (xiv) flk-1 및 flt-1 길항제;

[0163] (xv) 시클로옥시게나아제-II 억제제, 예컨대 COX-II;

[0164] (xvi) 인테그린 길항제 및 인테그린 수용체 길항제, 예컨대 αv 길항제 및 αv 수용체 길항제, 예를 들어, 항-av 수용체 항체 및 RGD 펩티드. 본 발명에서는 Integrin (수용체) 길항제가 바람직하다.

[0165] "인테그린 길항제/억제제" 또는 "인테그린 수용체 길항제/억제제" 는 인테그린 수용체를 차단 및 억제하는 천연 또는 합성 분자를 의미한다. 일부의 경우, 상기 용어는 상기 인테그린 수용체의 리간드를 표적으로 하는 길항제를 포함한다(예컨대, $\alpha_v\beta_3$ 의 경우: 비트로넥틴, 피브린, 피브리노겐, von Willebrand 인자, 트롬보스폰딘, 라미닌; $\alpha_v\beta_5$ 의 경우: 비트로넥틴; $\alpha_v\beta_1$ 의 경우: 피브로넥틴 및 비트로넥틴; $\alpha_v\beta_6$ 의 경우: 피브로넥틴).

[0166] 본 발명에 따르면 상기 인테그린 수용체를 표적으로 하는 길항제가 바람직하다. 인테그린(수용체) 길항제는 천연 또는 합성 펩티드, 비-펩티드, 펩티도미메티카, 면역글로불린, 예컨대 항체 또는 이의 기능적 절편, 또는 면역접합체(융합 단백질)일 수 있다.

[0167] 본 발명의 바람직한 인테그린 억제제는 α_v 인테그린 (예컨대, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, 및 하위 집단) 의 수용체를 표적으로 한다. 바람직한 인테그린 억제제는 α_v 길항제, 특히 $\alpha_v\beta_3$ 길항제이다. 본 발명에 따른 바람직한 α_v 길항제는 RGD 펩티드, 펩티도모방(peptidomimetic)(비-펩티드) 길항제 및 항-인테그린 수용체 항체, 예컨대 항체 차단 α_v 수용체이다. 비면역학적 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 예는 US 5,753,230 및 US 5,766,591 에 개시되어 있다. 바람직한 길항제는 선형 및 환형 RGD-함유 펩티드이다. 환형 펩티드는 대체로 더 안

정하며, 증강된 혈청 반감기를 유도한다. 그러나, 본 발명의 가장 바람직한 인테그린 길항제는 시클로-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) (EMD 121974, Cilengitide®, Merck KgaA, Germany; EP 0770622) 으로서, 이는 인테그린 수용체 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ 을 차단하는 효과가 있다.

[0168] $\alpha_v\beta_3$/ $\alpha_v\beta_5$/ $\alpha_v\beta_6$ 인테그린 수용체의 적절한 펩티드성 및 펩티도-모방(비-펩티드) 길항제는 과학 문헌 및 특허 문헌 모두에 기재되어 왔다. 예를 들어, [Hoekstra and Poulter, 1998, Curr. Med. Chem. 5,195]; WO 95/32710; WO95/37655 ; WO 97/01540; WO 97/37655; WO 97/45137; WO 97/41844; WO 98/08840; WO 98/18460; WO 98/18461 ; WO 98/25892; WO 98/31359; WO 98/30542; WO 99/15506; WO 99/15507; WO 99/31061; WO 00/06169; EP 0853084; EP 0854140; EP0854145; US 5,780,426; 및 US 6,048,861 을 참조할 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서 사용하기에 적합한, 벤자제핀, 및 관련된 벤조디아제핀 및 벤조시클로헵텐 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체 길항제를 개시하는 특허에는, WO 96/00574, WO 96/00730, WO 96/06087, WO 96/26190, WO 97/24119, WO 97/24122, WO 97/24124, WO 98/15278, WO 99/05107, WO 99/06049, WO 99/15170, WO 99/15178, WO 97/34865, WO 97/01540, WO 98/30542, WO 99/11626, 및 WO 99/15508 이 포함된다. 백본의 형태적 고리 압박을 특징으로 하는 다른 인테그린 수용체 길항체는 WO 98/08840; WO 99/30709; WO 99/30713; WO 99/31099; WO 00/09503; US 5,919,792; US 5,925,655; US 5,981,546; 및 US 6,017,926 에 기재되어 있다. US 6,048,861 및 WO 00/72801 에 있어서 유력한 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체 길항제인 일련의 노난산(nonanoic acid) 유도체가 개시되어 있다. 기타 화학적 소분자 인테그린 길항제(대부분은 비트로넥틴 길항제)는 WO 00/38665 에 기재되어 있다. 다른 $\alpha_v\beta_3$ 수용체 길항제는 혈관형성을 억제하는 데 있어 유효한 것으로 나타났다.

[0169] 예를 들어, 합성 수용체 길항제, 예컨대 (S)-10,11-디히드로-3-[3-(피리딘-2-일아미노)-1-프로필옥시]-5H-디벤조[a,d]시클로헵텐-10-아세트산 (SB-265123 로서 공지됨) 은 다양한 포유류 모델 시스템에서 시험되었다 (Keenan 등, 1998, Bioorg. Med. Chem. Lett. 8(22), 3171; Ward 등, 1999, Drug Metab. Dispos. 27(11), 1232). 길항제로서 사용하기에 적합한 인테그린 길항제의 동정 분석법은, 예컨대 [Smith 등, 1990, J. Biol. Chem. 265,12267], 및 참조된 특허 문헌에 기재되어 있다.

[0170] 항-인테그린 수용체 항체 또한 공지되어 있다. 적절한 항-인테그린(예컨대, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$) 단일클론 항체는 $F(ab)_2$, Fab, 및 공학적 Fv 또는 단쇄 항체를 포함하여 이의 항원 결합 절편을 포함하도록 개질될 수 있다. LM609 가 적절하고도 인테그린 수용체 $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 단일클론 항체로서 바람직하게 사용되는 것으로서 확인되었다 (Brooks 등, 1994, 세포 79, 1157; ATCC HB 9537). 유력한 특이적 항-$\alpha_v\beta_5$ 항체인 P1F6 이 WO 97/45447 에 개시되었는 바, 이도 또한 본 발명에 있어서 바람직하다. 추가적으로 적절한 $\alpha_v\beta_6$ 선택적 항체는 MAb 14D9.F8 (WO99/37683, DSM ACC2331, Merck KGaA, Germany) 및 MAb 17.E6 (EP 0719 859, DSM ACC2160, Merck KGaA) 로서, 이들은 선택적으로 인테그린 수용체의 α_v-사슬을 표적으로 한다. 이 밖에 적절한 항-인테그린 항체는 시판 중인 Vitraxin® 이다.

[0171] 본원에서 사용되는 "항-호르몬제" 라는 용어는 종양에 대한 호르몬의 작용을 조절 또는 억제하는 역할을 하는 천연 또는 합성의 유기 또는 펩티드성 화합물을 포함한다. 좀더 상세하게, "항-호르몬제" 는 (1) 혈청 안드로겐의 제조를 억제하며, (2) 혈청 안드로겐이 안드로겐 수용체에 결합하는 것을 차단하거나, (3) 테스토스테론이 DHT 로 전환되는 것, 또는 2 이상의 그러한 화합물이 조합되는 것을 억제한다. 본 발명에 따른 항-호르몬제에는 일반적으로 스테로이드 수용체 길항제가 포함되며, 좀더 자세하게는 항-에스트로겐, 예컨대 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(Fareston); 및 항-안드로겐, 예컨대 플라타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 임의의 상기 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다. 상기 용어에는 또한 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체형성 호르몬(LH) 및 LHRH(황체형성 호르몬-분비 호르몬) 의 작용제 및/또는 길항제가 포함된다. 본 발명에 있어서 유용한 LHRH 작용제는 고세렐린 아세테이트로서, ZOLADEXⓒ (Zeneca)가 시판 중이다. 유용한 LHRH 길항제의 다른 예로는 GANIRELIXⓒ (Roche/Akzo Nobel)가 있다. 스테로이드성 항-안드로겐의 예로는 사이프로테론 아세테이트 (CPA) 및 메게스트롤 아세테이트가 있으며, MEGACE® (Bristol-Myers Oncology)가 시판 중이다. 스테로이드성 항-안드로겐은 전립선 안드로겐 수용체를 차단할 수 있다. 이들은 또한 LH 의 분비도 억제할 수 있다. CPA 는 바람직하게는 100 mg/일 내지 250mg/일의 투여량으로 인간 환자에게 투여된다. 비스테로이드성

항-안드로겐은 안드로겐 수용체를 차단한다. 이들은 또한 혈청 내 LH 수준 및 혈청 테스토스테론 수준을 상승시킬 수 있다. 바람직한 비스테로이드성 항-안드로겐은 플루타미드 (2-메틸-N-[4-20 니트로-3-(트리플루오로메틸)페닐 프로판아미드)로서, EULEXIN®(Sobering Corp.)이 시판 중이다. 플루타미드는 안드로겐 흡수를 억제하거나, 표적 조직에서 안드로겐의 핵 결합을 방해함으로써, 또는 둘 다로써 항-안드로겐 작용을 나타낸다. 또다른 비-스테로이드성 항-안드로겐은 닐루타미드로서, 이의 화학명은 5,5-디메틸-3-[4-니트로-3-(트리플루오로메틸-4'-니트로페닐)-4,4-디메틸-이미다졸리딘-디온이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 항-호르몬제는 류프롤리드 아세테이트와 같은 LHRH 길항제, 및 플루타미드 또는 닐루타미드와 같은 항안드로겐의 조합물이다. 예를 들어, 류프롤리드 아세테이트는 피하, 근육내 또는 정맥내 주사로 투여할 수 있으며, 동시에 플루타미드는 경구 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 항-호르몬제에는, 상기하였듯이, RAR, TR, VDR, 등에 대한 길항제와 같은 다른 비허용(non-permissive) 수용체에 대한 길항제를 포함하여, 스테로이드/갑상선 호르몬 수용체가 포함된다. 다수의 레틴산 수용체(RAR) 길항제(합성 및 천연 모두)를 본 발명에 따라 사용할 수 있음은 당업자라면 쉽게 알 수 있다.

[0172] 요컨대, 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 키트는 바람직하게는 하기 약물 조합을 포함할 수 있다:

[0173] (i) 상기 EGF 수용체의 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 두 개의 상이한 단일클론 항체 (MAb), 이의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0174] (ii) 각각 상기 EGF 수용체의 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 MAb 425 및 MAb 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0175] (iii) 각각 상기 EGF 수용체의 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 인간화된 MAb 425 및 키메라화된 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0176] (iv) 하나 이상의 세포독성제와 조합된 (i) 내지 (iii).

[0177] (v) 하나 이상의 화학요법제, 바람직하게는 시스플라틴, 겜시타빈 또는 탁솔과 조합된, (i) 내지 (iii), 특히 마우스, 키메라 또는 인간화 버전의 MAb 425 및 MAb 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0178] (vi) 또 다른 ErbB 길항제와 조합된, (i) 내지 (iii), 특히 마우스, 키메라 또는 인간화 버전의 MAb 425 및 MAb 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0179] (vii) ErbB-2, 바람직하게는 Herceptin®, 또는 ErbB-3, ErbB-4 와 조합된, (i) 내지 (iii), 특히 마우스, 키메라 또는 인간화 버전의 MAb 425 및 MAb 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인).

[0180] (viii) 하기 군으로부터 선택되는 약물과 조합된, (i) 내지 (iii), 특히 마우스, 키메라 또는 인간화 버전의 MAb 425 및 MAb 225 또는 이들의 절편 또는 면역접합체 (바람직하게는 면역사이토카인):

[0181] • 티로신 키나아제 억제제, 예컨대 Iressa®;

[0182] • 항-혈관형성제, 바람직하게는 인테그린 억제제, 더욱 바람직하게는 RGD 펩티드, 환형 펩티드, 예컨대 시클로-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal)(Cilengitide®, Merck KGaA)이 포함된다;

[0183] • 항-VEGF 수용체 항체, 예컨대 DC-101, 또는 VEGF 길항제;

[0184] • COX-Ⅱ 억제제;

[0185] • 사이토카인, 예컨대 TNF-α, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-2;

[0186] • 유형 I 단백질 키나아제 A (PKAI) 억제제, 예컨대 HYB 165 와 같은 혼합 백본 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, Tortora 등, 1999, Clin. Cancer Res., 875-881 참조);

[0187] • 항-호르몬제, 예컨대 고세렐린, 보세렐린, 류프로렐린, 타목시펜.

[0188] "암" 및 "종양" 이란 포유류에 있어서 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 생리학적 상태를 가

리키거나 또는 묘사한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물에 의해 유방, 심장, 폐, 소장, 결장, 비장, 신장, 방광, 두부 및 경부, 난소, 전립선, 뇌, 이자, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 고환, 자궁경부, 및 간의 종양과 같은 종양들을 치료할 수 있다. 더욱 구체적으로, 종양은 선종(adenoma), 혈관육종(angio-sarcoma), 성상세포종, 상피 암종, 배아종, 아교모세포종, 신경아교종, 과오종, 혈관내피종, 혈관육종(hemangiosarcoma), 혈종, 간모세포종, 백혈병, 림프종, 속질모세포종, 흑색종, 신경모세포종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종 및 기형종으로 이루어진 군에서 선택된다. 구체적으로, 종양은 말단 흑자 흑색종, 광선 각화증, 샘암종, 샘낭암종, 샘종, 선육종(adenosarcoma), 선편평상피암종(adenosquamous carcinoma), 별아교세포성 종양(astrocytic tumor), 바르톨린선암, 기저세포암종, 기관지샘암종, 모세혈관, 유암종(carcinoids), 암종, 암육종, 해면(cavernous), 쓸개관암종, 연골육종, 맥락막총유두종/암종, 투명세포암종, 낭샘종, 내배엽동 종양, 자궁내막증식증, 자궁내막기질육종, 자궁내막모양샘암종, 뇌실막, 상피양(epitheloid), 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 섬유층판형(fibrolamellar), 국소 결절성 과식증(focal nodular hyperplasia), 가스트린종, 생식세포종양, 아교모세포종, 글루카곤종, 혈관모세포종, 혈관내피종, 혈관종, 간샘종, 간샘종증(hepatic adenomatosis), 간세포암종, 인슐린종, 상피내종양, 상피간 편평세포 신생물, 침습 편평세포 암종, 대세포암종, 평활근육종, 악성흑자 흑색종, 악성흑색종, 악성 중피세포 종양, 수모세포종, 수질상피종, 흑색종, 수막(meningeal), 중피세포, 전이암종, 점액표피양 암종, 신경모세포종, 신경상피 선암종 소결절 흑색종(neuroepithelial adenocarcinoma nodular melanoma), 귀리세포암종, 올리고수상돌기아교세포(oligodendroglial), 골육종, 이자 폴리펩티드, 유두장액샘암종(papillary serous adenocarcinoma), 송과체 세포, 뇌하수체 종양, 형질세포종, 가성육종(pseudo-sarcoma), 폐모세포종(pulmonaryblastoma), 신세포암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 장액암종(serous carcinoma), 소세포암종, 연조직암종, 소마토스타틴 분비종양, 편평 암종(squamous carcinoma), 편평세포 암종(squamous cell carcinoma), 하부중피세포성(submesothelial), 얕은 확산 악성흑색종(superficial spreading melanoma), 미분화암종, 포도막 흑색종, 점액암종(vermucous carcinoma), VIP 종(vipoma), 고등도분화암종(well differentiated carcinoma), 및 윌름 종양(Wilm's tumor)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0189] 본 발명에 따른 항체 분자에 의해 양호하게 치료할 수 있는 종양은 ErbB 수용체, 특히 ErbB1 수용체를 많은 양으로 발현시키는 고형 종양 또는 종양 전이로서, 유방암, 전립선암, 두부 및 경부암, SCLC, 췌장암 등이 있다.

[0190] "생물학적/기능적으로 유효한(biologically/functionally effective)" 또는 "치료적으로 유효한 (양)" 이란 생체내 또는 시험관내에서 생물학적 기능 또는 생물학적 기능의 변화를 유발하고, 포유류, 바람직하게는 인간의 질병 또는 장애를 치료하기에 특정량만큼 유효한 약물/분자를 일컫는다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암세포의 수의 감소; 종양의 크기 감소; 주변 조직으로의 암세포의 침윤 억제(즉, 어느 정도 느리게, 바람직하게는 완전히 정지시킴); 종양 전이의 억제(즉, 어느 정도 느리게, 바람직하게는 완전히 정지시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제; 및/또는 암에 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 어느 정도 기존의 암세포의 성장을 막고/막거나 암세포를 죽이면, 이는 세포증식억제제 및/또는 세포독성제라고 할 수 있다. 암치료를 위하여, 예컨대 질병의 전개 시간을 측정(TTP)하고/하거나 반응 속도(RR)를 측정함으로써 효능을 측정할 수 있다.

[0191] "면역치료적으로 유효한(immunotherapeutically effective)" 은 포유류에 있어서 면역 반응을 일으키는 생물학적 분자를 일컫는다. 더 구체적으로, 상기 용어는 항원을 인식하여 결합할 수 있는 분자를 의미한다. 전형적으로는, 항체, 항체 절편 및 항원 결합 부위(상보성 결정 영역, CDR)를 포함하는 항체 융합 단백질이 면역치료적으로 유효하다.

[0192] "방사선 치료법" : 본 발명에 따르면, 종양은 추가적으로 방사선 또는 방사선약물로 치료될 수 있다. 방사선의 원천은 치료받는 환자에 대하여 외인성(external) 또는 내인성(internal)일 수 있다. 상기 원천이 환자에 대하여 외인성인 경우, 그 치료법은 외부 방사선빔 치료법(EBRT)으로서 공지되어 있다. 방사선 원천이 환자에 대하여 내인성인 경우, 그 치료법은 근접 치료법(BT)으로 불린다. 사용된 몇가지 전형적인 방사성 원소에는 라듐, 세슘-137, 및 이리듐-192, 아메리슘(americium)-241 및 금-198, 코발트-57; 구리-67; 테크네튬(Technetium)-99; 요오다이드-123; 요오다이드-131; 및 인듐-111 이 포함된다. 본 발명에 따른 제제를 방사성 동위원소로 라벨링하는 것도 가능하다. 오늘날 방사선 치료법은 잘라내거나 수술이 불가능한 종양 및/또는 종양 전이를 제어하는 표준 치료법이다. 방사선 치료법을 화학요법과 병행하면 개선된 결과를 나타냈다. 방사선 치료법은, 고용량의 방사선을 표적 부위에 가하면 종양과 정상 조직 모두의 재생산 세포가 사멸한다는 원리에 기초한다. 방사선 용량의 처방은 일반적으로 방사선 흡수 용량(rad), 시간 및 분할조사

(fractionation)에 의해 구체화되며, 이는 종양학자에 의해 조심스럽게 결정되어야 한다. 환자에게 투여되는 방사선량은 다양한 조건에 따라 다르나, 두 가지 가장 중요한 고려사항은 신체의 다른 주요 구조 또는 기관과의 관계에서 종양의 위치, 및 종양이 확산되는 정도이다. 방사선 치료 중인 환자를 위한 바람직한 치료 과정은, 5 내지 6 주에 걸쳐, 1 주일에 5 일씩, 1일 1회 1.8 내지 2.0 Gy 의 분할조사로 환자에게 총 50 내지 60 Gy 를 투여하는 치료 계획이 될 것이다. Gy 는 Gray 의 약자로서 100 rad 양을 나타낸다. 방사선 투여계획과 관련하여 본 발명에 기재된 항-ErbB 항체를 사용하여 종양을 치료하는 경우, 보통은 긍정적인, 심지어는 시너지 효과를 관찰할 수도 있다. 다시 말해, 방사선 및/또는 화학요법제와 병용할 경우 상기 화합물에 의한 종양 성장의 억제 효과가 증대된다. 방사선 치료법은 본 발명에 따라 임의로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 제제를 충분한 양으로 환자에 투여할 수 없을 경우 상기 방법이 추천되며, 바람직하다.

[0193] "약학적 치료법": 본 발명의 방법은 여러 단계에 의해 본 발명을 수행하기 위한 다양한 형태를 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 제제를 동시에, 순차적으로, 또는 별도로 투여할 수 있다. 또한, 상기 제제를, 투여 사이에 약 3 주간의 시간 간격 내에, 즉 실질적으로 첫 번째 활성 제제를 투여한 직후로부터 첫 번째 제제를 투여한 후 약 3 주까지의 기간 내에 별도로 투여할 수 있다. 상기 방법을 외과적 처리 후에 수행할 수 있다. 다르게는, 외과적 처리를 첫 번째 활성 제제 및 두 번째 활성 제제의 투여 사이의 간격 동안 수행할 수 있다. 상기 방법의 예는 본 발명의 방법과 외과적 종양 제거의 조합이다.

[0194] 본 방법에 따른 치료법은 통상적으로 하나 이상의 투여 사이클 내에 체료적 조성물을 투여하는 것을 포함하게 된다. 예를 들어, 동시 투여를 수행할 경우, 두 제제를 모두 포함하는 치료적 조성물을 단일 사이클 내에서 약 2 일 내지 약 3 주의 기간에 걸쳐 투여한다. 그 후, 임상 내과의의 판단에 따라 필요한 경우 치료 사이클을 반복할 수 있다. 유사하게, 순차적 적용을 도모하는 경우, 각 개별적인 치료제의 투여 시간은 통상적으로 동일한 기간에 걸치도록 조절될 수 있다. 사이클 간격은 약 0 내지 2 달로 다양할 수 있다.

[0195] 본 발명의 제제는 주사에 의해 비경구적으로 또는 일정 기간에 걸쳐 점차적인 주입에 의해 투여할 수 있다. 비록 치료할 조직은 대체로 신체상에서 전신 투여에 의해 접근가능하므로 대부분 치료적 조성물의 정맥내 투여에 의해 치료할 수 있지만, 표적 세포가 표적 분자를 함유할 가능성이 있는 경우 다른 조직 및 전달 수단을 고려한다. 따라서, 본 발명의 제제는 눈속, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 피하, 공동내(intracavity), 경피, 동일자리(orthotopic) 주사 및 주입에 의해 투여할 수 있으며, 연동(peristaltic) 수단에 의해 전달할 수도 있다. 예컨대, 본 발명의 인테그린 길항제를 함유하는 치료적 조성물은 통상적으로, 예컨대 단일 용량의 주사에 의해 정맥내로 투여된다.

[0196] 본 발명의 치료적 조성물은 활성 성분으로서 용해 또는 분산된, 본원에 기재된 바와 같은 관련 제제와 함께 생리학적으로 용인되는 담체를 함유한다.

[0197] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는" 이란 용어는 메스꺼움, 현기증, 급성위연동이상항진 등과 같은 바람직하지 않은 생리학적 반응을 유발함이 없이 포유류 내에 또는 표면에 투여될 수 있는 물질을 나타내는 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 의미한다. 내부에 용해 또는 분산된 활성 성분을 함유하는 약리학적 조성물의 제조는 당업계에 공지되어 있으며, 제형에 의해 제한될 필요가 없다. 통상적으로, 상기 조성물은 용액 또는 현탁액으로서 주사용으로 제조되나, 사용전에 액체내의 용액 또는 현탁액용으로 적합한 고체 형태를 제조할 수도 있다. 상기 제조물을 유화시킬 수도 있다. 활성 성분을, 약학적으로 허용되고 상기 활성 성분과 양립가능하며 본원에 기재된 치료 방법에 있어서 사용하기에 적합한 양으로 존재하는 부형제와 함께 혼합할 수 있다.

[0198] 적절한 부형제는, 예컨대 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이의 조합물이다. 또한, 필요에 따라, 상기 조성물은 활성 성분의 효능을 증강시키는 미량의 보조 물질, 예컨대 습윤 또는 유화제, pH 완충제 등을 함유할 수 있다. 본 발명의 치료적 조성물은 그 내부에 상기 성분의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염에는, 예컨대, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 함께 형성되는 산부가염(폴리펩티드의 유리 아미노기와 함께 생성됨)이 포함된다. 유리 카르복실기와 함께 형성되는 염은 또한 무기 염기, 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철 히드록시드, 및 유기 염기, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등에서 유래될 수 있다. 환형 폴리펩티드 αv 길항제의 제조에 있어서는 HCl 염이 특히 바람직하다. 생리학적으로 용인되는 담체는 당업계에 공지되어 있다. 액체 담체의 예로는, 활성 성분 및 물 이외에 추가적 물질을 함유하지 않거나, 또는 생리적 pH 값의 소디움 포스페이트, 생리식염수와 같은 완충액 또는 포스페이트-완충 식염수와 같이 둘 다를 포함한 완충액을 함유하는 멸균 수용액이 있다.

[0199] 또한, 수성 담체는 하나 이상의 완충염 뿐만 아니라 염화나트륨 및 염화칼륨, 덱스트로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 기타 용질과 같은 염들을 함유할 수 있다. 액체 조성물은 또한 물에 더하여 및 물을 제외하고 액상을 포함할 수 있다. 상기 추가적인 액상의 예에는 글리세린, 식물성유, 예컨대 목화씨 오일, 및 물-오일 에멀젼이 있다.

[0200] 통상적으로, 예컨대 ErbB(ErbB1) 수용체 차단 2특이적 항체, 인테그린 수용체 차단 항체 또는 항체 절편 또는 항체 접합체 또는 항-VEGF 수용체 차단 항체, 절편 또는 접합체 형태의 면역치료적 제제의 치료적 유효량은, 생리학적으로 용인되는 조성물에 투여되었을 때, 혈장 농도가 약 0.01 ㎍/ml 내지 약 100 ㎍/ml, 바람직하게는 약 1 ㎍/ml 내지 약 5 ㎍/ml, 통상적으로는 약 5 ㎍/ml 이 되기에 충분한 양이다. 다시 말해, 상기 투여량은 1 일 이상의 기간 동안 1 일 1 회 이상의 투여량에 있어서, 약 0.1 mg/kg 내지 약 300 mg/kg, 바람직하게는 약 0.2 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 가장 바람직하게는 약 0.5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 로 다양할 수 있다. 상기 면역치료제가 단일클론 항체의 절편 또는 접합체의 형태인 경우, 그 양은 전체 항체의 질량에 대한 절편/접합체의 질량을 기초로 쉽게 조절할 수 있다. 바람직한 혈장의 몰 농도는, 항체 길항제 약 ㎛M 내지 약 5 mM, 바람직하게는 약 100 ㎛M 내지 1 mM 이다.

[0201] 비면역치료적 펩티드 또는 단백질 폴리펩티드 또는 기타 유사 크기의 생물학적 분자인, 본 발명에 따른 제제의 치료적 유효량은, 통상적으로 생리학적으로 용인되는 조성물 내에 투여되었을 때 약 0.1 ㎍/ml 내지 약 200 ㎍/ml, 바람직하게는 약 1 ㎍/ml 내지 약 150 ㎍/ml 의 혈장 농도가 되기에 충분한 폴리펩티드의 양이다. 질량이 약 500 g/mole 인 폴리펩티드를 기준으로, 바람직한 혈장의 몰 농도는 폴리펩티드 길항제 약 2 ㎛M 내지 약 5 ㎛M, 바람직하게는 약 100 ㎛M 내지 1 mM 이다.

[0202] 바람직하게는 본 발명에 따른 화학적 세포독성제 또는 화학요법제인 (면역치료제 또는 비면역치료적 펩티드/단백질이 아님) 활성 제제의 통상적 투여량은, 체중(kg)당 1 일 10 mg 내지 1000 mg, 바람직하게는 약 20 내지 200 mg, 더욱 바람직하게는 50 내지 100 mg 이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 예를 들어 항암 약물, 예컨대 뼈흡수 억제제, 심장보호제의 독성 효과를 감소시키는 제제를 포함하는 (그러나 이에 제한되지는 않음), 본 발명의 병용 치료법 ("보조 치료법") 과 관련된 부작용을 감소 또는 방지시키는 제제로 피검자를 치료하는 것을 포괄하는 것을 포함할 수 있다. 상기 보조 제제는 화학치료법, 방사선치료법 또는 수술과 관련되 메스꺼움 및 구토의 발생을 방지하거나 줄이거나, 또는 골수억제 항암 약물의 투여와 관련된 감염의 발생을 줄여준다. 보조 제제는 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에 따른 면역치료적 제제는 추가적으로 BCG 및 면역 시스템 자극제와 같은 보조제와 함께 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 세포독성 유효 방사성-라벨링 동위원소, 또는 기타 세포독성제, 예컨대 세포독성 펩티드(예컨대, 사이토카인) 또는 세포독성 약물 등을 함유하는 면역치료적 제제 또는 화학요법제를 포함할 수 있다.

[0203] 종양 또는 종양 전이의 치료용 "약학적 키트" 는 포장품 및, 종양 및 종양 전이의 치료 방법에 있어서 시약의 사용에 관한 지시 사항(대체로 포함됨)을 말한다. 본 발명의 키트에 포함된 시약은 통상적으로 본원에서 기재된 치료적 조성물로서 제조되며, 따라서 키트로 배포하기에 적합한 임의의 다양한 형태일 수 있다. 그러한 형태는 본 발명의 약학적 분자, 바람직하게는 항-ErbB1 항체를 제공하기 위한 액체, 분말, 정제, 현탁액 등이 포함한다. 상기 시약은 본 발명에 따라 별도로 투약하기에 적합한 독립된 용기에 제공되거나, 또는 다르게는 포장품 내 단일 용기에 조성물로서 배합하여 제공될 수도 있다. 상기 포장품은 본원에 기재된 치료 방법에 따라 하나 이상의 용량의 시약에 적합한 양을 함유할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 포장품 내 포함된 물질의 "사용 설명서" 를 포함할 수 있다.

실 시 예

[0209] **실시예 1:**

[0210] *상이한 에피토프 특이성을 가진 두 개의 EGFR-차단 항체 (Cetuximab, EMD 72 000) 를 조합하여 세포당 기준으로 항체 결합 증가.*

[0211] 상이한 EGFR 수준을 나타내는, 음문의 편평세포암종 (epidermoid carcinoma) (A431), 난소의 선암 (adenocarcinoma) (SK-OV-3), 결장 암종 (HCT 116), 췌장 암종 (MiaPaca-2) 및 식도 암종 (KYSE-30, KYSE-70) 으로부터 유래한 6 개의 EGFR 양성 인간 종양 세포주를, 10 ㎍/㎖ 의 Cetuximab 또는 EMD 72 000 각각, 또는 최종적으로 2.5 ㎍/㎖ 의 Cetuximab 및 2.5 ㎍/㎖ 의 EMD 72 000 을 함유한 혼합물 (총 MAb 농도: 5 ㎍/㎖) 과 함께, 얼음 상에서 15 분간 인큐베이션하였다. 이 후, 세포를 세정하고, 제 2 단계 시약으로서의 20 ㎍/㎖ 의 FITC 표지된 염소 항-인간 IgG+IgM(H+L)-F(ab')$_2$ 와 함께 얼음 상에서 15 분간 더 인큐베이션하였다. 세

정 후, 세포를 유세포검사로, 형광 강도를 분석하였는데, 형광 강도는 세포당 결합되는 항체의 양에 대략 상응한다. 나타난 바와 같이, 항체 혼합물에 사용된 감소된 염색 농도와 무관하게, 이 혼합물로 염색된 세포의 형광 강도는 모든 경우, 보다 높은 농도로의 상기 두 항체 중 하나만으로 염색된 세포의 형광 강도보다 더 컸다 (도 1).

[0212] **실시예 2:**

[0213] *항체-의존 세포-매개 세포독성의 필요조건으로서의 효과기-표적 세포 응집 및 인간 EGFR 의 상이한 에피토프들에 대한 특이성을 가진 두 항체 (Cetuxinzab and EMD 72 000) 의 조합에 의한 이의 향상.*

[0214] 이 모델 실험에서, EGFR 양성 A431 세포를 표적 세포로 사용하였다. EGFR 음성의, Fc-감마 수용체 (CD64 (FcγRI) 및 CD32(FcγRII)) 양성 U937 조직구림프종 (histiocytic lymphoma) 세포를 사용하여 효과기 세포를 모방하였다. A431 세포를 녹색 PKH2 로, U937 세포를 홍색 PKH26 으로 형광 표지하였다. 이 후, 두 세포주들을 3:1 의 효과기-표적 세포비로 혼합하고, 순차 희석된 (최종 농도: 4.74 - 0.0015 ㎍/㎖ = $3.16x10^{-8}$ - $1x10^{-11}$ M, 두 항체에 대하여 150 kDa 의 MW 로 계산한 것임) Cetuximab 및 EMD 72 000 각각과 함께, 또는, 전체 면역글로불린 농도의 1/2 를 함유하는 두 항체들의 혼합물의 순차 희석물 (2.37 - 0. 00075 ㎍/㎖ = $1.58x10^{-8}$ - $5x10^{-12}$ M; 이 혼합물에서 상기 MAb 각각의 농도는 이 농도의 1/2 임) 과 함께 얼음 상에서 15 분간 인큐베이션하였다. 50 xg 및 4 ℃ 에서 5 분간 원심분리한 후, 세포를 펠렛을 파괴하지 않고 60 분간 추가로 인큐베이션하였다. 최종적으로, 펠렛을 조심성있게 재현탁하고, FACScan 기구를 사용한 유세포검사로 응집체의 비율을 측정하였다.

[0215] 도 2 에 나타난 바와 같이, 하나의 단일 항체와만 인큐베이션된 세포로부터의 결과와 비교할 때, 응집체의 최대 비율은, 총 단백질 농도가 좀 더 낮은 두 MAb 의 혼합물과 인큐베이션된 시료들에서 증가한다. 상기 항체 혼합물에 대한 적정 곡선의 증가 부분은 MAb 중 단 하나와 인큐베이션된 시료들과 비교할 때, 이들 시료들에서 단백질 농도가 감소되었음에도 불구하고, 유의미하게 대체되지 않는다.

[0216] **실시예 3:**

[0217] *EGFR 리간드-결합 도메인의 상이한 에피토프들을 표적으로 하는 2 개 항체의 혼합물에 의한 A431 종양 세포에 대한 EGF 결합 저해 강화.*

[0218] A431 세포를 0.5 ㎍/㎖ 의 EMD 72 000, Cetuximab 또는 동일 농도의 이들 두 항체의 혼합물과 함께 15 분간 예비인큐베이션하였다. 결합하지 않은 항체를 세정으로 제거한 후, 세포를 0.01, 0.1, 1 또는 10 ㎍/㎖ 의 마우스 악하선 (submaxillary gland) 으로부터의 FITC-표지된 EGF (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) 와 함께 얼음 상에서 15 분간 추가로 인큐베이션한 후, 세정하고, 유세포검사로 분석하였다.

[0219] 두 항체 모두 모든 농도의 EGF-FITC 의 결합을 강하게 저해하였다. 그러나, 두 항체의 혼합물은 모든 경우, 두 항체 중 하나만으로보다 좀 더 효과적이었다 (도 3).

[0220] **실시예 4:**

[0221] *A431 세포의 EGFR 로부터의 결합된 EGF 치환.*

[0222] A431 세포를 10 ㎍/㎖ 의 FITC-표지된 마우스 악하선으로부터의 EGF (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) 와 함께 15 분간 예비 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 세정하고, 10, 1 또는 0.1 ㎍/㎖ 의 EMD 72 000 또는 Cetuximab 각각, 또는 with a mixture of 2.5, 0.25 또는 0.025 ㎍/㎖ 의 두 항체 모두의 혼합물 (총 면역글로불린 농도: 5, 0.5 또는 0.05 ㎍/㎖) 과 함께 15 분간 인큐베이션하였다. 세포를 그 후 세정하고, 유세포검사로 결합된 EGF-FITC 에 대하여 분석하였다.

[0223] 농도-의존적 방식에서 단일 제제로서의 두 항체 모두 A431 세포의 EGFR 로부터 EGF 를 치환시켰다. 두 항체의 혼합물은, 각 MAb 의 항체 농도의 1/4 (총 면역글로불린의 1/2) 만을 함유하였는데, 보다 높은 농도의 두 항체 각각 보다 FITC-표지 리간드의 치환에 유사하게 효과적이었다.

[0224] **실시예 5:**

[0225] *상이한 수용체 에피토프를 표적으로 하는 2 개 이상의 항체의 혼합물에 의한 EGFR 의 하향-조절, 그러나 A431 세포를 MAb 와 함께 24 시간동안 배양한 후의, 하나의 단일 항체에 의한 세포 표면 EGFR 수준의 무감소 또는 단지 소량의 감소.*

[0226] 10% FCS (소태아혈청)을 함유한 2.5 ㎖ 배지 중의 $2x10^6$ A431 세포를 6-웰 마이크로플레이트의 웰들에 도포하였다. 항체들 (Cetuximab, EMD 72 000) 을 상기 배양물에 최종농도 10 ㎍/㎖ 로 첨가하였다. 두 항체의 혼합물을 각 항체에 대하여 10 ㎍/㎖ (혼합물 1) 또는 5 ㎍/㎖ (혼합물 2) 의 최종농도로 사용하였는데, 그 결과, 각각 총 항체 농도가 20 및 10 ㎍/㎖ 가 되었다. 세포를 그 후, 상기 항체들의 존재하에서, 37 ℃ 및 10% CO_2 에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포들을 트립신/EDTA (0.05/0.2 %) 처리로 수확하고, 세정 후, 표면-결합 항-EGFR 항체 검출용 제 2 단계 시약으로서 20 ㎍/㎖ FITC-표지 염소 항-인간 IgG+IgM(H+L)-$F(ab')_2$ 또는 EMD 72 000 에 대한 유리된 무-점유의 결합 부위에 대한 검출용의 10 ㎍/㎖ 의 FTTC-표지된 MAb425 (EMD 72 000 의 마우스 전구체) 둘 중 하나와 함께 얼음 상에서 15 분간 인큐베이션하였다. 최종적으로, 세포를 유세포검사로 분석하였다. 도 5 는 EMD 72 000 및 이의 마우스 전구체 MAb425 는 EGFR 상의 이들의 에피토프들에 대한 결합에 있어서 경쟁하며, 상기 예비-결합된 EMD 72 000 는 MAb425-FITC 의 결합을 거의 완전히 저해할 수 있다. 이와 반대로, 예비 결합된 Cetuximab 는, 미처리된 대조군 세포들과 비교하여, MAb425-FITC 의 결합을 단지 극미하게 저해한다. 이는 두 항체 모두 EGFR 의 별개의 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.
나아가, 이 도면은 두 농도의 항체 혼합물의 존재하에서의 24 시간동안의 세포 배양 후, 표면-결합 항체의 검출을 위해 사용된 FITC-표지된 제 2 단계 시약이 명백히 감소한 것을 보여준다.

[0227] 이는 상기 항체 혼합물로 처리된 세포의 표면 EGFR 수준이 상기 항체 중 단 하나 만으로 배양된 세포와 비교할 때, 명백히 감소된 것을 보여준다. 따라서, MAb 혼합물에 의하여 형성된 좀 더 거대한 수용체-항체 복합체는 하나의 항체 분자로 가교된 후 단지 두 수용체로 이루어진 작은 수용체-항체 복합체와는 다른 기작으로 내입 및/또는 처리되는 것으로 보인다.

도면의 간단한 설명

[0204] 도 1 은 상이한 암세포 (A431, SK-OV3, HCT 116, MiaPaca-2, KYSE-30, KYSE-70) 에 대한 MAb 425 (EMD 72000) 및 c225 (Cetuximab) 의 단독 결합 및 조합적 결합을 유세포검사 (flow cytometry) 로 측정한 것을 기술한다.

[0205] 도 2 는 효과기 표적 세포 응집의 상기 항체 농도에 대한 의존성을 나타낸다 (MAb 425, MAb 225, 또는 이들의 혼합물).

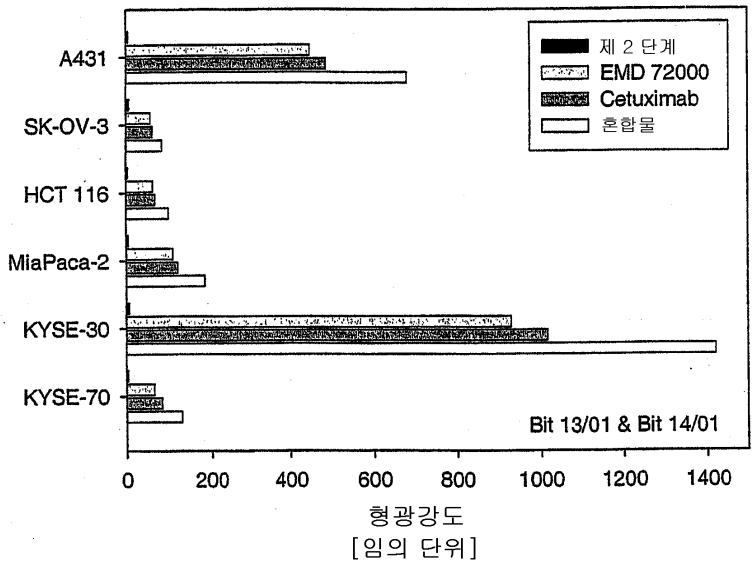
[0206] 도 3 은 MAb 425, MAb 225, 또는 이들의 혼합물에 의한, A431 종양 세포에 대한 EGF 결합 저해를 보여준다.

[0207] 도 4 는 MAb 425, MAb 225, 또는 이들의 혼합물에 의한, A431 암 세포에 대한 결합 EGF 의 치환을 나타낸다.

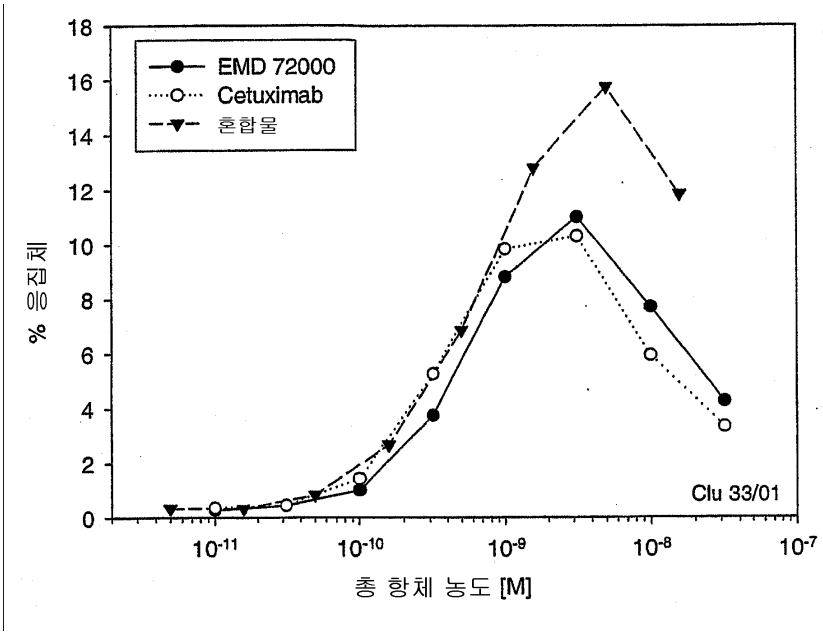
[0208] 도 5 는 인간화 MAb 425 (EMD 72000) 및 키메라화 MAb 225 의 혼합물에 의한 A431 세포 상의 EGF 수용체의 하향-조절을 보여준다.

도면

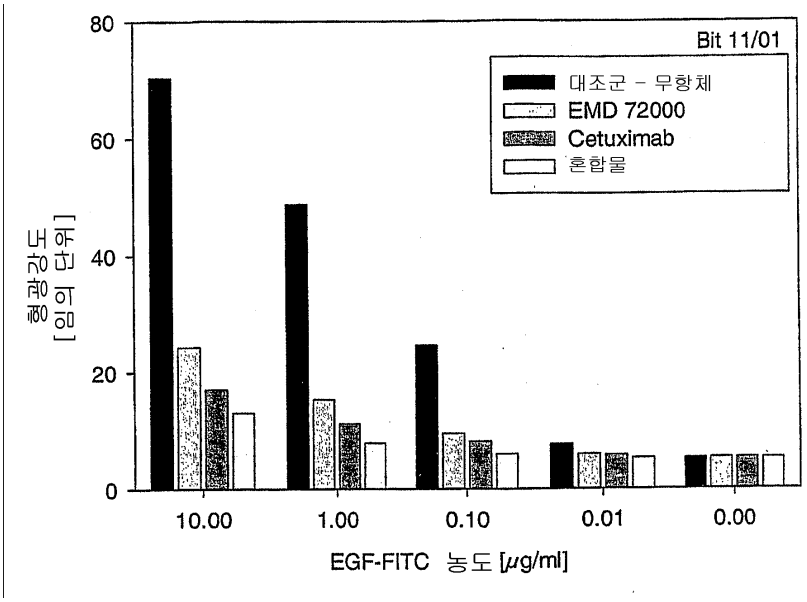
도면1


A431
SK-OV-3
HCT 116
MiaPaca-2
KYSE-30
KYSE-70
제 2 단계
EMD 72000
Cetuximab
혼합물
Bit 13/01 & Bit 14/01
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
형광강도
[임의 단위]

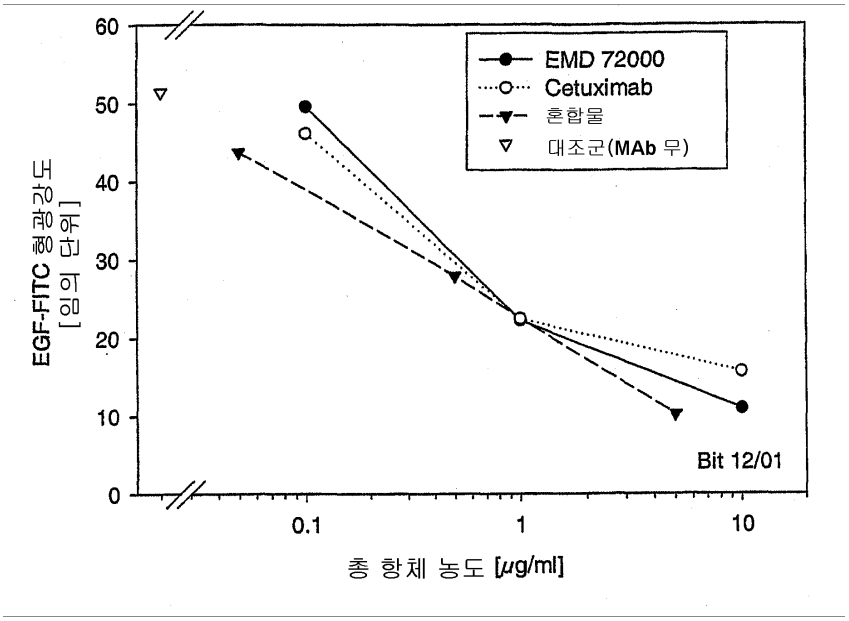
도면2


EMD 72000
Cetuximab
혼합물
% 응집체
Clu 33/01
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
총 항체 농도 [M]

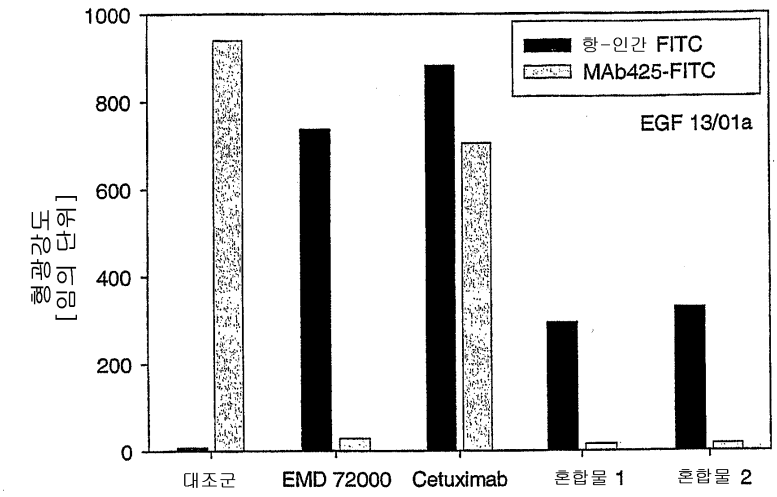
도면3


Bit 11/01
대조군 - 무항체
EMD 72000
Cetuximab
혼합물
형광강도 [임의 단위]
80
60
40
20
0
10.00
1.00
0.10
0.01
0.00
EGF-FITC 농도 [μg/ml]

도면4


EMD 72000
Cetuximab
혼합물
대조군(MAb 무)
EGF-FITC 형광강도 [임의 단위]
60
50
40
30
20
10
0
Bit 12/01
0.1
1
10
총 항체 농도 [μg/ml]

도면5


1000
800
600
400
200
0
형광강도
[임의 단위]
항-인간 FITC
MAb425-FITC
EGF 13/01a
대조군
EMD 72000
Cetuximab
혼합물 1
혼합물 2