



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0009637

(43) 공개일자 2007년01월18일

(21) 출원번호 10-2006-7021955

(22) 출원일자 2006년10월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년10월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/009939

(87) 국제공개번호 WO 2005/092073

국제출원일자 2005년03월24일

국제공개일자 2005년10월06일

(30) 우선권주장 60/556,421 2004년03월24일 미국(US)  
60/556,422 2004년03월24일 미국(US)  
60/625,049 2004년11월03일 미국(US)  
60/651,098 2005년02월07일 미국(US)  
60/657,514 2005년02월28일 미국(US)

(71) 출원인 피디엘 바이오파르마 인코포레이티드  
미국, 캘리포니아 94555, 프레몬트, 34801 캠퍼스 드라이브

(72) 발명자 라마크리쉬난, 바니타  
미국 캘리포니아주 94002 벨몬트 홀리 로드 825  
바스카 비네이  
미국 캘리포니아주 94114 샌프란시스코 클리퍼 스트리트 534  
호 선  
미국 캘리포니아주 94536 프레몬트 블랙 마우틴 씨클 208  
머레이 리차드  
미국 캘리포니아주 95014 쿠퍼티노 우드리지 코트 22643  
로우 데이비  
미국 캘리포니아주 94080 샌프란시스코 파체코 스트리트 822

(74) 대리인 강승옥  
김성기

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 암 세포 증식을 억제하는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 용도

(57) 요약

본 발명은 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 사용하여 암 세포를 직접 사멸하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 본 방법은 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암 세포와 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 접촉시켜 암 세포의 사멸을 유도하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법은 초기 암 진행

단계에 있는 환자에 있어서 종양의 확립을 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 방법은 이미 형성된 종양, 특히 항 신생혈관생성 치료법에 영향을 받는 것으로 입증되지 않은 암을 치료하는데에 사용될 수 있다. 본 방법은 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 치료법과 암 화학요법 제제 또는 기타 분자계 암 치료제와 병용하여 수행될 수 있다.

## 대표도

도 1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

암 세포 표면에서  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현하는 환자의 암 세포의 증식을 억제하는 방법으로서,

약 1.0~15 mg/ml의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체;

약 22~27 mM의 시트르산염;

약 145~165 mM의 염화나트륨;

약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트(TWEEN(등록상표)) 80

을 함유하고 pH가 약 5.5~7.5인 액상 제제를 포함하는 약학 조성물을 치료학적 유효량으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 항체는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 하나 이상의 생물학적 활성을 중화시키는 것인 방법.

### 청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 M200 항체와 동일한  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 에피토프와 결합하는 것인 방법.

### 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 M200이 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 것인 방법.

### 청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 M200, F200 및 IIA1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 항체는 암 세포 표면상의  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 2차 항체가 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하며, 상기 2차 항체는 서열 2, 4, 6 및 8로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 치료학적 유효량은 약 10 mg/kg인 것인 방법.

#### 청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 암 세포는 유방암 세포, 폐암 세포, 전이성 흑색종 세포, 췌장암 세포 및 신장 세포 암종 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 암은 신장 세포 암종 또는 전이성 흑색종인 것인 방법.

#### 청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 항체와 병행하여 또는 순차적으로 화학요법 제제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 11.

$\alpha 5 \beta 1$ 을 발현하는 암 피험체를 치료하는 방법으로서, 상기 피험체에서는 아직 종양이 발생하지 않았으며, 상기 방법은

약 1.0~15 mg/ml의 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체;

약 22~27 mM의 시트르산염;

약 145~165 mM의 염화나트륨;

약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트(TWEEN(등록상표)) 80

을 함유하고 pH 약 5.5~7.5인 액상 제제를 포함하는 약학 조성물을 치료학적 유효량으로 피험체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 12.

제11항에 있어서, 상기 항체는 M200과 동일한  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린의 에피토프에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 13.

제11항에 있어서, 상기 항체는 암 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린과 M200의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 14.

제11항에 있어서, 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 췌유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 15.

제11항에 있어서, 상기 암은 신장 세포암종 또는 전이성 흑색종인 것인 방법.

#### 청구항 16.

제11항에 있어서, 상기 치료학적 유효량은 약 10 mg/kg인 것인 방법.

#### 청구항 17.

제11항에 있어서, 상기 항체와 병행하여 또는 순차적으로 화학요법 제제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 18.

약 1.0~15 mg/ml의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체;

약 22~27 mM의 시트르산염;

약 145~165 mM의 염화나트륨;

약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트(TWEEN(등록상표)) 80

을 함유하고, pH 약 5.5~7.5인 액상 제제를 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 농도는 약 10 mg/ml인 것인 약학 조성물.

#### 청구항 20.

제18항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 M200인 것인 약학 조성물.

#### 청구항 21.

제18항에 있어서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 M200인 것인 약학 조성물.

#### 청구항 22.

제18항에 있어서, 화학요법 제제를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

## 명세서

## 기술분야

본 발명은 암 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 특이적으로 인지하는 항체 및 이러한 암 세포들의 증식을 억제하는 항체를 이용하는 방법을 제공한다.

## 배경기술

배경 기술

$\alpha 5\beta 1$  인테그린과 종양의 신생혈관생성의 연관성은 널리 공지된 사실이다[예를 들어, 본원에 참고 문헌으로서 첨부된 미국 특허 출원 공보(US 2002/0172675 A1, 1999년 5월 7일자 발행) 참조].  $\alpha 5\beta 1$ 은 리간드 피브로넥틴과 특이적으로 결합하는 이중 이량체성(heterodimeric) 인테그린이다.  $\alpha 5\beta 1$ 은 혈관내피세포의 표면에서 발현되어 피브로넥틴에의 부착 및 피브로넥틴으로의 이동을 매개한다.  $\alpha 5\beta 1$  및 피브로넥틴 사이의 결합 상호 작용은 종양의 신생혈관생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다. 종양 내에서의 신생혈관생성은 하나 이상의 혈관신생 유발 전구 성장 인자(pro-angiogenic growth factor)[예를 들어, FGF, VEGF, PDGF 등]가 방출되어 국소적으로 혈관내피세포를 활성화시킬때 개시된다. 이러한 인자들은 혈관내피세포들을 활성화시킨 후 혈관내피세포의  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 통하여 세포외 기질에 존재하는 피브로넥틴과 결합함으로써 새로운 혈관을 형성한다. 항 $\alpha 5\beta 1$  항체들은 생체내 종양 모델에서 신생혈관생성을 억제하는 것으로 공지되어 있다(예를 들어, US 2002/0172675 A1 참조).

항-신생혈관생성 암 치료법은 종양의 맥관형성을 억제함으로써 연속적인 종양의 성장 및 전이를 막는 것에 바탕을 둔다 [예를 들어, Marx, "A Boost for Tumor Starvation", *Science* 301, 452(2003); Sato, "Molecular Diagnosis of Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Cancer Therapy", *Int.J.Clin.Oncol.*8, 200(2003); Bissachi et al, "Anti-Angiogenesis and Angioprevention: Mechanisms, Problems and Perspectives", *Cancer Detec.Prev.* 27, 229(2003) 참조]. 현재 60 가지 이상의 항 신생혈관생성 기반 요법이 암 치료법의 임상 개발 단계에 있다. 그러나 일부 암에 있어서는 종양의 맥관형성을 억제함으로써 종양을 "기아 상태(starve)"에 빠뜨릴 수 있는 반면에, 현재의 연구에 따르면 항 신생혈관생성 치료법에 영향을 받지 않는 것으로 보이는 암이 존재한다는 것을 알 수 있다[Sato의 문헌(상동) 참조]. 예를 들어, 항VEGF 항체 요법에 있어서, AVASTIN<sup>TM</sup>(베바시주맙(bevacizumab))은 결장암에 대한 임상 실험에서는 성공을 거두었으나, 유방암에 있어서는 성공하지 못하였다(Marx의 문헌(상동) 참조). 뿐만 아니라, 항 신생혈관생성계 치료법은 종양 맥관형성 과정이 아직 개시되지 않은 조기 치료법에는 적당하지 않다.

$\alpha 5\beta 1$  인테그린의 신생혈관생성 과정에서의 작용으로 인하여,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린은 신생혈관생성 과정에 의하여 매개되는, 암 종양 성장을 포함하는 다수의 질병에 대한 치료 표적으로서 제안되고 있다. 피브로넥틴으로의 특이적 결합을 차단하는  $\alpha 5\beta 1$  에 대한 키메라 항체 및 인간화된 항체가 개발되었다. 키메라  $\alpha 5\beta 1$  항체, M200(공식 명칭으로서는 볼로식사이맵(volociximab)으로도 알려짐)은 성장 인자의 자극과는 무관하게 시험관내 활성화된 혈관내피세포의 세포사를 유도하는 것으로 공지되어 있다.

그러므로, 종양 맥관형성 과정이 개시되기 이전에 직접 암 세포를 사멸시킬 수 있는 암 치료법 및 조기 치료법, 또는 표적화된 항 신생혈관생성 요법이 효과가 없다는 것이 입증되었을 때에 본 발명이 필요하다.

발명의 개요

본 발명은 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 이용하여 암 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다. 일반적인 구체예에 있어서, 본 발명의 방법은 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암 세포와 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 접촉시키는 것을 포함한다.

제1 구체예에서, 본 발명은 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시키는 암(또는 종양) 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 종양 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 항체와 종양 세포를 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 종양 세포는 난치성 종괴 환자의 것이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 종양 세포는 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암에서 유래된 것이다.

제2 구체예에서, 본 발명은 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시키는 종양 세포의 사멸을 유도하는 방법으로서, 종양 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린과 결합하는 항체와 종양 세포를 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 종양 세포는 난치성 종괴 환자의 것이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 종양 세포는 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암에서 유래된 것이다.

제3 구체예에서, 본 발명은 암 세포의 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시키는 암 환자의 암 세포 증식을 억제시키는 방법을 제공한다. 본 구체예에서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는데, 여기서 상기 항체는 암 세포 표면에서 M200과  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 결합을 경쟁적으로 억제시킨다. 추가의 구체예에서, 항체는 아미노산 서열이 서열 2, 4, 6 및 8과 실질적으로 동일한 가변부를 포함한다. 본 방법의 바람직한 구체예에서, 환자에 투여된 항체는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 하나 이상의 생물학적 활성을 중화시킨다. 다른 구체예에서, 환자에 투여된 항체는 치료적 작동체의 일부(예를 들어, 항체-약물 컨쥬게이트)를 포함한다. 본 방법의 추가의 구체예에서, 항체는 순차적으로, 또는 다른 화학요법 제제와 함께 투여된다. 본 방법의 추가의 바람직한 구체예에서, 항체는 난치성 종괴 환자에 순차적으로, 또는 다른 화학요법 제제와 함께 투여된다.

제4 구체예에서, 본 발명은 암 세포 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암이 진행중인 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 상기 개체는 종양으로까지 진행되는 진행되지 않은 개체이며, 상기 방법은  $\alpha 5\beta 1$  인테그린과 결합하는 항체를 포함하는 약학 조성물을 치료학적 유효량으로 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암이다.

제5 구체예에서, 본 발명은  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암에 대한 유전적 소인을 가지고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 상기 개체는 종양으로까지 진행되는 진행되지 않은 개체이며, 상기 방법은  $\alpha 5\beta 1$  인테그린과 결합하는 항체를 포함하는 약학 조성물을 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암이다.

본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체로서는 바람직하게 IIA1, M200, F200과, IIA1, M200 및 F200과 같이  $\alpha 5\beta 1$  상의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함한다.

제6 구체예에서, 본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 IIA1 및/또는 M200과, 종양 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체들을 포함한다.

본 발명의 방법에 유용한 제7 구체예는 가변부의 아미노산 서열이 서열 2, 4, 6 및 8과 실질적으로 동일한 항체를 포함한다. 또한, 상기 항체는 서열 2, 4, 6 및 8과 약 90%, 95%, 98% 이상 또는 바람직하게 99% 이상의 상동성을 갖는 가변부 아미노산 서열을 포함한다.

제8 구체예에서, 본 발명은 약학 조성물로서 조제된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 제공한다. 상기 약학 조성물은 본원에 개시된 본 발명의 다양한 방법에 유용하다. 다양한 구체예에서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 약학 조성물은 경구, 피하, 국소, 정맥내, 비강내, 경피, 복막내, 근육내, 폐내, 질내, 직장내, 안구내, 뇌실내, 또는 초내 경로를 포함하는 다양한 경로를 통하여 개체에 치료학적 유효량으로 투여될 수 있으나, 상기 투여 경로에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 1.0~15 mg/ml의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, 약 22~27 mM의 시트르산염, 약 145~165 mM 염화나트륨, 약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트[TWEEN(등록상표)] 80를 포함하는, pH 약 5.5~7.5인 액상 제제이다. 기타의 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 10 mg/ml의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, 약 25 mM의 시트르산염, 약 150 mM의 염화나트륨, 약 0.05%의 폴리소르베이트[TWEEN(등록상표)] 80를 포함하는, pH 약 6.5인 액상 제제이다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약 10 mg/ml의 M200, 약 25 mM의 시트르산염, 약 150 mM의 염화나트륨, 약 0.05%의 폴리소르베이트[TWEEN(등록상표)] 80를 포함하는, pH 약 6.5인 액상 제제이다. 다른 바람직한 구체예에서, 본원에 개시된 약학 조성물 각각은 추가로 화학요법 제제를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 약학 조성물은 약학적 유효량의 다른 화학요법 제제와 함께 환자에게 투여될 수 있다.

상기 기술된 약학 조성물은 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암으로 진단되었거나 또는 상기 암이 발병한 것으로 의심되는 환자들을 치료하는 방법에 사용될 수 있으며, 여기서 상기 방법은 약 1.0~15 mg/ml의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, 약 22~27 mM의 시트르산

염, 약 145~165 mM의 염화나트륨, 약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트[TWEEN(등록상표)] 80를 포함하는, pH 약 5.5~7.5인 액상 제제를 치료학적 유효량으로 환자에게 정맥 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료 방법의 하나의 구체예에서, 투여되는 치료학적 유효량은 약 10 mg/kg이다. 바람직한 구체예에서, 약학 조성물로 치료되는 환자는 신장 세포 암종 또는 전이성 흑색종으로 진단되었거나 또는 상기 암이 발병한 것으로 의심되는 환자이고, 치료학적 유효량은 약 10 mg/kg이다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 명확성과 이해를 돕기 위하여, 이하에서는 예시적인 구체예 및 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 본 명세서에 포함된 구체예 및 실시예는 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 당 업계의 통상의 숙련자는 균등한 물질 및/또는 방법이 사용될 수 있으며/있거나, 본원에 첨부된 청구범위 벗어나지 않고 본원에 개시된 구체예 및 실시예중 임의의 것에 명백한 변경, 변형 또는 수정이 가하여질 수 있음을 용이하게 파악할 수 있을 것이다.

본 출원에 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 이들 공보 또는 특허 출원이 각각 참고 문헌으로서 첨부된 것으로 구체적이고 개별적으로 기재된 바와 같이 본원에 참고 문헌으로서 첨부되어 있다.

달리 정의하지 않는다면, 본원에 사용된 모든 용어들은 본 발명이 속한 업계의 당업자에 의하여 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다.

### 개관

본 발명은  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린이 다양한 유형의 암에 대한 종양 상피 세포의 표면에 발현된다는 놀라운 발견에 기초를 둔다. 뿐만 아니라, 이 표면의  $\alpha 5 \beta 1$ 과 표적화된 항체의 결합은 이러한 암 세포들을 직접 사멸시킨다는 사실도 알게 되었다. 암세포의 공격 및 사멸 방법은 직접적인 것이기 때문에, 매우 이른 단계(즉, 실질적인 종양 형성 단계 이전)의 치료 방법으로서 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 직접 암 세포 사멸 방법은 특히 세포 표면에  $\alpha 5 \beta 1$ 을 발현시키는 암을 치료하는데에는 유용하지만, 항 신생혈관생성 방법에는 영향을 받지 않는 것으로 입증되었다. 상기와 같은 암의 유형으로서는 방광암, 유방암, 췌장암, 폐암, 전립선암, 난소암 및 전이성 흑색종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명은 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체를 이용하여 암 세포를 사멸시키거나 그렇지 않으면 이러한 암세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 가장 일반적인 구체예에서, 상기 방법은 표면에  $\alpha 5 \beta 1$ 을 발현시키는 암 세포와 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체를 접촉시켜, 암 세포의 죽음(예를 들어, 세포사(apoptosis))을 유도하는 것을 포함한다.

본 발명의 방법은 암 세포들을 생체(예를 들어, 환자)내에서 사멸시킴으로써 종양 형성 및 성장을 억제하거나 경감시키는 데에 사용될 수 있다. 또한, 본 방법은 이전에 형성된 종양을 치료하는데에 사용될 수 있고, 다른 암 치료법(예를 들어, 화학요법 제제 또는 기타 분자계 암 치료제)과 병행될 수 있다. 예를 들어, 암종이 성장하고 있는 환자는 항체 M200의 제제와 독소루비신과 같은 화학요법 화합물을 병용하여 처치될 수 있다. M200은 인간의 체내 독성이 비교적 낮은 키메라 항체이기 때문에, 이러한 병용 치료법은 보다 과량의 화학요법 제제만을 사용하였을 때 나타나는 독성 부작용 없이 상당한 암 세포 사멸력을 제공할 수 있다.

본 발명은, 상기 항체들의 항 신생혈관생성 효과에 영향을 줄 수 있는 임의의 종양 맥관 구조가 존재하지 않을 때조차도, 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체가 암 세포를 직접 사멸시키고/시키거나 암 세포의 증식을 직접적으로 억제하는 방법을 제공한다. 그러므로, 본 방법은 특히  $\alpha 5 \beta 1$ 을 발현시키되 맥관 형성 정도가 심각한 종양을 형성하지는 않고/않거나, 항 신생혈관생성 요법에 영향을 받지 않는 암 예를 들어, 췌장암, 신장암, 전이성 흑색종, 폐암 및 유방암의 예방학적 또는 치료학적 처치법에 매우 바람직하다.

뿐만 아니라, M200(및 기타 본원에 개시된 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체)의 직접적인 암 세포 사멸능으로 인하여, 이러한 항체들을 맥관 형성된 종양이 형성되기 이전의 조기 암 치료에 사용할 수 있다. 조기 치료법은 인간 게놈 서열로부터 유래된 유전적 마커에 대한 정보를 이용하여 개발된 암에 대한 신규의, 보다 정밀한 진단 실험의 출현이라는 관점에서 볼 때 특히 중요하다. 다수의 암은 일반적으로 매우 이른 단계 즉, 전종양 단계(pretumor stage)에 검출 및 진단되는데, 여기서 상기 암 세포는 조직내에 존재할 수 있고/존재할 수 있거나 순환할 수 있지만, 정밀도가 떨어지는 비유전적 진단법에 의하여 검출될 수 있는 종양 구조를 확립하지는 않는다. 이러한 조기 진단 시나리오에 있어서, 항 신생혈관생성 요법은 종양 맥관 구조가 아직

확립되지 않을 때, 그리고 통상의 화학요법이 실행됨에 따라 일어날 수 있는 과도한 독성 부작용을 초래할 때 효과가 아주 미미하거나 없을 수 있다. 본 발명의 방법은 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시키는 암 세포의 항체-표적화 직접 사멸이라는 결과를 가져오기 때문에, 특히 조기 예방적 치료에 매우 바람직하다.

조기 치료 방법의 혜택을 받을 것 같은 개체들로서는 1) 종양(또는 마이크로튠; microtumor)의 진행 및/또는 존재에 대한 가능성이 높은, 전종양(pretumor) 실험을 수행한 개체; 2) 종양의 진행 가능성이 높은, 매우 치명적인 발암 환경에 노출시킨 개체; 및 3) 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암 세포로의 발전에 대한 유전적 소인이 많은 개체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

#### 항 $\alpha 5\beta 1$ 항체

본 발명의 방법은 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 직접적인 암 세포 사멸 제제로서 사용한다. 본원에 사용된 "항체"란 용어는 특정의 항원과 특이적으로 결합하거나, 또는 이와 면역학적으로 반응성이 있는 면역글로불린 분자를 의미하는 것으로서, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 유전자 조작되었거나 또는 개질된 형태의 항체를 포함하며, 상기 항체로서는 키메라 항체, 인간화된 항체, 이중 컨주게이트 항체(heteroconjugate antibody)[예를 들어, 2가 특이 항체(bispecific antibody), 다이아바디(diabody), 트리아바디(triobody) 및 테트라바디(tetrabody)], 및 항체의 항원 결합 단편 예를 들어, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG, 및 scFv 단편을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 "scFv"란 용어는, 통상의 항체로부터 유래된 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 결합되어 하나의 사슬을 형성한 단일 사슬 Fv 항체를 의미한다. 또한, 본원에 개시되어 있는 본 발명의 명세서에서 사용된 "항체"란 용어에는 특이적 항원과의 반응성이 있는 하나 이상의 항체의 혼합물(예를 들어,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린과 반응성이 있는 모노클로날 항체의 여러 가지 유형들의 혼합물)을 포함한다.

바람직하게, 본 발명의 방법에 사용되는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 방법에 유용한 모노클로날 항체는 당 업계에 공지된 다양한 기술 예를 들어, 하이브리도마의 이용, 재조합체의 이용 및 파지 디스플레이 기술을 사용하거나, 또는 이들을 병행하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 하이브리도마 기술 예를 들어, 당 업계에 공지 및 교시된 기술[예를 들어, 본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용되어 있는, Harlow 및 Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988); Hammerling의 다수: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas," Elsevier, New York(1981), pp.563-681]을 사용하여 제조될 수 있다. 항체는 파지 또는 유사 벡터에서 재조합 항체 라이브러리를 선별함으로써[Huse의 다수, Science 246: 1275-1281 (1989); Ward의 다수, Nature 341: 544-546 (1989); 및 Vaughan의 다수, Nature Biotech. 14: 309-314 (1996)], 또는 항원이나 항원을 암호화하는 DNA로 동물을 면역화시킴으로써 제조될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 암세포 직접 사멸 방법은 이미 특성 규명된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체인, IIA1, M200 또는 F200을 사용하여 수행될 수 있다. IIA1은 부모 마우스 IgG1군의 항체로서  $\alpha 5\beta 1$  인테그린이 피브로넥틴에 결합하는 것을 억제하는 것으로 공지되어 있다[예를 들어, 본원에 참고 문헌으로 첨부되어 있는 미국 특허 출원 공보 US 2002/0172675 A1(1999년 5월 7일 발행) 참조]. M200은 IIA1에서 유래된 키메라 IgG4 항체이다. F200은 M200에서 유래된 Fab 단편이다. 상기 항체들은 제조 및 기능적으로 특성 규명되었으며, 이들의 특이적 아미노산 서열은 미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원)에 개시되어 있으며, 상기 문헌들은 각각 본원에 참고 문헌으로서 인용되어 있다. M200 및 F200은 원숭이 눈 및 토끼 눈 모델과 같은 생체내 환경에서 항 신생혈관생성 효능을 나타내었다[미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원)].

본 발명의 방법에 유용한 항체는 또한 IIA1, M200 및 F200과 같이  $\alpha 5\beta 1$  상 에피토프와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 포함한다. "에피토프"(또는 "항원 결정기")란, 항체가 결합하는 항원상의 위치를 말한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의하여, 병렬되어 있는 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 양자로부터 형성될 수 있다. 예를 들어,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린상 에피토프는 이중 이량체 구조를 형성하는  $\alpha$  및  $\beta$  폴리펩티드 사슬 각각에 아미노산을 포함할 수 있다. 인접 아미노산으로 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 시약에 노출시 그대로 존재하지만, 반면에 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 시약으로 처리시 떨어져 나간다. 에피토프는 통상적으로 3개 이상, 더욱 일반적으로는 5개 이상 또는 6~10개의 아미노산을 독특한 공간 구조로 포함한다. 에피토프의 공간 구조를 측정하는 방법으로서 예를 들어, X선 결정법 및 2차원 핵 자기 공명법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)]을 참조하시오.

단백질에 아미노산 돌연변이가 즉, 하나의 항체가 결합하는 것을 감소시키거나 또는 방해하는 돌연변이가 또한 다른 항체의 결합을 감소시키거나 또는 방해할 경우, 2개의 항체는 단백질의 동일한 에피토프에 결합한다고 한다. 뿐만 아니라, 2개의



항체가 단백질과의 결합시 경쟁할 경우 즉, 하나의 항체가 다른 항체가 단백질에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제, 감소 또는 방해할 경우, 2개의 항체는 동일한 에피토프에 결합한다고 결론내릴 수 있다. 결과적으로, 본 발명의 방법은 IIA1, M200(볼로식사이맵), 또는 F200이 암 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 것으로 관찰되는 항체로써 수행될 수 있다.

본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 IIA1, M200 및 F200에 한정되는 것은 아니지만, IIA1, M200 및 F200의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한, 가변부, 구조틀 영역(framework region) 또는 CDR 아미노산 서열을 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 가변부, 구조틀 영역 및 CDR의 범위는 당 업자에게 널리 공지되어 있다[예를 들어, Kabat와 다수, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 참조]. 본원에 사용된 항체의 중쇄 가변부("V<sub>H</sub>" 또는 "VH") 또는 경쇄 가변부("V<sub>L</sub>" 또는 "VL")는 항원 결합 단편 예를 들어, Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 중쇄 또는 경쇄를 포함한다. 항체의 경쇄 및 중쇄 가변부는 또한 3개의 과변이 부위("상보성 결정 부위" 또는 "CDR")에 의해 구분되는 4개의 "구조틀(framework)" 영역을 포함한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 결합하는 데에 관여한다.

"실질적으로 동일한" 가변부, 불변부, 구조틀 영역 또는 CDR이란, 아미노산 서열의 약 85~90% 이상 및 바람직하게는 95% 이상이 천연의 또는 변형되지 않은 항체의 가변부 또는 불변부의 아미노산 서열과 동일한 항체 부위를 말한다. 2개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 있어서 "동일한" 또는 "% 동일성"이란 용어는, 이하 기술되어 있는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘(디폴트 매개변수를 갖는 알고리즘), 또는 수동식 정렬 및 시각적 관찰에 의하여 측정되는 바와 같이, 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 동일하거나 또는 특정한 %를 나타내는(즉, 비교 영역 또는 지정 영역에 대하여 최대 상동성을 놓고 비교 및 정렬하였을 때, 특정 영역에 대하여 동일성이 약 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상을 나타내는 2 이상의 서열 또는 종속 서열을 의미한다[예를 들어, 국립생물정보센터(NCBI) 웹 사이트(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 BLAST 설명 참조].

동일한 또는 실질적으로 동일한 서열로서는 결실 및/또는 삽입이 발생한 서열뿐만 아니라, 치환이 발생한 서열, 그리고 천연 발생 서열 예를 들어, 다형성 또는 대립 유전자 변이체, 인간이 제조한 변이체 예를 들어, 보존적으로 변형된 변이체를 포함한다. 서열 동일성 측정용으로서 널리 공지된 알고리즘은 갭 등을 고려할 수 있다. 서열 동일성은 바람직하게는 길이 약 25 이상인 아미노산 또는 뉴클레오티드, 또는 더욱 바람직하게는 길이 50~100인 아미노산 또는 뉴클레오티드인 영역에 걸쳐 존재한다.

본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 아미노산 서열은 천연 항체에서 발견되는 서열에 한정되지 않으며; 상기 항체는 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 목적으로 하는 특성을 얻어내도록 재고안될 수 있다. 이러한 "유전적으로 변형된 항체"로서는 아미노산 서열이 부모 항체(즉, 변형되지 않은 항체)의 아미노산 서열로부터 변형된 항체를 포함한다. 변형은 예를 들어, 가변부 또는 불변부의 하나만의 아미노산 또는 몇 개의 아미노산 변형에서부터 이들 가변부 또는 불변부 전체의 재고안에 이르기까지 가능하다. 치료학적 항체의 특성 예를 들어, 면역원성, 약물동력학적 특성(예를 들어, 혈청 반감기), 보체 고정화, 막과의 상호 작용 및 기타 작동체 기능 등과 같은 기능적 특성들을 개선 또는 변형시키기 위하여 불변부에서 위치 배향 돌연변이 유발에 의한 변화를 일으킬 수 있다. 일반적으로, 항원 결합 특성을 개선시키기 위하여 항체 가변부를 변경시킬 수 있다.

하나의 바람직한 구체예에서, 키메라 항체, M200이 본 발명의 암 세포 직접 사멸 방법에 사용될 수 있다. "키메라 항체"라는 용어는 (a) 불변부 또는 이의 일부가 변형, 재배치 또는 교환되어, 항원 결합 위치(가변부)가 상이한 군 또는 변종 군의 불변부에 결합되었거나, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 완전 상이한 분자 예를 들어, 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등에 결합된 면역글로불린 분자; 또는 (b) 가변부 또는 이의 일부가 상이하거나 또는 변형된 항원 특이성을 갖는 가변부로 교환, 재배치 또는 변형된, 면역글로불린 분자를 의미한다. 키메라 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용된 문헌[Morrison와 다수, Science 229: 1202-1207 (1985); Oi 와 다수, BioTechniques 4: 214-221 (1986); Gillies와 다수, J. Immunol. Methods 125: 191-202 (1989); 및 미국 특허 제 5,807,715 호; 동 제 4,816,567 호; 및 동 제 4,816,397호]을 참조하시오.

다른 바람직한 구체예에서, 인간화된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체가 본 발명의 암 세포 직접 사멸 방법에 사용될 수 있다. 인간화된 항체 중 부가의 인간 서열은 인간의 치료에 사용될 때 항체로부터 얻을 수 있는 면역원성을 더욱 감소시킨다. 인간화된 IIA1에 관하여는 본원에 각각 참고 문헌으로서 인용된 미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원)에 개시되어 있다. "인간화된 항체"란, 하나 이상의 인간의 구조틀 항체, 바람직하게는 비인간 항체에서 유래된 모든 CDR을 포함하는 면역글로불린을 의미하며, 여기에 존재하는 임의의 불변부는 인간 면역글로불린 불변부와 실질적으로 동일 즉, 약 85~90%, 및 바람직하게는 95% 이상이 동일하다. 그러므로, CDR을 제외한 인간

화된 면역글로불린의 모든 부분은 하나 이상의 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 따라서, 이러한 인간화 항체는 키메라 항체 즉, 실질적으로 원형의 인간 가변 영역중 최소한의 영역이 비인간 종으로부터 유래된 상응 서열에 의하여 치환된 항체이다. 인간 구조를 영역에 있어서 구조를 잔기는 CDR 공여 항체로부터 유래된 상응하는 잔기로 치환되어 항원 결합을 변형, 바람직하게는 개선시킬 수 있다. 이러한 구조를 치환은 당 업계에 널리 공지된 방법 예를 들어, 특정 위치에 있는 비정상 구조를 잔기를 동정하기 위한 서열 비교 및 항원 결합에 중요한 역할을 하는 구조를 잔기를 동정하는, 구조를 잔기 및 CDR의 상호 작용을 모델링하여 동정 될 수 있다. 예를 들어, 각각 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Queen와 다수, 미국 특허 제 5,530,101 호; 동 제 5,585,089 호; 동 제 5,693,761 호; 동 제 5,693,762 호; 동 제 6,180,370호]를 참고하십시오. 항체는 당 업계에 공지된 다양한 기술 예를 들어, CDR-그래프팅(유럽 특허 제 239,400 호; PCT 공보 WO 91/09967; 미국 특허 제 5,225,539 호, 동 제 5,530,101 호 및 동 제 5,585,089 호), 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)[유럽 특허 제 592,106 호; 유럽 특허 제 519,596 호; Padlan, Mol. Immunol., 28: 489-498 (1991); Studnicka와 다수, Prot. Eng. 7: 805-814 (1994); Roguska와 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973 (1994)], 및 연쇄 서플링(미국 특허 제 5,565,332 호)에 의하여 인간화될 수 있다.

다른 구체예에서,  $\alpha 5\beta 1$ 에 대한 인간 항체(즉, 인간 가변부 및 불변부를 모두 포함하는 항체)는 본 발명의 방법에 의하여 인간 환자의 치료학적 처치법에 사용될 수 있다. 인간 항체는 당 업계에 공지된 다수의 방법[예를 들어, 전술한 바와 같이 인간 면역글로불린 서열에서 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 파지 디스플레이 방법]에 의하여 제조 또는 획득할 수 있다. 본원에 각각 그 자체로서 참고 문헌으로 인용된 문헌[미국 특허 제 4,444,887 호 및 동 제 4,716,111 호; 및 PCT 공보 WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; 및 WO 91/10741]을 참조하십시오. 인간 항체는 또한 트랜스제닉 마우스(즉, 기능성 내인 면역글로불린을 발현시킬 수는 없으나, 인간 면역글로불린 유전자를 발현시킬 수 있는 마우스)를 사용하여 제조될 수도 있다. 인간 항체 제조 기술의 개요에 대하여는 문헌 [Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)]을 참조하십시오. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체의 제조 기술 및 이러한 항체를 제조하는 방법에 관한 보다 상세한 설명은 예를 들어, 본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용되어 있는 문헌[PCT 공보 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 유럽 특허 제 0 598 877 호; 미국 특허 제 5,413,923호; 동 제 5,625,126호; 동 제 5,633,425 호; 동 제 5,569,825호; 동 제 5,661,016 호; 동 제 5,545,806 호; 동 제 5,814,318호; 동 제 5,885,793호; 동 제 5,916,771호; 및 동 제 5,939,598호]을 참조하십시오. 선택된 에피토프를 인지하는 인간 항체는 또한 "유도 선택(guided selection)"이라 불리우는 기술을 사용하여 완전하게 제조될 수도 있다. 이 기술에 있어서 선택된 비인간 모노클로날 항체 예를 들어, 마우스 항체는 동일한 에피토프를 인지하는 완전 인간 항체의 선택을 유도하는데 사용된다[Jespersen와 다수, Biotechnology 12: 899-903 (1988)].

대안적 구체예에서, 프라임화된 항체(primatized antibody)(즉, 원숭이의 가변부와 인간의 불변부를 포함하는 항체)는 본 발명의 방법에 따른 치료방법에 사용될 수 있다. 프라임화된 항체의 제조 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용된 미국 특허 제 5,658,570 호; 동 제 5,681,722 호; 및 동 제 5,693,780 호를 참조하십시오.

### 항체 기능

본 발명의 방법은  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 특이적으로 결합하는 기능성 항체를 사용한다. 항원과의 특이적 결합에 대한 항체의 애비디티 시험(Avidity test)을 통하여 당업자는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 하나 이상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 동정할 수 있다. 1) 항체가 결합 활성의 최저치를 나타내고/나타내거나; 2) 항체가 관련 폴리펩티드 분자와 교차 반응을 거의 하지 않는다면, 항체는 특이적으로 결합하는 것으로 볼 수 있다.

첫째, 본원에 개시된 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는, 이 항체가  $10^6 M^{-1}$  이상, 바람직하게는  $10^7 M^{-1}$  이상, 또는 더욱 바람직하게는  $10^8 M^{-1}$  이상, 및 가장 바람직하게는  $10^9 M^{-1}$  이상의 결합 친화도( $K_d$ )로  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩티드, 펩티드 또는 에피토프와 결합한다면 특이적으로 결합(또는 "특이적으로 반응" 또는 "특이적으로 면역 반응")하는 것이다. 항체의 결합 친화도는 당업자에 의하여 용이하게 측정할 수 있다[예를 들어, 스캐처드(Scatchard) 분석법(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949), 또는 BIA코어를 사용하는 표면 플라스몬 공명법]. 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 특성 규명에 유용한 다수의 항체 결합 검정법은 미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원)에 개시되어 있으며, 이들 문헌은 각각 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있다.

둘째, 항체가 관련 폴리펩티드와 교차 반응을 거의 하지 않는다면 항체는 특이적으로 결합하는 것이다. 항체가 웨스턴 블롯 분석법(예를 들어 "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel와 다수, 1995)을 사용하였을 때  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩티드는 감지하지만 비공지의 관련 폴리펩티드는 감지하지 못한다면, 항체는 관련 폴리펩티드 분자와 교차 반응을 거의 하지 않는 것이다. 공지의 관련 폴리펩티드의 예로서는, 상동 단백질(ortholog), 동일한 종으로부터 유래된, 단백질 인테그린 군의 일원인 단백질, 또는 돌연변이에 의해 항 $\alpha 5\beta 1$  에피토프가 변형된 돌연변이  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩

티드를 포함한다. 뿐만 아니라, 항체는 공지의 관련 폴리펩티드에 대하여 "스크리닝"되어  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 특이적으로 결합하는 군집을 분리할 수 있다. 예를 들어, 인간  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩티드에 대하여 생성된 항체는 불용성 매트릭스에 부착된 관련 폴리펩티드에 흡착되고 ; 인간  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩티드에 특이적인 항체는 적당한 완충 조건하에서 매트릭스를 통과하여 흘러나갈 것이다. 이러한 스크리닝 방법은 밀접하게 관련된 폴리펩티드와 교차 반응하지 않는 폴리클로날 및 모노클로날 항체의 분리를 가능하게 한다[Antibodies : A Laboratory Manual, Harlow and Lane(eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan 외 다수. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc. , 1995]. 특이적 항체의 스크리닝 및 분리는 당 업계에 널리 공지되어 있다 [Fundamental Immunology, Paul(eds.), Raven Press, 1993; Getzoff 외 다수, Adv. in Immunol.43:1-98, 1988; Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, Goding, J.W.(eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin 외 다수, Ann.Rev.Immunol.2:67-101, 1984 참조]. 이러한 검정법의 각각의 예로서는 다음의 것들을 포함한다: 동시 면역 전기 영동법, 방사능 면역 검정법, 방사능 면역 침전법, 효소-결합 면역-흡착 검정법(ELISA), 닷 블롯법(dot blot) 또는 웨스턴 블롯 검정법, 억제 또는 경쟁 검정법 및 샌드위치 검정법. 면역학적 방법 및 면역 검정법에 관하여는 문헌[Basic and Clinical Immunology(Stites & Terr eds., 7th ed. 1991)]을 참조하시오.

본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 특이적 결합은  $\alpha 5\beta 1$  결합에 대한 선택의 과정을 통하여 실현될 수 있다. 일반적으로, 특정 단백질에 특이적으로 결합하도록 생성된 폴리클로날 항체, 또는 이의 다형성 변이체, 대립 형질체, 상동체, 보존적으로 개질된 변이체, 스플라이싱된 변이체는 선택된 단백질(예를 들어,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린)과 특이적으로 면역 반응성을 갖고 다른 단백질과는 면역 반응성을 갖지 않는 항체만을 획득하기 위하여 선택될 수 있다. 특이적 결합 선택은 다른 분자들과 교차 반응하는 항체를 제외함으로써 수행 가능하다. 다양한 면역 검정 방식이  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체를 선택하는데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 고상 ELISA 면역검정법이 단백질과 특이적으로 반응하는 항체를 선택하는데에 사용될 수 있다[특이적 면역반응성을 측정하는데 사용될 수 있는 면역검정 방식 및 조건에 대한 설명에 관하여는 예를 들어, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual(1988) 참조].

#### 항체 약물 컨쥬게이트

몇몇 구체예에서, 암 세포 사멸 방법은 작동체 부분에 컨쥬게이트화된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 사용할 수 있다. 상기 작동체 부분은 표지부 예를 들어, 방사능 표지 또는 형광 표지를 포함하는 임의의 수의 분자일 수 있거나, 또는 바람직하게 치료학적 부분일 수 있다. 상기 작동체 부분(또는 "작동체 성분")은 항 $\alpha 5\beta 1$  항체에 링커 또는 화학 결합을 통하여 공유적으로, 또는 이온 결합, 반 데르 발스 결합, 정전 결합 또는 수소 결합을 통하여 비공유적으로 결합(또는 연결 또는 컨쥬게이트화)할 수 있다.

하나의 양태에 있어서, 치료학적 부분은  $\alpha 5\beta 1$  인테그린의 활성을 조절하는 소분자이다. 다른 양태에 있어서, 상기 치료학적 부분은  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 매우 인접하거나 또는 이와 결합된 분자 또는 세포의 활성에 영향을 미친다. 예를 들어, 치료학적 부분은 세포 독성 제제일 수 있다. 본원에 사용된 "세포 독성 제제"란 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방해하고/하거나 세포를 파괴하는 물질을 말한다. 상기 용어에는 방사성 동위 원소(예를 들어,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  및  $Re^{186}$ ), 화학요법 제제, 및 독소 예를 들어, 박테리아, 곰팡이, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소를 포함한다. 적당한 독소 및 이에 상응하는 단편으로서 디프테리아 A 사슬, 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 쿠신, 크로틴, 페노마이신, 에노마이신, 오리스타틴(예를 들어, 오리스타틴 E 또는 오리스타틴 F) 등을 포함한다. 치료학적 부분을 암 세포 표면에 발현되는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린으로 표적화하는 것은 암 발병 부위내 치료학적 부분의 국소 농도를 증가시킬 뿐만 아니라, 치료학적 부분과 관련된 수 있는 유해한 부작용을 감소시킬 수도 있다.

본 발명의 항 $\alpha 5\beta 1$  항체와 함께 치료학적 부분으로서 사용될 수 있는 화학요법 제제의 예로서는 아드리아마이신, 독소루비신, 독실, 에피루비신, 5-플루오로우라실, 시토신 아라비노시드("Ara-C"), 시클로포스파미드, 티오테파, 부설판, 사이토신, 탁소이드 예를 들어, 파클리탁셀(TAXOL<sup>TM</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 독세탁셀(TAXOTERE<sup>TM</sup>, Rhone-Poulenc Rorer), 탁소테어, 메토티렉세이트, 시스플라틴, 멜파란, 빈블라스틴, 블레오마이신, 에토포시드, 이포스파미드, 미토마이신 C, 미토잔트론, 빈크리스틴, 비노렐빈, 카르보플라틴, 테니포시드, 다우노마이신, 카미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신, 에스페라미신(미국 특허 제 4,675,187 호 참조), 5-FU, 6-티오구아닌, 6-머캅토피린, 악티노마이신 D, VP-16, 클로람부실, 멜파란, 및 질소 겨자와 같은 관련 물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 정의에는 종양에서의 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 호르몬 제제 예를 들어, 타목시펜 및 오나프리스톤도 포함한다.

대안적으로, 본 발명의 방법은 전술한 화학 요법 제제가 항 $\alpha 5\beta 1$  항체와 함께 컨쥬게이트로서가 아닌, 제제로서 투여되어 수행될 수 있다.

## 암의 징후

본 발명은 암 세포 표면에 있는  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 항체로 표적화하여 암 세포 증식 및/또는 전이를 억제하는, 암 세포의 사멸 방법에 관한 것이다. 암은 통상적으로 조절 불가능한 성장이 진행중인 세포를 특징으로 하는 생리적 상태이다. 암은 모든 악성 신생물 예를 들어, 암종, 림프종, 세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 개시된 방법을 사용하여 표적화될 수 있는 세포 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암의 구체예로서는 방광암, 유방암, 결장암, 췌장암, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장 세포 암종 및 비장암을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

종양은 정상적인 성장 제어가 되지 않는 증식중인 세포 집단이다. 종양은 양성 또는 악성일 수 있으며, 전암성, 또는 암성 세포 및 조직을 포함할 수 있다. 암 세포는 통상적으로 암 진행 과정에서 종양을 형성한다. 종양의 성장은 혈관 밀도의 증가를 수반한다. 이러한 종양의 신생혈관 구조는 종양이 성장할 수 있는 필요 영양분을 제공한다. 항 신생혈관생성 항체 요법 항 $\alpha 5\beta 1$  및 항VEGF(VEGF = 혈관 혈관내피세포 성장 인자)는 다양한 암 모델에서 임박한 종양 성장에 효능을 나타내는 것으로 규명되었다[예를 들어, Kim와 다수, J Clin Invest., 110 (7): 933-41 (2002); Ferrara, Nat Rev Cancer, 2 (10): 795-803 (2002)]. 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, M200은 토끼 및 원숭이의 신생혈관생성 안구 질환 모델[진행형 황반 변성; 미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원), 각각 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있음]과 같은 시험관내 및 생체내에서 신생혈관생성을 억제하는 것으로 보인다.

본 발명은 다양한 유형의 암이 (종양 혈관구조의 혈관 내피 세포 이외에) 그것의 종양 상피 세포 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현하고, 이 표면의  $\alpha 5\beta 1$ 과 항체의 표적화된 결합이 이 암 세포의 직접 사멸을 초래한다는 놀라운 발견을 기초로 한다. 결과적으로,  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현하는 상피 세포의 증식을 특징으로 하는 암은 임의의 종양 맥관 구조가 존재하지 않을 때조차도 항 $\alpha 5\beta 1$  항체로 처리될 수 있고/있거나 표적화될 수 있다. 암 세포를 공격 및 사멸시키는 방법이 직접적이기 때문에, 매우 이른 단계(즉, 실질적으로 종양이 형성되기 이전 단계)의 처리법으로서 적당하다.

조기 치료 방법의 혜택을 받을 것 같은 환자로서는 1) 종양(또는 마이크로투머)의 진행 및/또는 존재에 대한 가능성이 높은, 전종양 진단 실험을 수행한 환자; 2) 종양의 진행 가능성이 높은, 매우 치명적인 발암 환경에 노출시킨 환자; 및 3) 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암 세포로 발전 가능한 유전적 소인(예를 들어, 암에 대한 유전자 마커로 입증)이 있는 환자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 유방암에 대한 유전적 소인을 갖는(예를 들어, BRCA 유전자 양성인) 환자, 또는 몇몇 전종양 암 마커가 검출된(예를 들어, PCR에 의해 마이크로-전이 검출된) 환자가 조기 예방용 직접 암 세포 사멸 방법(이 방법에 있어서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 약학 조성물이 투여됨)에 특히 적당하다.

암 소인이 증가한 유전자, 및 종양으로의 진행 가능성이 있는 종양 마커는 암 생물 의학 문헌 및 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 더욱이, 암에 대한 위험성을 상당히 증가시키는 발암 물질 및 이들의 노출 수준 목록은 당업자에게 널리 공지된 생물 의학 문헌에서 구할 수 있다. 당업자는 이하에 기술되어 있는 바와 같이, 이들 문헌에 나와있는 원천 기술을 암 세포상  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 발현을 검출하는 널리 공지된 방법과 함께 수행하여, 개체가 본 발명의 조기 암 치료 방법에 순응할 수 있는지 여부를 측정할 수 있다. 이하 실시예 2에 기술되어 있는 바와 같이, 유동 혈구계측 분석법을 통하여 최소한 다음과 같은 암 예를 들어, 방광암, 유방암, 결장암, 췌장암, 폐암, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암 및 신장 세포 암종으로부터 유래된 세포주의 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린이 발현됨을 알 수 있다.

뿐만 아니라, 본 발명의 암세포 직접 사멸 방법은  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키지만 항신생혈관생성 연구에 영향받는 것으로 입증되지 않은 암의 치료에 특히 유용할 수 있다. 이러한 부류의 암으로서의 방광암, 유방암, 췌장암, 신장암, 폐암, 전립선암, 난소암, 폐암 및 전이성 흑색종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법은 상기 나열된 암들 중 임의의 암(난치성 종괴 환자의 암)을 치료하는데에 사용될 수 있다. 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, M200(볼로식사이랩)은 난치성 종괴를 나타내는 다수의 인간 암 환자에서 치료 효능을 어느 정도 나타내는 것으로 보이는데, 상기 암으로서의 직장암(CRC), 흑색종(MEL), 신장 세포 암종(RCC), 간암(HCC), 폐암(NSCLC), 췌장암(PC), 이하선암(PARO) 및 유방암(BC)을 포함한다.

당업자는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체(예를 들어, IIA1 또는 M200)를 사용하여 면역 조직 화학적 표준 방법에 따라서 종양 생검 시료를 탐침함으로써 종양 상피 세포 표면에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시키는 암을 측정할 수 있다. 이하 실시예 1에 기술된 바와 같이, 흑색종, 폐암, 신장암, 췌장암 및 유방암 환자로부터 획득한 종양 생검 시료의 면역 조직 화학적(IHC) 분석법은 이들 모두가 종양 상피 세포상에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시킴을 규명하였다. IHC(또는 기타 방법)을 사용하였을 때 다른 암도 종양 상피 세포상에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현시킬 것으로 예측하는 것이 합리적이며, 이러한 암은 본 발명의 암 세포 사멸 방법에 대하여 영향을 받을 것으로 인식되고 있다.

종양 시료의 IHC에 더하여, 암 세포주는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 및 당업자에게 널리 알려진 유동 세포 표준 분석 기술을 사용하여  $\alpha 5\beta 1$  세포 표면 발현에 대해 스크리닝할 수 있다. 이하 실시예 2에 상술한 바와 같이, 유동 세포 분석 스크리닝을 통하여 21개의 널리 공지된 암 세포주의 표면상에  $\alpha 5\beta 1$ 이 발현됨을 알 수 있다. 이러한 결과를 기초로 하였을 때, 상기 세포주는 본 발명의 방법에 따른 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 사용 직접 세포 사멸법에 영향을 받을 수 있음을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 암 세포주가 그 표면상에  $\alpha 5\beta 1$ 을 발현하는 것으로 측정되고, 이 세포주가 암 환자의 암 세포와 상응하거나, 이 암 세포로부터 기원하거나, 또는 유래되는 것이라면, 본 발명의 방법은 이러한 환자들을 치료하는데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 유방암 종양으로부터 기원된 NW231 세포주(실시예 2)는 그 표면에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린을 발현시킨다. 결과적으로 당업자는 본원에 교시된 방법에 따라서 유방암 환자를 치료하는데에 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 사용할 수 있음을 즉각 인식할 수 있을 것이다.

#### 항체의 조성물, 제제 및 투여

본 발명의 방법에 유용한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 분리 및 정제된 형태로 사용될 수 있으며, 암 세포 또는 종양과 직접 접촉될 수 있다. 항 $\alpha 5\beta 1$  항체(예를 들어, IIA1, M200 및 F200)를 정제하는 방법은 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 제 10/724,274 호(2003년 11월 26일 출원) 및 동 제 10/830,956 호(2004년 4월 23일 출원)에 개시되어 있다. F200은 또한 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 제 60/583,127 호(2004년 6월 25일 출원)에 개시된 방법에 따라서 Fab'-NAC 단편으로서 제조될 수도 있다. F200-Fab'-NAC는 항체의 액상 제제 및 동결 건조된 제제의 형태를 가질 때에 안정성이 증가된다. 순도 및 균질성은 분석 화학적 표준 기술 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 또는 고성능 액체 크로마토그래피로 측정될 수 있다. 제제 중에 가장 많이 존재하는 항체는 실질적으로 정제된 것으로 간주한다. 예를 들어, 전기영동 겔에서 실질적으로 하나의 밴드를 나타내는 항체 용액은 실질적으로 정제된 것이다. 본 발명의 약학 조성물에 사용된 항체는 순도가 85% 이상인 것이 바람직하고, 순도가 95% 이상인 것이 더욱 바람직하며, 순도가 99% 이상인 것이 가장 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 암 세포 직접 사멸법을 수행하는데, 이 방법에 있어서 정제된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 약학 조성물로 제제화되며, 이 약학 조성물은 치료학적 유효량으로 개체에 투여된다. 본원에 사용된 "치료학적 유효량"이란, 암 및/또는 암의 증상, 및/또는 합병증을 치료, 경감, 약화 또는 최소 부분적으로나마 지연시키는데에 충분한 약학 제제 또는 약학 조성물의 양을 의미한다. 암 치료를 위한 항 $\alpha 5\beta 1$  항체의 치료학적 유효량을 측정하는 임상학적 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 이는 통상의 실험 방법을 통해 실험적으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 암 치료에 있어서 "치료학적 유효량"은 다음의 효과들 중 하나 이상의 효과를 나타낼 수 있는 양을 의미한다: (1) 종양의 성장을 어느 정도 억제시키는 효과 예를 들어, 종양 성장을 서서히 늦추면서 완전히 정지시키는 효과; (2) 암 세포 수를 감소시키는 효과; (3) 종양 크기를 감소시키는 효과; (4) 암 세포가 말초 기관으로 침습하는 것을 억제(즉, 감소, 지연 또는 완전 정지)시키는 효과; (5) 암 세포 전이를 억제(즉, 감소, 지연 또는 완전 정지)시키는 효과; (6) 종양을 퇴화시키거나 또는 거부할 수 있는(반드시 그래야 할 필요는 없음), 항암 면역 반응을 강화시키는 효과; 및/또는 (7) 상기 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시키는 효과.

투여용 약학 조성물은 일반적으로 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제, 바람직하게는 수성 담체에 용해된 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함할 것이다. 약학 조성물 용으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제로서는 사용된 투여량 및 농도에서 노출된 세포 또는 포유 동물에 비독성인 것들이 있다. 생리학적으로 허용 가능한 담체의 예로서는 완충액 예를 들어, 포스페이트, 시트르산염 및 기타 유기산, 항산화제 예를 들어, 아스코르브산; 저분자량(약 10 잔기 미만)의 폴리펩티드; 단백질 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 당류, 이당류 및 기타 탄수화물 예를 들어, 글루코스, 만노스 또는 텍스트란; 킬레이트화제 예를 들어, EDTA; 당알콜 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 짝이온 예를 들어, 나트륨; 및/또는 비이온계 계면활성제 예를 들어 TWEEN(등록상표), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS(상표명)을 포함한다. 다양한 수성 담체 예를 들어, 완충 염수 등도 사용될 수 있다. 이러한 용액은 멸균 물질 및 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 제거된 물질이어야 한다. 약학 조성물은 종래의 널리 공지된 멸균 기술에 의하여 멸균될 수 있다.

약학 조성물은 또한 약학적으로 허용 가능한 보조 물질(생리 조건과 거의 유사하게 만드는 데에 필요한 물질)을 예를 들어 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 및 기타 약학적으로 허용 가능한 염(즉, 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함)을 함유할 수 있다. 약학 조성물은 또한 다음과 같은 성분들을 하나 이상 포함할 수 있다: 담체 단백질 예를 들어, 혈청 알부민; 완충액; 충전제 예를 들어, 미세 결정 셀룰로즈, 락토스, 옥수수 및 기타 녹말; 결합제; 감미제 및 기타 향미료; 착색제; 및 폴리에틸렌글리콜. 상기 제제중 항체 농도는 매우 다양하며, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 요구에 따라서 액체 부피, 점도 및 체중 등에 바탕을 두어 선택될 것이다[예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Science"(15th ed., 1980) 및 Goodman & Gillman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics"(Hardman와 다수, eds., 1996)].

본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체는 약 1.0~15 mg/ml의 항체 용액, 약 22~27 mM의 시트르산염, 약 135~165 mM 염화나트륨, 약 0.04~0.06%의 폴리소르베이트[TWEEN(등록상표)] 80를 포함하는, pH 약 5.5~7.5인 약학 조성물로서 조제된다. 바람직하게 상기 액상 제제의 pH 범위는 pH 약 6.0~7.0, 및 가장 바람직하게는 pH 약 6.3~6.7이다. 특히 바람직한 구체예에서, 약학 조성물은 약 10.0 mg/ml의 항체 용액, 약 25 mM의 시트르산염, 약 150 mM의 염화나트륨, 약 0.05%의 폴리소르베이트(TWEEN(등록상표)) 80을 포함하며, pH는 약 6.5이다. 다른 구체예에서, 상기 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 약학 조성물은 화학요법 제제를 추가로 포함할 수 있으며, 또는 환자에게 약학적 유효량의 기타 화학요법 제제와 함께 투여될 수 있다.

약학 조성물의 액상 제제는 SEC-HPLC에 의해 측정하였을 때 분해된 항체 단량체(degraded antibody monomer)가 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만인, 안정하고, 무색 또는 투명하거나 약간 유백색을 띠는 용액이다. 가수 분해 절단 정도가 10% 미만, 바람직하게는 5% 이하이고, 항체 응집도가 10% 미만, 바람직하게는 5% 이하인 것이 바람직하다. 제제의 농도, pH 및 삼투압은 편차가  $\pm 10\%$  미만인 것이 바람직하다. 효능은 대조군의 70~130%, 바람직하게는 80~120%이다.

항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 약학 조성물은 경구, 피하, 정맥내, 비강내, 국소, 경피, 복막내, 근육내, 폐내, 질내, 직장내, 안구내, 뇌실내, 또는 초내 투여를 포함하는 다양한 경로를 통하여 개체에 투여될 수 있다. 경구 투여될 때 항체는 소화로부터 보호되어야 한다는 것은 널리 인식되어 있다. 이와 같은 투여는 통상적으로 분자와 조성물을 복합화시켜 이를 산 및 효소에 의한 가수 분해에 견딜 수 있도록 만들거나, 또는 분자를 적당히 내성인 담체 예를 들어, 리포솜 또는 보호막에 캡핑시킴으로써 이루어질 수 있다. 소화로부터 보호하는 제제는 당 업계에 널리 공지되어 있다.

약학 조성물은 투여 방법에 따라서 다양한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여에 적당한 단위 투여 형태로서는 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 로진즈를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에 있어서 특정 구체예에 사용되는 정확한 투여량은 치료 목적에 따라 달라질 것이며, 널리 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있다[예를 들어, Ansel 외 다수, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery;" Lieberman, "Pharmaceutical Dosage Forms" (vols. 1-3, 1992), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd, "The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding" (1999); 및 Pickar, "Dosage Calculations" (1999)]. 당 업계에 공지된 바와 같이, 암과 폐에 대한 적응, 전신 대 국소 전달 및 신규 프로테아제 합성 속도와, 연령, 체중, 전체적인 건강 상태, 성별, 식습관, 투여 시간, 약물 반응 및 증상의 심각성은 필수적인 것으로서, 당업자에 의해 통상의 실험으로 확인 가능할 것이다.

본 발명의 방법의 하나의 구체예에서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 약학 조성물은 환자의 체중(kg)당 항체의 중량(mg) 비율로 환자에게 투여된다. 그러므로, 바람직한 투여량으로서는 약 0.5 mg/kg 이상, 1.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg, 10.0 mg/kg 및 15 mg/kg 이다. 바람직하게, 상기 투여량은 1 시간에 걸쳐 환자에게 정맥 투여된다. 추가의 투여량은 장기간에 걸쳐 투여되므로 환자의 혈청 농도는 일정하게 확립된다. 예를 들어, 1년간 1주일에 한번 10 mg/kg씩 주입될 수 있다.

하나의 바람직한 구체예에서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 투여 농도 및 스케줄을 선택하여 이러한 투여량이 원숭이(예를 들어, 사이노몰거스(cynomolgus))에서 수행된 약물 동력학 연구에서 알 수 있는 바와 같이, 최대 혈청 농도가 안전 평균 최대 혈청 농도 이하가 될 수 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어, 사이노몰거스 원숭이에서 4주 동안 투여한 후 M200를 50 mg/kg 투여하였을 때의 평균 최대 농도는 1862  $\mu\text{g/ml}$ (범위: 1000~2606  $\mu\text{g/ml}$ )이다. 원숭이는 이와 같은 혈청 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 뿐만 아니라, 또는 대안적으로, 혈청의 최소 농도가  $>1 \mu\text{g/ml}$ 이고, 시험관내 활성 검정법에서  $\alpha 5\beta 1$ 의 피브로넥틴에의 결합 억제율이 80%인 농도가 되도록 투여량을 선택할 수 있다.

본 발명의 치료학적 암 세포 사멸 방법의 하나의 구체예에서, 항 $\alpha 5\beta 1$  항체를 포함하는 약학 조성물은 일정한 투여량, 통상적으로 환자 1명당 약 0.1~10 mg/일의 투여량으로 환자에게 정맥 투여된다. 약학 조성물이 은밀한 부위 예를 들어, 체강 또는 기관 강(혈류는 제외)에 투여되는 구체예에서, 상기 일정한 투여량은 환자 1명당 0.1~약 100 mg/일일 수 있다. 국소 투여가 바람직할 경우의 구체예에서, 실질적으로 보다 많은 양이 투여될 수 있다. 장관외 투여 가능한 조성물을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있거나 또는 분명하다[예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Science", 및 Goodman and Gillman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", (상동)].

본 발명의 암 세포 사멸 방법에 사용되는 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 처치법의 일부로서 투여될 수 있다. 치료학적 방법에서, 약학 조성물은 이미 암이 발병한 환자에게 질병의 진행 및 합병증을 최소한 부분적으로나마 지연시키거나, 또는 치료에 충분한 양으로 투여된다. 일반적으로, 치료학적 처치 방법에 있어서, 치료의 진행 정도는 종양 크기 또는 종양

성장 속도의 감소로서 측정될 수 있다. 이를 가능하게 만드는 양을 "치료학적 유효량"이라 정의한다. 이러한 용도에 효과적인 양은 암의 심각성과 환자의 전체적인 건강 상태에 따라서 달라질 것이다. 약학 조성물을 단일 투여할지 또는 복수회 투여할지 여부는 환자가 견딜 수 있는 투여량 및 발병 빈도에 따라서 결정될 수 있다.

조기 치료 방법은 질병이 진행중인 것으로 의심되는 환자, 또는 질병의 매우 이른 단계에 있는 환자에서 암의 진행을 억제하거나 또는 지연시킬 수 있다. 조기 치료법에 요구되는 특정 투여량은 의학적 증상 및 환자의 병력, 억제될 특정 암, 그리고 기타 요인 예를 들어, 연령, 체중, 성별, 투여 경로, 효능 등에 따라서 달라질 것이다. 조기 치료 방법은 또한 이전에 암의 재발을 막았던 암환자 또는 암 진행 가능성이 상당한 것으로 의심되는 환자에 예방적 차원에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 유방암에 대한 유전적 소인을 가지고 있는 환자[전종양 암 마커(예를 들어, PCR에 의하여 검출되는 마이크로전이(micro-metastases)가 확인된 환자]는 특히 조기 치료 방법에 적합하다.

본 발명의 다른 구체예에서, 직접 암 세포 사멸 방법이 수행될 수 있는데, 이 방법에서는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 이외에 화학요법 제제가 투여된다. 이 구체예에 유용한 통상의 화학요법 제제는 상기 문헌에 개시되어 있다. 이러한 병행 요법은 특히 질병의 증상이 완전히 나타나지 않는 환자의 조기 치료법 또는 예방학적 치료법에 특히 바람직할 수 있다. 이와 같은 조기 치료법 또는 예방법에 있어서, 다수의 환자들은 통상의 화학요법 제제만을 사용하였을 때에 수반되는 유해한 부작용을 일으킬 수 없었다. 비교적 비독성인 항 $\alpha 5\beta 1$  항체와 함께 통상의 화학요법 제제를 보다 소량 투여함으로써, 또는 매우 이른 단계에 환자가 보다 잘 견디기에 효과적인 투여 방법으로 투여함으로써 암은 예방적으로 치료될 수 있다.

이하의 실시예는 본원에 개시된 발명을 예시하기 위한 것이지, 발명을 한정하기 위한 것은 아니다.

## 실시예

### 실시예 1: IHC에 의해 검출되는 종양 시료상에서의 $\alpha 5\beta 1$ 발현

흑색종, 폐암, 신장암, 췌장암 및 유방암 환자로부터 취득한 종양 생검 시료를 면역 조직 화학적 방법(IHC)에 의해  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 발현 여부에 대하여 관찰하였다.

#### 재료 및 방법

동결된 조직 시료(Mayo Clinic 또는 Cleveland Clinic 제공)를 최적 절단 온도(OCT; optimal cutting temperature)의 화합물 중에서 냉동시킨 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 저온 유지 장치에 있던 조직 검편( $7\ \mu\text{m}$ )을 75% 아세톤/25% 에탄올 중에서 1분 동안 고정시켰다. 항 $\alpha 5\beta 1$  마우스 항체 IIA1( $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 또는 대조구 마우스 IgG1(항트리니트로페닐, ATCC 하이브리도마 클론 1B7.11)과 함께 상기 시료를 30분 동안 항온 처리하였다. 바이오틴 표지된 2차 항체, 염소-항 마우스 IgG( $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 30분; Jackson ImmunoResearch)를 사용하여 항체 결합 여부를 관찰하였으며, 벡타스타인 엘리트 ABC 키트(Vectastain Elite ABC Kit ; Vector Laboratories) 및 안정 DAB(디아미노벤지딘 및  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Research Genetics)를 사용하여 현상하였다. 염색은 실온에서 DAKO 자동화 염색기로 수행하였다.

#### 결과

이하 표 1에 나타난 바와 같이, 거의 모든 종양 검편이 염색된 것으로 보아 종양 맥관 구조상에  $\alpha 5\beta 1$ 이 있는 것으로 분석되었다. 놀랍게도, 종양 시료의 대부분이 종양 상피 세포 그 자체에  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 발현이 되어 염색된 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 항 $\alpha 5\beta 1$  항체가 신생 혈관 구조 이외에 암 세포를 직접 표적화할 것임을 시사하는 것이다.

**[표 1]**

항 $\alpha 5\beta 1$ 항체 IIA1으로 염색한 종양 시료의 IHC 결과										
종양의 유형 (시료번호)	종양 맥관 구조					종양 상피 세포				
	Neg	1+	2+	3+	4+	Neg	1+	2+	3+	4+
신장(n=39)	2	2	13	18	4	27	8	4	0	0
췌장(n=32)	0	1	17	12	2	15	2	7	7	1
폐 (n=39)	0	1	0	28	1	19	14	3	2	1
결장(n=21)	2	2	3	8	6	19	0	1	1	0



흑색종 (n=19)	3	0	2	13	1	13	5	1	0	0
난소 망 전이 (n=4)	0	0	1	3	0	2	2	0	0	0
방광(n=8)	0	0	4	3	1	5	2	1	0	0

## 실시에 2: 유동 혈구계측 분석법에 의하여 검출된 암 세포주 상에서의 α5β1 발현

세포 표면상에 α5β1 인테그린이 발현되었는지 여부에 대하여 유동 혈구계측 분석법으로 24개의 암 세포주 패널을 관찰하였다. 이하 표 2에 나타난 바와 같이, 이들 24개의 세포주는 매우 다양한 암 세포 예를 들어, 방광암, 유방암, 결장암, 섬유육종, 폐암, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 신장암 및 비장암으로부터 유래된 세포이다.

## 재료 및 방법

Tris-HCl(pH 8.0)중 5mM EDTA로 세포를 분리해낸 후 이를 4℃에서 5분 동안 Hank 밸런싱 염 용액[3% 열 불활성화된 FBS, 1% 정상 염소 혈청(Sigma) 및 1% BSA 함유]중에서 원심분리시켜 블로킹하였다. 세포를 4℃에서 30~60분 동안 FAC 완충액(0.1% BSA 함유 PBS)중 마우스 항α5β1 항체, IIA1(10μg/ml)와 함께 항온 처리하였다. 원심 분리에 의해 과량의 모노클로날 항체를 제거하였고 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 다음 4℃에서 30~60분 동안 PE-항마우스 IgG (H+L) 항체에 재현탁[Southern Biotech, 1:400 희석]시켰다. 세척후 세포를 다시 요드화프로피듐(1μg/ml)을 함유하는 FACS 완충액에 재현탁시켰다. FACSCalibur(Becton Dickinson사 제품)로 평균 형광 강도(MFI)를 측정하였다. 이때의 백그라운드 MFI는 약 5였다.

## 결과

표 2에 나타난 바와 같이, α5β1 인테그린의 표면 발현이 상당한 정도(24개의 세포주중 21개)로 관찰되었다. 3개의 암 세포주 즉, CHL-1, COLO357 및 C32의 MFI 값은 백그라운드에 거의 근접하였는데, 이는 α5β1 인테그린이 소량 또는 거의 그 표면상에 발현되지 않았음을 나타내는 것이다. 표면에 α5β1 인테그린이 발현되는 21개의 세포주는 항α5β1 항체에 의한 직접 세포 사멸이 유도되기 쉬운 세포주일 것이다. 또한, 상기 세포주가 유래된 암은 항α5β1 항체 치료법에 영향을 받을 수 있다.

**[표 2]**

IIA1을 사용한 다양한 암 세포주의 FACS 분석 결과, 및 M200을 사용한 시험관내 증식 검정법				
세포주	기원암	α5β1 표면 발현 (MFI)	성장 억제%	
			혈청(무)	혈청(유)
A549	폐	71.41	40	0
H460	폐	87.5	40	0
SW839	신장	65.8	30	0
MIA PACA-2	췌장	61.9	20	0
HCT-116	결장	42.5	15	0
786-0	신장	144.4	10	0
EKVX	폐	36.7	10	0
SW1990	비장	nd <sup>1</sup>	10	0
SN12C	신장	129.1	5	0
A498	신장	67.1	5	0
A375	흑색종	156.1	5	0
A2058	흑색종	36.2	0	0
CHL-1	흑색종	6.8	0	0
TK-10	신장	36.6	0	0
COLO 357	췌장	7.8	0	0



HT144	흑색종	102.1	0	0
C8161	흑색종	122	0	0
HT1376	방광	111.9	0	0
DU145	전립선	87.5	0	0
UACC-62	흑색종	88.5	0	0
HT1080	섬유육종	421.7	0	0
ES-2	난소	132.8	0	0
CAPAN-1	췌장	nd <sup>1</sup>	0	0
CAPAN-2	췌장	nd <sup>1</sup>	0	0
ASPC-1	췌장	nd <sup>1</sup>	0	0
C32	흑색종	5.7	0	0
LOX	흑색종	261.6	40 <sup>2</sup>	35
NW231	유방	132.2	10 <sup>2</sup>	35

1 nd=측정 안됨

2 성장 억제% 수치는 4일 검정법이 아닌 2일 검정법으로 측정한 결과치임

### 실시예 3: 시험관내 암 세포 증식에 대한 M200 억제

혈청의 존재 또는 부재하 세포 증식 검정법에서 키메라 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 M200에 대한 28개의 암 세포주 패널의 감수성에 대하여 평가하였다.

#### 재료 및 방법

10% FBS의 존재 또는 부재하에 암 세포주를 보강제를 함유하는 IMDM중 96웰 평판에 2500 세포/웰의 밀도로 도말하였다. 도말시, 세포를 여러 농도의 M200 또는 비기능성 블로킹 항 $\alpha 5\beta 1$  항체, VC5로 공격하였다. 4일후, 제조자의 지침에 따라서 CellTiter96 AQueous 비방사성 세포 증식 검정법(CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ; Promega)로써 세포의 생존능을 평가하였다. 모든 성장 연구는 3회 이상 3개의 복사본으로 수행하였다.

#### 결과

표 2에 나타낸 바와 같이, M200은 혈청의 부재하에서는 13개 암 세포주의 성장을 억제하였으며, 혈청의 존재하에서는 2개 세포주의 성장을 억제하였다. 세포주중 2개 즉, LOX 및 NW231은 혈청의 부재 및 존재하에서 M200에 감수성인 것을 알 수 있었다. 이러한 결과에 근거하였을 때, 상기 세포주 기원암(흑색종 및 유방암)은 M200 처리에 응답을 하는 것으로 추측된다.

### 실시예 4: NW231 및 LOX 이종 이식편 모델에서 종양 세포 증식의 생체내 억제

NW231 및 LOX 세포를 SCID 마우스에서 정위 이식편(orthotopic xenograft)으로서 성장시킨 후 항 $\alpha 5\beta 1$  항체 M200 및 IIA1을 복강내 주사하여 공격하였다.

#### 재료 및 방법

Taconic Farms(뉴욕, 저먼타운 소재)로부터 제공받은, 면역적으로 타협된 마우스 CB-17 SCID(변종 C.B-Igh1/IcrTac-Prkdc)를 사용하였다. 6~10주령(체중 약 20g)된 암컷 마우스로써 연구를 시작하였다. 우선 동물에 M200, IIA1 또는 대조구 IgG(투여량: 10 mg/kg)를 1시간에 걸쳐 복강내 예비 투여한 후, 유방의 지방층에 NW231(IMDM중  $1 \times 10^7$  세포)을 접종하였다. 1주일에 3회씩 10 mg/kg의 양으로 3주 동안 계속 투여하였다. 종양의 부피는 구경 측정기로 1주일에 2회씩 측정하였으며 이때 얻은 측정값을 " $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭} \times \text{높이}$ " 공식에 대입하여 계산하였다. IACUC 규정에 따라 매일 임상 관찰 및 사망 여부 관찰을 실시하였다.

#### 결과

이 모델에서 IIA1은 NW231 및 LOX 이식편 종양 성장을 2배 억제한다는 것을 알아냈다. 또한 이 모델에서 M200은 종양 성장을 2배 억제하지는 못함을 알 수 있었다. IIA1은 이식편 종양 맥관 구조에 있는 마우스  $\alpha 5 \beta 1$ 을 인식하지 않기 때문에, 종양 성장에 대한 IIA1의 전체적인 억제 효과로 인해 종양의 암 세포상에서 직접 항증식 효과를 얻을 수 있다.

#### 실시예 5: IIA1 및 DOXIL(등록상표)을 병용할 경우, 생체내 NW231 이식편 모델에서의 종양 확립을 억제한다.

이하 실험은 항 $\alpha 5 \beta 1$  인테그린 항체인 IIA1과 화학요법 제제인 DOXIL(등록상표)을 병용하였을 때, 생체내 인간 NW231 종양의 확립을 억제하는 효능을 측정하기 위하여 수행되는 것이다. DOXIL(등록상표)은 독소우리딘 HCl, 스트렙토마이세스 퓨세티우스(*Streptomyces peucetius*)에서 분리된 항생제인 세포 독성 안트라사이클린을 리포솜으로 캡슐화한 제제이다. 상기 NW231 세포주는 유방암으로부터 유래된 것이며, 유방암 치료에 대한 연구에 좋은 모델이다.

#### 재료 및 방법

Taconic Farms로부터 제공받아 미세 분리 케이지에 가두어 두었던, 4~6주된 암컷 SCID 마우스의 유방 지방층에  $1 \times 10^7$ 의 NW231 세포를 주입하였다. 종양 세포 접종을 처음 수행할 당시 동물에 TIB 대조구(n=20) 또는 M200(n=20)을 5mg/kg 주입하였다. 이후에는 1회 주입당 0.7mg/kg씩 주입하였다. 종양 세포 주입후 5일 경과시 DOXIL(등록상표) 처리를 시작하였다. 화학요법 투여제는 처음 주입시에는 4mg/kg, 이후 주입시에는 2mg/kg씩 주입하였다. 시약은 4회 복강내 투여하였다. 종양의 부피는 1주일에 2회 측정하였으며, IACUC 규정에 따라 매일 임상 관찰 및 사망 여부 관찰을 실시하였다.

#### 결과

IIA1 처리 결과, 마우스에서 NW231 종양의 확립이 지연되는 상당한 효과를 얻을 수 있었다. NW231 종양 주입후 24일 경과시, 대조구 TIB 처리 이식편의 평균 종양 부피는 기하급수적인 방식으로 증가하였으며(약 425 mm<sup>3</sup>), 반면에 IIA1 처리 이식편의 평균 종양 부피는 약 175 mm<sup>3</sup>까지 증가하였다.

DOXIL(등록상표) 처리 자체는 또한 종양 확립을 억제하는데에 상당한 효과를 가져다 준다. DOXIL(등록상표)만을 처리한 이식편에 있어서, 평균 종양 부피는 주입후 처음 45일간은 약 25 mm<sup>3</sup>까지 증가하였으나, 이후 점진적으로 증가하여 74일째에는 약 275 mm<sup>3</sup>까지 증가하였다.

IIA1 및 DOXIL을 마우스에 병용 요법으로 처리한 결과, 이들 중 어느 하나만을 처리하였을 때에 비하여 종양 확립 속도에 더욱 큰 억제 효과를 나타내었다. IIA1 및 DOXIL(등록상표) 처리한 이식편에 있어서, 평균 종양 부피는 54일 경과시까지 거의 증가하지 않았으며, 이후 점진적으로 증가하여 74일 경과시에는 약 125 mm<sup>3</sup>가 되었다. 이러한 결과를 통하여, 항 $\alpha 5 \beta 1$  항체인 IIA1 및 화학요법 제제인 DOXIL(등록상표)을 병용하여 처리하였을 때에 생체내 효능(즉, 복합적 종양 억제 효과)이 증가하게 됨을 알 수 있다.

#### 실시예 6: VX2 토끼 종양 모델에서 측정된 M200 효능

M200이 마우스 또는 래트의  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린과 교차 반응을 하지는 않지만, 토끼에서  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린이 발견됨을 알 수 있다. 그러므로, 토끼의 VX2 암종은 M200의 생체내 암 세포 직접 사멸 효능을 측정하는데에 훌륭한 모델이 될 수 있다. VX2는 다양한 부위의 1차 종양의 처리에 관한 연구에 있어서 널리 허용되고 있는 토끼 모델이다[예를 들어, Chen JG 외 다수, Lab Anim. 2004 Jan;38 (1) : 79-84; Purdie, TG 외 다수, Phys Med Biol. 2001 Dec; 46 (12): 3161-75); Geschwind, JH 외 다수, Cancer Res. 2002 Jul 62(1) : 3909-3913 참조].

#### A. M200 VX2 준비 조사

우선, 준비 조사를 수행하여 토끼 VX2 종양 모델에서의 M200 효능에 관한 연구를 수행하기 위한 일반적 매개 변수를 측정하였다.

#### 종양 접종

세포 현탁액(100  $\mu$ l)을 우선 토끼(좌측 뒷다리)에 피하 주입하고, 약 3 mm 깊이로 근육(우측 뒷다리)내 주입하였다. 근육내 접종은 다음과 같이 행하였다. 케타민/이소플루란으로 마취된 토끼를 외과용 메스로 우측 대퇴부에 평행하게 즉, 대퇴부

측을 중심으로 전방 및 후방 측면 즉, 대퇴부-골반(엉덩이) 관절로부터 바깥쪽으로 대퇴부 전체 길이의 약 3분의 1만큼의 지점에서 약 2cm 길이로 절개하였다. 근육들이 서로 분리되어 약 0.5 cm 깊이의 공간을 형성하였다. 공여 동물로부터 얻은 하나의 VX2 종양 단편을 이 공간에 넣었다. 그 다음 멸균된 외과용 스테이플 또는 봉합사로 피부를 단단히 봉합하고, 상처 부위에 국소적으로 항생제를 도포하였다.

#### 종양 측정

실험 시작후 5일째에, 최소 1주일에 2회씩 랩탑 컴퓨터에 연결된 전자 버니어캘리퍼로 종양의 치수(길이, 폭 및 높이; 단위 = mm)를 측정하였다. 마찬가지로, 훈련을 받은 동일한 연구원이 연구 과정 내내 종양 측정을 수행하였다. 종양 부피는 다음과 같은 공식을 사용하여 계산하였다: (길이 × 폭 × 높이 × 0.52). 동물 실험을 끝내고, 종양을 조심스럽게 절개해낸 후 다듬어서 무게를 측정하였다. 또한, 최소 1주일에 한 번씩 동물의 체중도 측정하였다. 각 종양의 시료들을 각각 포르말린 또는 OCT중 시료 카세트에 넣은 다음, 액체 질소로 급속 냉동시켜 보존하였다.

#### VX2 종양의 생체내 계대 배양

준비 조사 및 M200 효능 연구에 사용된 VX2를 1달 주기로 생체내 계대 배양하였다. 세포 현탁액(100  $\mu$ l) 또는 종양 절편(약 5~10 mm<sup>3</sup>)중 어느 하나를 사용하여 각각의 뒷다리에 근육내 주입하였다. 이 동물 및 종양을 눈으로 모니터하고, 생체내 계대 배양을 위해 지름 2 cm가 되기 이전에 종양을 분리하였다. 동물을 죽여 종양을 분리해낸 후, 종양을 5~10 mm<sup>3</sup>의 절편으로 만들어 생체내 계대 배양을 수행하였다. 이후 이 절편들을 2마리의 토끼에 다시 이식하였다.

#### M200 처리된 토끼로부터 얻어진 VX2 종양의 IHC 분석

M200을 10 mg/kg의 투여량으로 종양 보유 토끼에 정맥내 투여하고, 1시간 후에 이 종양을 절개하였다. 종양 검편을 (i) 종양 결합 M200에 특이적인 항인간 2차 항체 ;(ii) 총  $\alpha$ 5 $\beta$ 1을 검출하기 위한, IIA1-항마우스 2차 항체; 또는 (iii) 대조구 IgG 및 항마우스 2차 항체중 어느 하나로 염색하였다.

#### 결과

IHC로 측정한 결과, 피하 종양 및 근육내 종양 모두가 동물에 정맥내 주입된 M200에 대하여 영향을 받은 것으로 관찰되었다. 염색된 검편의 IHC 분석 결과, VX2 종양 세포 및 토끼 종양 맥관 구조 모두에  $\alpha$ 5 $\beta$ 1이 고도로 발현되었음을 알 수 있었다.

#### B. M200 VX2 효능 연구

IHC 준비 조사 결과를 근거로 하여, 생체내 M200 효능을 평가하는데 VX2 토끼 모델을 사용하였다.

#### 방법

토끼(총 30 마리)에 VX2 세포 현탁액(100  $\mu$ l) 또는 종양 절편(약 5~10 mm<sup>3</sup>)을 피하 접종 또는 근육내 접종하였다. 20개의 테스트 그룹에 M200을 10 mg/kg씩 1주일에 2회씩 3주간에 걸쳐 정맥내 주입하였다. 10 마리의 동물 대조군에는 M200의 경우와 동일한 방법으로 대조구 IgG를 주입하였다. 종양 측정, 배양 중지, 측량, 종양 보존 및 연구 수행 기간에 관하여는 전술한 준비 조사에 기술된 방법에 따라서 수행하였다. 뿐만 아니라, 혈청 분석을 위해 1주일 간격으로 귀 혈관에서 혈액을 1ml씩 채혈하였다.

#### 결과

동물내 종양 성장 억제와 M200의 혈류내 농도 사이에 강한 상관 관계가 관찰되었다. 일반적으로, M200의 농도가 50  $\mu$ g/ml 이상으로 유지되면, 종양의 성장은 억제된다. M200은 토끼에서 면역원성을 갖기 때문에, 토끼 테스트군중 일부에서는 M200 투여 후 2주 경과시 M200에 대하여 면역 반응을 나타내었으며, 그 결과 동물 모두에서 혈청 전환이 일어났다. 항 유전자형 반응이 일어나서 M200이 소멸(clearance)된(즉, M200 < 50  $\mu$ g/ml, 14일) 테스트군 동물에 있어서, 종양이 더 크게 성장함이 관찰되었다. 그러므로, VX2 암종 모델의 관찰 결과로부터 M200은 생체내 암 모델에서 종양의 성장을 상당한 정도로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

#### 실시에 7: SCID 마우스 VX2 이식편 모델에서의 M200 및 IIA1의 효능

실시에 6에 기술된 바와 같이, M200은 토끼 VX2 암종 모델에서 효능을 나타내었다. SCID 마우스 VX2 이식편 모델에서 M200 및 IIA1의 암 세포 직접 사멸능을 더욱 상세히 측정하였다. M200 및 IIA1은 VX2 이식편 종양 맥관 구조에 존재하는 마우스  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린을 인지하지 못하기 때문에, VX2 이식편 종양 성장에 대한 임의의 억제 효과가 M200 및 IIA1이 VX2 암 세포에 미치는 직접적인 항 증식 효과를 초래할 수 있는 것이다.

#### 재료 및 방법

Taconic Farms(뉴욕, 저먼타운 소재)로부터 제공받은, 면역적으로 타협된 마우스 CB-17 SCID(변종 C.B-Igh1/IcrTac-Prkdc)를 사용하였다. 6~10주령(체중 약 20g)된 암컷 마우스를 사용하여 연구를 시작하였다. 우선 동물에 M200, IIA1 또는 대조구 IgG(투여량; 10 mg/kg)를 1시간에 걸쳐 복강내 예비투여한 후, 유방의 지방층에 VX2(Iscove 개질 Dulbecco 배지중  $1 \times 10^7$  세포)를 접종하였다. 1주일에 3회씩 10 mg/kg의 양으로 3주 동안 계속 투여하였다. 종양의 부피는 구경 측정기로 1주일에 2회씩 측정하였으며 이때 얻은 측정값을 " $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭} \times \text{높이}$ " 공식에 대입하여 계산하였다. IACUC 규정에 따라 매일 임상 관찰 및 사망 여부 관찰을 실시하였다.

#### 결과

M200 또는 IIA1을 투여하였을 경우에는, 대조구 IgG를 투여한 마우스에 비하여, VX2 종양 성장 속도가 감소한다거나 또는 종양 크기가 전체적으로 줄어든다거나 하지는 않았다. 이러한 결과를 통하여, M200 및 IIA1 중 어느 것도 마우스 이식편 모델에서 VX2 세포를 직접 사멸시킬 수 없음을 알 수 있다.

#### 실시에 8: 제1단계 - 난치성 종괴 환자에서 M200 투여량의 점진적 증가 연구

##### A. 개요

여러가지 난치성 종괴를 갖는 환자 21명을 대상으로 M200(볼로식사이맵)을 0.5mg/kg로부터 15.0mg/kg까지 중에서 6 가지 이하의 투여량으로 처리하였을 경우의 효과를 측정하기 위하여, 2 부로 된 제1단계 전임상 연구를 수행하였다. 제1부에서의 총 처리 지속 기간은 6주였으며, 이때 최종 투여후 45일 동안 물리적 평가를 수행하였다. 제2부는 제1부의 연장 실험으로서, 제1부에서 안정적인 질병 반응을 나타내었던 11명의 환자들 중 6명에게 최대 52주 동안 M200을 계속 투여하였다.

##### B. 연구 매개 변수 및 방법

###### 1. 환자 선별

본 연구를 위하여 다음과 같은 포함/배제 기준에 부합하는 사람들로써 환자를 선별하였다:

- 통상의 컴퓨터 단층 촬영(CT) 이미지 또는 자기 공명 이미지(MRI)상에 하나 이상의 측정 가능한 병변이 있을 것;
- 예상 생존 기간이 3개월 이상일 것; 동부 공동종양학 그룹(Eastern Collaborative Oncology Group; ECOG) 전신 상태가 2 이하일 것;
- 중추 신경계(CNS) 종양 또는 전이(머리를 이미지화하여 스크리닝한 결과)가 없을 것;
- 연구 개시전 4주 이내에 대수술을 받지 않았을 것;
- 연구 개시전 1주 이내에 작은 수술을 받지 않았을 것; 연구 개시전 4주 이내에 화학요법, 면역요법 또는 방사능 치료를 받지 않았을 것;
- 활성 출혈 질환 또는 혈전 색전증 현상이 없을 것;
- 기타 임상학적으로 심각하거나 또는 불안정한 의학적 증상이 없을 것;

h. 이미 쥐 또는 키메라 mAb 치료를 받은 환자의 항M200 항체(즉, 교차 반응성 인간-항 쥐-항체[HAMA] 또는 인간-항 키메라 항체[HACA])에 대한 스크리닝시 테스트 결과가 음성일 것.

본 연구에 총 22명의 환자가 등록하였다. 22명의 환자들의 종양의 종류는 다음과 같았다: 결장암(4 명; CRC), 흑색종(4 명; MEL), 신장 세포 암종(3 명; RCC), 식도암(2 명; EC), 간세포암(2 명; HCC), 폐암(1 명; NSCLC), 전립선암(1 명; PRO), 갑상선암(1 명; THY), 췌장암(2 명; PC), 이하선암(1 명; PARO) 및 유방암(1 명; BC). 22명의 환자들중 21명을 치료하였으며, 치료 받은 환자 21명 중 20명은 45일 동안 5회 투여 및 후속 치료를 모두 받았다. 치료 받은 환자 21명(12명은 남성, 9명은 여성)의 평균 연령은 59세(29~81 세)였으며, 동부 공동종양학 그룹(ECOG) 평균 점수는 1(0~2)이었다.

## 2. M200 투여 농도 및 스케줄의 선택

최대 투여량(15.0 mg/kg)으로 투여하였을 경우, 사이노몰거스 원숭이에서와 같이 최대 혈청 농도가 안전 평균 최대 혈청 농도(safe mean peak serum concentration) 이하로 되는지, 투여량 1.0 mg/kg 이상일 때 최대 혈청 농도가 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되는지, 그리고 시험관내 활성 검정법에서 피브로넥틴에  $\alpha 5\beta 1$ 이 결합하는 것을 80% 억제하는 농도를 확인하기 위하여, 투여 농도 및 스케줄을 선택하였다.

본 연구에 사용된 투여 농도 및 스케줄은 다음과 같았다. M200은 1일, 15일, 22일, 29일 및 36일째 되는 날에 21명의 환자들에게 투여하였다. 투여 농도 및 농도에 따른 환자의 수는 다음과 같다: 0.5 mg/kg (1 명), 1.0 mg/kg(2 명), 2.5 mg/kg(3 명), 5.0 mg/kg(3 명), 10.0 mg/kg(6 명) 및 15 mg/kg(6 명). 투여는 1시간에 걸쳐 정맥내 침습의 형태로 행하여졌다. 첫 번째 투여 및 두 번째 투여는 2주 간격으로 이루어졌으며, 또한 단일 투여 약물 동력학 데이터에 대해 견본 추출을 하였다. 첫 번째 투여 후에 수행된 실시간 PK 측정은 다섯 번째 투여 후 각 환자의 최대 혈청 농도를 예측하는데에 사용되었다. 다섯 번째 투여 후 예측된 최대 혈청 농도가 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  미만인 경우, 환자에 M200을 5회 모두 투여하였다. 나머지 3회는 1주일마다 투여되었으며, 이후 45일의 평가 기간을 두었다.

인간 혈청내 M200의 농도는 상기 투여 계획에 근거하여 예측하였으며, 사이노몰거스 원숭이에서 관찰된 변이율 범위(즉, 평균 54~140%)와 동일한 범위를 적용하였다. 인간의 경우 최대 투여량이 15.0 mg/kg인 경우, 5회 투여 후 평균 최대 농도는 592  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 인간에서의 변이율 범위는 320~829  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 것으로 예측된다. 표 3은 원숭이 연구로부터 얻어진 PK 데이터를 이용한 것으로서, 이를 통하여 인간에서의 각 투여 농도로 투여시 최대 및 최소 혈청 농도( $C_{\text{max}}$  및  $C_{\text{min}}$ )를 예측하였다.

**[표 3]**

인간에서 M200의 최대 및 최소 혈청 농도의 측정값							
농도	투여량 (mg/kg)	PK 수치 <sup>a</sup>	투여 횟수				
			1	2	3	4	5
1	0.5	$C_{\text{max}}$	11	11	12	13	13
		$C_{\text{min}}^b$	1.5	1.6	2	2.1	2.2
2	1.0	$C_{\text{max}}$	22	22	25	26	26
		$C_{\text{min}}$	3	3	4	5	5
3	2.5	$C_{\text{max}}$	54	57	64	67	68
		$C_{\text{min}}$	9	10	13	14	15
4	5.0	$C_{\text{max}}$	108	114	132	141	147
5	10.0	$C_{\text{max}}$	216	236	282	317	346
		$C_{\text{min}}$	51	66	101	131	156
6	15.0	$C_{\text{max}}$	324	366	450	524	592
		$C_{\text{min}}$	91	126	200	268	332
		$C_{\text{max}}$ 범위 (54~140%)	175~453	197~512	243~629	283~733	320~829

<sup>a</sup>값 =  $\mu\text{g}/\text{mL}$

<sup>b</sup> = 첫 번째 투여 후 1 주일 경과시 예측되는 수치에 대해 계산함

상기 표에 의하면, 15.0 mg/kg인 경우 인간에서의 최종 반감기는 약 13일이며, 투여량이 적어질수록 반감기는 더 짧아짐을 예측할 수 있다. 혈청 중 M200은 실제로 5.0 mg/kg 이상 축적되며, 이때 10.0 mg/kg미만 투여하였을 경우 4주 이내에 정상 상태의 농도에 도달하였으며, 10.0 mg/kg 이상 투여하였을 경우에는 5주 이내에 정상 상태의 농도에 도달하였다.

### 3. M200 제조 및 투여

우수의약품제조품질관리기준(Good Manufacturing Practices; cGMP)에 따라서 생물 시료인 M200을 다량 제조하였다. 본 연구에 사용된 M200 제제의 조성은 M200 10 mg/ml, 시트르산염 25 mM, 염화나트륨 150 mM, 0.05% 폴리소르베이트(TWEEN(등록상표)) 80이었으며, 이 때의 pH는 6.5였다. 이 제제는 멸균된 무색이었으며, 맑거나 약간 유백색인, 정맥 내 투여용의 보존제를 함유하지 않는 액체이다. 20 ml들이 1회용 바이알 각각에 M200 15 ml씩을 충전시켰다(10.0 mg/ml). 10 ml들이 1회용 바이알 각각에 M200 10 ml씩을 충전시켰다(10.0 mg/ml). 원형 그대로의 바이알 들을 2~8℃(36~46°F)의 냉장고에 넣은 후, 동결 또는 진탕시키지 않고 그 상태로 방치하였다.

이와 같이 준비한 M200을, 이후 실온(25℃)으로 보관하였다면 6 시간 이내에, 또는 냉장(2~8℃)시켰다면 48 시간 이내에 투여하였다. 이때 준비된 용액은 폐기하였다.

환자에 투여되는 M200의 적정 투여량은 환자 1인당 환자 체중(kg) × 적정 투여 농도(mg/kg)로 계산하였다. 연구 1일째의 환자의 전 투여량(pre-dose)을 사용하여 연구 전반에 걸친 투여량을 계산하였다. 0.5~10.0 mg/kg 투여군에 등록된 환자들, 그리고 15.0 mg/kg 투여군에 등록된 체중 80 kg 이하의 환자들에 있어서는, 1 시간에 걸쳐 총 120 ml의 일정 부피로 투여하였다.

환자에게 희석 연구 약물은 120 ml 투여하였으나, 이때 사용된 주입 백은 총 부피 150 ml 들이의 것으로 준비하였다. 주입 배관(infusion line)을 준비하기 위해 추가로 30 ml를 사용하였으며, 이는 환자에게 투여하지 않았다. 따라서, 주입 백에 주입한 연구 약물의 총량은 환자의 투여량이었다(즉, 환자 체중(kg) × 투여 농도[mg/kg] × 1.25). 주입용 염화나트륨, USP (0.9%)를 첨가하여 주입 백에 주입된 총 부피를 150 ml로 만들었다.

15.0 mg/kg 투여군에 등록된 체중 80 kg 초과환자에게는 1 시간에 걸쳐 총 180 ml의 일정 부피로 투여하였다. 환자에게 희석 연구 약물은 180ml 투여하였으나, 이때 사용된 주입 백은 총 부피 210 ml 들이의 것으로 준비하였다. 주입 배관을 준비하기 위해 추가로 30 ml를 사용하였으며, 이는 환자에게 투여하지 않았다. 따라서, 주입 백에 주입한 연구 약물의 총량은 환자의 투여량이었다(즉, 환자 체중(kg) × 투여 농도[mg/kg] × 1.167). 주입용 염화나트륨, USP(0.9%)를 첨가하여 주입 백에 주입된 총 부피를 210 ml로 만들었다.

미리 충전된 주입 배관을 환자의 정맥 투여 통로(예를 들어, 헤어핀형 잠금 장치)에 직접 부착시켰다. 주입 펌프를 사용하여 주입물을 1 시간에 걸쳐 2ml/분(또는 15.0 mg/kg 투여군에 속하는 체중 80 kg 초과환자에게는 3ml/분)의 속도로 투여하였다.

### 4. 1차 종점 및 역효과

본 연구의 종점은 최대 내약 용량, 투여량 제한 독성, 안전성 프로파일, 면역원성, 약물 동력학(PK), 단핵구 포화도(단핵구는 α5β1 수용기를 발현함), 및 종괴 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors : RECIST)를 포함한다 [그 자체로서 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있는 문헌 즉, Therasse P, 외 다수, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors,"Journal of the National Cancer Institute, 92 (3): 205-216 (2000) 참조].

역효과는 미국립 암센터(NCI)의 "역효과에 대한 일반적 용어 기준"(Common Terminology Criteria for Adverse Events; CTCAE) 제3판을 사용하여 등급을 매겼다. 투여량 제한 독성은 3등급 또는 4등급 역효과로서 정의하되, 이때 계획된 입원 또는 전기적 수술의 경우는 제외하였다. M200과 관련 없는 것으로 생각되는 3등급 또는 4등급 역효과는 제외하였으며, 이때 이와 같이 관리 기관과 함께 의학적 관찰을 적당히 수행하였다.

본 연구중 환자의 평가 방법은 다음과 같았다:

a. 스크리닝(연구 개시 후 14일 이내): 병력 및 물리적 관찰, ECOG 전신 상태, 통상의 화학 패널, 순차적 혈구(혈소판) 계측(CBC), 감수성 C 반응 단백질(CRP), 현미경 분석에 의한 소변 검사 결과(UA/마이크로), 심전도(ECG), 흉부 방사성 사진(CXR), 질병으로 인한 전신 CT 또는 MRI, 투여전 48 시간 이내의 소변 임신 진단 테스트, 및 응집 연구(프로트롬빈

[PT] 및 부분적 트롬보플라스틴 시간[PTT]), 쥐 또는 키메라 항체를 미리 투여한 환자에 대한 항 M200 항체(즉, 교차 반응성 HAMA 또는 HACA 검출용), 일반적으로 뇌 또는 CNS로 전이되는 종양을 갖는 환자에 대한 두부 CT, 및 일부 환자에 있어서 종양 혈관 맥관구조를 관찰하기 위한 생검.

b. 연구중인 실험실 평가: 통상의 화학 패널, 요산염, 혈청 아밀라제, 순차적 혈소판 CBC(UA/마이크로).

c. 1차원의 RECIST 기준을 사용하여 종양 반응을 평가하는데 사용되는, M200 처치전 및 처치후의 통상의 질병 지향성 방사성 사진 이미지화(예를 들어, CT 스캐닝). 크기(최장 지름(LD))을 갖는 병변 및 (이미지화 기술 또는 임상학적 방법에 의한) 정확한 반복 측정법의 적합성을 기준으로 하여 표적 병변을 선택하였다. 모든 표적 병변에 대한 LD의 합을 계산하여 총합 LD 기준선으로 잡았다. 총합 LD 기준선을 참고로 하여 목적으로 하는 종양 반응의 특성을 규명하였다. 표적 병변에 대한 이하의 반응성 기준을 사용하여 최적 전체 반응을 평가하였다.

\* 완전 반응(CR): CR 첫 기록후 25~28 일 경과시 이미지화 반복 수행함으로써 모든 표적 병변이 사라지는 것이 확인됨.

\* 부분 반응(PR): 총합 LD 기준선을 참고하였을 때, PR 첫 기록후 25~28일 경과시 이미지화 반복 수행함으로써 표적 병변의 LD 총합이 30% 이상 감소되는 것이 확인됨.

\* 안정형 질병(SD): 가장 작은 LD 총합을 참고로 하였을 때, PR이라는 확신을 갖기에 충분하도록 수축되지도 않고, PD라는 확신을 갖기에 충분하도록 팽창하지도 않음.

\* 진행형 질병(PD): 처리를 개시한 이래로 기록한 가장 작은 LD 총합을 참고로 하였을 때, 표적 병변의 LD 총합이 20% 이상 증가하거나, 또는 하나 이상의 새로운 병변의 출현.

d. 혈청 PK 측정법, 면역원성 검정법(항M200 항체), 혈관 성장 인자, 및 말초 혈액 단백질상 결합 및 비결합  $\alpha 5\beta 1$ 의 측정을 위한 채혈.

e. 본 연구 참여에 동의한(등록을 강요당하지 않은) 환자로부터 얻은, 전이 종양의 3 mm 펀치 표면 생검편을 수득하여 이를 동결시킴. 이 생검 표본은 M200 처리후 종양 혈관 맥관구조를 평가하는데 사용될 수 있음.

## 5. 약물동력학적 측정법

투여량이 적은 첫 번째 환자 PK 데이터를 사용하여 투여량이 보다 많을 때 의 환자 혈청 중 농도를 예측하였다(전술한 바와 같음). M200 농도를 측정하기 위해 첫 번째 투여 직전 및 직후, 그리고 첫 번째 투여 완료 후 4시간, 24시간, 48시간 및 168시간 경과시에 혈청을 수득하였다. M200 농도를 측정하기 위해 각각의 후속 주입 완료 직전, 주입 완료후, 그리고 주입 후 4시간 경과시에 M200 농도 측정용 혈청 시료를 취하였다. 상기 시료들을 일정량 나눈 후 후속 투여 이전과 연구의 마지막 시점에 그 분취량에 대하여 평가하였다: 첫 번째 투여 말, 첫 번째 투여후 168 시간 경과시, 두 번째, 세 번째, 네 번째 및 다섯 번째 투여 직전(예비 투여(최소 농도)) 및 직후(사후 투여(최대 농도))에 투여하였다. M200의 혈청내 농도는 ELISA로 측정하였다.

각 환자들로부터 얻은 M200의 혈장중 농도-시간 데이터에 대해 PK 분석하였다. 이때, 다음과 같은 매개 변수들이 계산에 포함된다: 최대 농도(Cmax) 및 최소 농도(Cmin), 최종 단계 반감기( $T_{1/2\beta}$ ), 혈장-농도 시간 곡선의 밑면적(AUC), 제거 소멸률(CL) 및 분포 부피(V). 각 처리 군으로부터 얻은 요약 매개 변수를 환자에 대하여 계산하였다. 투여량 및 시간의 함수인 PK 매개 변수 변화도 측정하였다.

## 6. 면역원성

이중 항원 가교 ELISA 검정법에 의해 M200의 면역원성을 측정하였다. 처리전, 두 번째 투여 이전, 그리고 연구 마지막 단계 즉, M200의 마지막 투여후 45일 경과시 환자로부터 항M200 항체에 대한 혈청 시료를 얻었다. 뿐만 아니라, 투여 사이의 간격이 2주 이상일 경우 항M200 항체에 대한 혈청을 채취하였다. 보관하였던 시료를 연구의 마지막 단계에 평가하였다. M200에 대한 항체가 생성된 것으로 나타난 시료가 M200에 대한 항체에 대하여 중화되었는지 여부를 재검정하였다. M200을 처음 투여하기 이전에 쥐 또는 키메라 모노클로날 항체에 노출시킨 것으로 알려진 환자들을 항M200 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다.

## 7. 유동 혈구계측 분석법

인테그린  $\alpha 5 \beta 1$ 은 또한 말초 혈액내 단핵구상에서 발현된다. 이와 같은 혈류 세포상  $\alpha 5 \beta 1$  위치가 M200에 의해 포화되는 시점의 투여량을 측정하기 위하여, 연구 제1일, 연구 제2일 및 연구 제8일째 되는 날에 첫 번째로 투여하기 이전 즉, 각각의 후속 투여 직전에, 그리고 연구 제43일째 되는 날에 말초 혈액 시료를 취하였다. 단핵구상  $\alpha 5 \beta 1$  위치의 포화도를 유동 혈구계측법으로 측정하였다. 단핵구는 CD14에 대한 항체를 사용하여 확인하였다. 표지된 항인간 IgG4를 첨가하여 단핵구 표면에 결합된 M200을 검출하였다. 표지된 IIA1을 첨가하여 세포 위를 점유하고 있지 않은(유리된)  $\alpha 5 \beta 1$ 을 검출하였다. 또한  $\alpha 5 \beta 1$ 을 발현하는 단핵구 및 림프구의 비율을 평가하였다.

### C. 결과 - 투여량 증가 연구

투여량이 15 mg/kg 이하인 환자에서는 M200에 내성이 있었으며, 투여량 제한 M200 독성이 관찰되었다. 본 연구에 대한 전반적인 반응 결과는 다음과 같았다: 안정형 질병(SD)(11명) 및 진행형 질병(PD)(10명). 표 4는 투여량 및 환자 종양 유형에 의한 반응 결과를 분석한 것이다.

**[표 4]**

투여량 및 종양 유형에 따른 반응 결과					
0.5 mg/kg	1.0 mg/kg	2.5 mg/kg	5.0 mg/kg	10.0 mg/kg	15.0 mg/kg
CRC (PD)	HCC (SD)	CRC (PD)	HCC (SD)	CRC (SD)	EC (PD)
	PC (SD)	NSCLC (SD)	EC (PD)	CRC (SD)	RCC (SD)
		눈 MEL (PD)	THY (PD)	PARO (SD)	PRO (PD)
				BC (SD)	MEL (PD)
				RCC (SD)	MEL (SD)
				MEL (PD)	RCC (PD)

\* 축약어: CRC = 결장; MEL = 흑색종; RCC = 신장; EC = 식도; HCC = 간세포; NSCLC = 폐; PRO = 전립선; THY = 갑상선; PC = 췌장; PARO = 이하선; BC = 유방; SD = 안정형 질병; PD = 진행형 질병

일반적으로 역효과로서는 경미한 정도로부터 온화한 정도 즉, 피로, 메스꺼움, 변비, 두통 및 식욕 감퇴가 나타났다. 투여량 제한적 또는 관찰자에 의해 M200과 연관되었다고 간주될 만한, 심각하지 않거나 또는 중증의 역효과는 나타나지 않았다. 투여 농도가 0.5 mg/kg 및 1.0 mg/kg인 환자 3명을 시험한 결과 항M200 항체에 대해 양성인 것으로 나타났으나, 이에 따른 역효과는 나타나지 않았다. 투여량이 보다 많은 환자군에 대해 시험한 결과 항M200에 대해 양성인 것으로 나타났다. 0.5 mg/kg 투여된 환자는 첫 번째 투여후 열이 발생하였으며, 이를 주입 반응으로 기록하였다. 그러나, 이후 발열하지 않았거나 또는 기타 주입 징후를 나타내지 않은 환자들에게는 M200을 5회 모두 투여하였다.

연구 데이터를 통하여 M200은 비선형의 약물동력학적 특성을 나타냄을 알 수 있었다. 투여 농도가 10 mg/kg이고,  $T_{1/2}$ 가 15.7일인 환자에게 보다 고농도로 투여하였을 경우 소멸률은 더욱 느렸다. 뿐만 아니라, 10 mg/kg 투여시 단핵구는 포화되었으며, 첫 번째 투여후 2주 경과시 평균 최소 농도는 82  $\mu\text{g/ml}$ 였는데, 이는 최소 효능을 나타내는 시험관내 농도인 2~3  $\mu\text{g/ml}$ 보다 높은 수치였다.

### D. 결과 - 부연 연구



안정형 질병 반응을 나타내거나 상태가 호전된 11명의 환자 중 6명에 대해 부연 연구를 개시하기 위해 계속 투여하였다. 이하 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 6명의 환자중 5명은 안정형 질병(SD)을 나타내거나 또는 호전된 반응을 나타내었다. 15.0 mg/kg 투여군에 속하는 신장 세포 암(RCC) 환자들 중 한 명은 부분 반응을 나타내었다.

**[표 5]**

부연 연구 결과		
투여 군 (환자 수; 종양 유형)	호전 반응 결과	진행 시간* (일)
2.5 mg/kg (1; NSCLC)	SD	129
5 mg/kg (1; HCC)	SD	122
10 mg/kg (1; CRC)	PD	70
10 mg/kg (1; PARO)	SD	143
15 mg/kg (1; RCC)	PR	214
15 mg/kg (1; MEL)	SD	172+(연구중)
* 는 투여량 증가 연구 기간 43일 및 부연 연구일을 포함하는 기간임. SD는 16주 이상(112일) 동안의 안정화로서 정의된다.		

#### 실시예 9: 제2단계; 전이성 신장 세포 암종 환자에서 M200에 대한 개방 연구

##### A. 개요

실시예 8의 제1단계 연구에 의해 입증된 M200 효능을 기준으로 하였을 때, 환자 치료를 위한 제2단계의, 개방, 다중 센터, 싱글-암(single-arm), 2 단계 연구법을 수행하였다. 본 연구의 1차적 목적은 종괴 반응 평가 기준(전술한 실시예 8의 RECIST 참조)을 통해 정의한 바와 같이, 전이성 신장 세포 암종(RCC) 환자에 있어서 M200의 효능(종양 반응)을 평가하는 것이다. 본 연구의 2차적 목적은 기타 효능(즉, 질병의 진행 및 반응의 지속 시간)을 평가하는 것이며, 또한 실시예 8의 제1단계 연구에서 최초로 평가된 M200의 PK 매개 변수 및 면역원성, 그리고 안정성을 평가하는 것이다. 추가의 탐구 목적은 혈청 및 혈장중 검출 가능한 생물 마커를 측정하는 것이다. 본 연구에서는 8군데 이하의 조사 지역에 있는 40명 이하의 환자들을 참여시켰다. 연구의 제1부에는 20명의 환자들을 참여시킬 것이다. 4개월(16주) 경과시 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)이 확인된 환자가 관찰되거나, 또는 4개월 경과시 안정형 질병(SD)이 관찰되면, 20명의 환자를 추가로 참여시킬 것이다(제2부). 30 분에 걸쳐, 2주일에 한 번씩, 52주 이하 동안 또는 질병이 진행될 때까지(즉, 증상이 처음 나타날 때까지), M200을 모든 환자들에게 정맥내 주입하여 투여할 것이다. 마지막 투여 후 45일 경과시에 또는 환자가 회복될 수 없으면 조기 종료시에, 마무리 연구를 위하여 환자를 내원시킬 것이다. 마지막 투여 후 3개월 경과시 또다시 환자를 내원시킬 것이다. 내원이 여의치 않으면 후속 내원은 전화로 대신할 수도 있을 것이다. 장기 후속 내원 조치는 마지막 투여후 6개월 경과시에 전화로 대신할 수 있을 것이다.

##### B. 연구 매개 변수 및 과정

제2단계 연구는 이하 표 6a~6c에 나타낸 바와 같은 매개 변수 및 과정에 따라서 수행된다.

**[표 6a]**

전이성 신장 세포 암종 환자에 있어서 제2단계 연구의 매개 변수	
연구 집단:	명세포 조직 구조를 갖는 18 세 이상의 전이성 RCC 남성 및 여성

주요 환자 포함/배제 기준:	<p><b>포함:</b>          명세포 조직 구조가 우세한 18세 이상의 전이성 RCC 남성 및 여성으로서, 전이성 질병에 대하여 미리 투약하지 않았거나 또는 1~2회 미리 투약한 환자; 종괴 반응 평가 기준(RECIST)에 따라 측정 가능한 질병; 동부 공동종양학 그룹(ECOG) 전신 상태가 1 이하; 임신 테스트 음성(가임 여성에 한정하여 테스트함); 특정 기준에 부합하는 전처리 실험실 수준; 및 정보 제공에 동의 예를 들어, 보호형 건강 정보(PHI) 사용에 동의</p> <p><b>배제:</b>          RCC의 이하 조직 구조중 임의의 것: 유두형, 혈액소성, 집합관 또는 비분류; 쥐 단백질 또는 키메라 항체 또는 생성물의 기타 성분에 대한 공지의 감수성; 스크리닝 이전 4주 이내에 임의의 조사 약물 사용 또는 이전 조사 약물의 5개의 반감기(이들 중 가장 긴 것); M200 투여후 4주 이내의 전신 화학 요법, 면역요법, 방사성 요법, 또는 모노클로날 항체 요법; 기록된 CNS 종양 또는 CNS 전이; 과거 혈전색전증 및 출혈성 질환 병력; 및 출혈로 악화될 수 있는 의학적 증상</p>
-----------------	---

[표 6b]

시료 크기:	40명 이하의 환자들을 등록시킬 수 있었음. 제1부에는 20명의 환자들을 등록시킴. 4개월(16주) 경과 시까지 1명에서 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)이 관찰되는 것이 확인되거나, 또는 4개월 경과시에 1명에서 안정형 반응(SD)이 관찰되면, 추가로 20명의 환자들을 더 투입시킴(제2부).
투여형 및 강도/제제:	M200은 멸균, 무색, 투명~약간 유백색의, 보존제를 함유하지 않는 IV용 액체임. 10 mL들이 1회용 바이알 각각에 농도 10 mg/mL의 M200을 10 mL씩 충전시킴. 각 바이알 내용물의 성분은 M200 10 mg/mL, 시트르산염 25 mM, 염화나트륨 150 mM, 및 0.05% 폴리소르베이트(Tween(등록상표)) 80이며, 이의 pH는 6.5임.
보관 및 여과:	원형 그대로의 바이알을 2~8 °C (36~46 °F)의 냉장고에 보관함. 이때 이를 동결시키거나 또는 진탕시키지 않음. M200이 실온(25°C)에서 보관될 경우에는 6 시간 이내에 투여하여야 하며, 또는 이것이 냉장(2~8 °C)될 경우에는 48 시간 이내에 투여하여야 함. 이후 준비된 용액은 폐기해야 함.
투약 방법/투여 경로:	<p>참여 가능한 모든 환자들에게 M200을 2주에 한번씩 30분에 걸쳐서 52주 이하의 기간 동안 또는 질병이 진행되기 시작할 때까지 10 mg/kg의 농도로 정맥내(IV) 주입함.</p> <p>환자에게 투여될 M200의 투여량은 환자의 체중(kg) × 투여 농도(10 mg/kg)에 의해 계산됨. 연구 개시시 환자의 전투여량은, 그 양이 10% 이상 차이가 나지 않을 경우, 전체 연구 과정을 통하여 투여량을 계산하는데에 사용됨.</p> <p>농도 10 mg/mL인 M200 제제를 적절한 부피만큼 분리하여, 30 분의 기간에 걸쳐 환자에게 IV 주입시키기 위해 이를 염화나트륨으로 최종 부피 120 mL가 될 때까지 희석시킴.</p>
처치 기간 및 후속 처치:	모든 환자들에게 M200(10 mg/kg)을 2주에 한번씩 52주 이하의 기간 동안 또는 질병이 진행되기 시작할 때까지(질병이 처음 발생할때까지) 정맥내 주사함. 마지막 투여 후 45일 경과시에 또는 환자가 회복될 수 없으면 조기 종료시에, 마무리 연구를 위하여 환자를 내원시킬 것이다. 마지막 투여 후 3개월 경과시 또다시 환자를 내원시킬 것이다. 내원이 여의치 않으면 후속 내원은 전화로 대신할 수도 있을 것이다. 장기 후속 내원 조치는 마지막 투여후 6개월 경과시에 전화로 수행할 수 있을 것이다.
종료 시점:	본 연구의 1차 종말점은 연구중 임의의 시점에서 확정된 종양 반응을 나타내는 환자의 비율로써 결정한다. 2차 종료 시점은 다음과 같다: (1) 질병 진행에 대한 시간; (2) 종양 반응의 지속 기간; (3) M200의 PK; 및 (4) 면역원성. 탐구를 위한 종료 시점은 혈청 및 혈장내 검출 가능한 생물 마커의 측정 결과로써 결정한다.

[표 6c]

효능 측정 방법:	8주(2 개월) 마다 질병 관련 방사성 이미지화를 수행하여 1차원 RECIST로 종양 반응을 평가함. 스크리닝시, 머리, 가슴, 복부 및 골반의 CT 또는 MRI 결과를 얻음. 8주 마다, 존재하는 모든 병변, 그리고 질병 관련 해부학적 병변을 완벽하게 물리적 관찰 및 이미지화 스캔을 수행함. PR 또는 CR 이후 한달간(28~35 일) 임의의 PR 또는 CR에 대해 확증적 방사성 이미지화를 반복 수행함.  관련된 모든 기관에 있어서, 기관당 최대 5개 및 총 10개의 병변 중 측정 가능한 모든 병변들은 표적 병변으로서 동정되며 이를 기록하여 기준선으로 간주함. 측정 가능한 병변은 다음과 같이 정의함: 통상의 CT/MRI를 사용하였을 때 2.0 cm(1차원)이며, 나선형 CT를 사용하였을 때 1.0 cm(1차원). 모든 표적 병변에 대한 최장 지름(LD)의 합을 계산하여 이를 기준선 총합 LD로 정함. 상기 기준선 총합 LD는 목적 종양 반응이 특성 규명될 때 참고 기준으로 사용함.
안전성 측정 방법:	다음과 같은 안전성 측정 방법이 모니터링: 역효과(AE); 중증 역효과(SAE); 물리적 관찰 결과물; 활력징후; 및 비정상적 실험실 수치
약물동력학적 측정 결과:	투여전(투여전 15분 이내) 및 투여후(주입 완료후 1 시간) 모든 환자들로부터 약물동력학적(PK) 측정 결과를 얻음: 연구 개시시, 개시후 2주, 4주 및 6주 경과시, 2달에 한번씩(8, 16, 24, 32, 40, 48 주), 52주 경과시, 마무리 연구중 내원시, 그리고 3개월 후(가능한 경우). PK용으로 얻은 시료들은 적절한 경우 항Ab 분석용으로 사용될 수 있음.
면역원성:	연구 개시시, 개시 후 8주 경과시, 연구 종료 후 내원시, 그리고 3개월 후(가능한 경우), 15분 이내에 모든 환자들로부터 항-Ab 측정 결과를 얻음. 적절한 경우, PK용으로 얻은 시료를 항-Ab 분석용으로 사용할 수 있음.
기타 측정 방법:	탐구용 검정법을 통하여 혈청 및 혈장내 생물마커가 존재하는지 여부를 알게 됨. 본 검정법에는 다음과 같은 암 마커들이 포함됨: CEA, CA 19-9, 신데칸, IGFBP-2 및 LFL2. 다음과 같은 시토킨/성장 인자들이 포함됨: MIA, IL-6, TNF-알파, PGF, VEGF, EGF 및bFGF
통계 방법:	본 연구의 디자인은 안정형 질병(SD)을 나타내는 응답자중 20% 이하에 있어서, 전체 반응 비율이 20% 이상임을 파악할 수 있도록 파워(power)를 79.5% 이상으로 정함. 요약 통계 및 95% 신뢰도 간격은 양분된 종말점에 대해 제공됨. 카플란-메이어법은 일시적 변수들을 요약하는데 사용됨.

전술한 실시예는 본 발명의 실제 범위를 한정하는데 사용되는 것이 아니며, 예시적 목적으로 기술됨을 알 수 있다. 본 명세서에 인용된 모든 공보, 서열 등록 번호 및 특허 출원은, 각각의 공보 또는 특허 출원이 참고 문헌으로 인용되어 있음을 특정하여 그리고 개별적으로 밝힌 바와 같이 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1의 (A)는 IIA1 V<sub>H</sub> 핵산 서열(서열 1) 및 아미노산 서열(서열 2)을 나타내는 것이고; (B)는 IIA1 V<sub>L</sub> 핵산 서열(서열 3) 및 아미노산 서열(서열 4)을 나타내는 것이다.

도 2의 (A)는 M200 V<sub>H</sub> 핵산 서열(서열 5) 및 아미노산 서열(서열 6)을 나타내는 것이고; (B)는 M200 V<sub>L</sub> 핵산 서열(서열 7) 및 아미노산 서열(서열 8)을 나타내는 것이다.

### 도면

도면1

A. IIA1 V<sub>H</sub> 서 열  
[NA, 서 열 1; AA, 서 열 2]

```

1  ATGGCTGTCTCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGAGTCTCTCTCCAG
   M A V L G L L L C L V T F P S C V L S Q
61  GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACA
   V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T
121 TGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAAACCGACTATGGTGTTCAGTGGGTTCGCCAGCCTCCA
   C T I S G F S L T D Y G V H W V R Q P P
181 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCAACCTATAATTCA
   G K G L E W L V V I W S D G S S T Y N S
241 GCTCTCAAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAATA
   A L K S R M T I R K D N S K S Q V F L I
301 ATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGACATGGAACCTTAC
   M N S L Q T D D S A M Y Y C A R H G T Y
361 TACGGTATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
   Y G M T T T T G D A L D Y W G Q G T S V T
421 GTCTCCTCA
   V S S

```

B. IIA1 V<sub>L</sub> 서 열  
[NA, 서 열 3; AA, 서 열 4]

```

1  ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
   M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S
61  AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG
   R G Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R
121 GTCACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTAAAGTTCCAATTACTTGCAGTGGTACCAG
   V T M T C T A S S S V S S N Y L H W Y Q
181 CAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGA
   Q K P G S A P N L W I Y S T S N L A S G
241 GTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC
   V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
301 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTTCCCCACCGACG
   M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R S P P T
361 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
   F G G G T K L E I K

```

## 도면2

A. M200 V<sub>H</sub> 서 열  
[NA, 서 열 5; AA, 서 열 6]

```

1  ICTAGACCACCATGGCTGTCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGTG
      M A V L G L L L C L V T F P S C
61  TCCTGTCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
      V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S
121 TGTCCATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTATGGTGTTCCTGGGTTC
      L S I T C T I S G F S L T D Y G V H W V
181 GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCAA
      R Q P P G K G L E W L V V I W S D G S S
241 CCTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAG
      T Y N S A L K S R M T I R K D N S K S Q
301 TTTCTTAATAATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGAC
      V F L I M N S L Q T D D S A M Y Y C A R
361 ATGGAATTCAGCTCGGAATGACTACGACGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAA
      H G T Y Y G M T T T G D A L D Y W G Q G
421 CCTCAGTCACCGTCTCCTCAG^GTAAGAATGGCCTCTAGA
      T S V T V S S

```

B. M200 V<sub>L</sub> 서 열  
[NA, 서 열 7; AA, 서 열 8]

```

1  ACGCGTCCACCATGGATTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCCTCAG
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S
61  TCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC
      V I M S R G Q I V L T Q S P A I M S A S
121 TAGGGGAACGGGTACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAGTGTCAAGTGTCAAGTTCCAATTACTTGC
      L G E R V T M T C T A S S S V S S N Y L
181 ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTATAGCACATCCAACC
      H W Y Q Q K P G S A P N L W I Y S T S N
241 TGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCA
      L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
301 CAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTT
      T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R
361 CCCCACCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC^GTAAGTAGAATCCAAAGT
      S P T F G G G T K L E I K
421 CTAGA

```

## 서열목록

## SEQUENCE LISTING

<110> PROTEIN DESIGN LABS, INC.  
RAMAKRISHNAN, Vanitha  
BHASKAR, Vinay  
HO, Sun  
MURRAY, Richard  
LAW, Debbie

<120> USE OF ANTI ALPHA5BETA1 ANTIBODIES TO INHIBIT CANCER CELL  
PROLIFERATION

<130> 05882156PC00

<140> PCT/US2005/009939

<141> 2005-03-24

<150> 60/556,421  
<151> 2004-03-24

<150> 60/556,422  
<151> 2004-03-24

<150> 60/625,049  
<151> 2004-11-03

<150> 60/651,098  
<151> 2005-02-07

<150> 60/657,514  
<151> 2005-02-28

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
<211> 429  
<212> DNA  
<213> mus muscalus

<400> 1  
atggctgtcc tggggctgct tctctgcctg gtgactttcc caagctgtgt cctgtcccag 60  
gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcaca 120  
tgcaccatct cagggttctc attaacccgac tatggtgttc actgggttcg ccagcctcca 180  
ggaaagggtc tggagtggct ggtagtgatt tggagtgatg gaagctcaac ctataattca 240  
gctctcaaatt ccagaatgac catcaggaag gacaactcca agagccaagt tttcttaata 300  
atgaacagtc tccaaactga tgactcagcc atgtactact gtgccagaca tggaacttac 360  
tacggtatga ctacgacggg ggatgctttg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 420  
gtctcctca 429

<210> 2  
<211> 143  
<212> PRT  
<213> mus muscalus

<400> 2

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu  
35 40 45

Thr Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser  
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
85 90 95

Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp  
115 120 125

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 3

<211> 390

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 3

atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120

gtcaccatga cctgcactgc cagttcaagt gtaagttcca attacttgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatccgcccc caatctctgg atttatagca catccaacct ggcttctgga 240

gtcccagctc gtttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300

atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcttcgttc cccaccgacg 360

ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 390

<210> 4  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> mus muscalus

<400> 4

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Ser Ala Pro Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His  
 100 105 110

Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Ile Lys  
 130

<210> 5  
 <211> 459  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> chimeric antibody



<400> 5  
tctagaccac catggctgtc ctggggctgc ttctctgcct ggtgactttc ccaagctgtg 60  
tcctgtccca ggtgcagctg aaggagtcag gacctggcct ggtggcgccc tcacagagcc 120  
tgtccatcac atgcaccatc tcagggttct cattaaccga ctatggtgtt cactgggttc 180  
gccagcctcc aggaaagggg ctggagtggc tggtagtgat ttggagtgat ggaagctcaa 240  
cctataattc agctctcaaa tccagaatga ccatcaggaa ggacaactcc aagagccaag 300  
ttttcttaat aatgaacagt ctccaaactg atgactcagc catgtactac tgtgccagac 360  
atggaactta ctacggaatg actacgacgg gggatgcttt ggactactgg ggtcaaggaa 420  
cctcagtcac cgtctcctca ggtaagaatg gcctctaga 459

<210> 6  
<211> 143  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> chimeric antibody

<400> 6  
Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
1 5 10 15  
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
20 25 30  
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu  
35 40 45  
Thr Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60  
Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser  
65 70 75 80  
Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
85 90 95

Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp  
115 120 125

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 7  
<211> 425  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> chimeric antibody

<400> 7  
acgcgtccac catggatttt caggtgcaga ttttcagctt cctgctaatac agtgcctcag 60  
tcataatgtc cagaggacaa attgtttctca ccagttctcc agcaatcatg tctgcatctc 120  
taggggaacg ggtcaccatg acctgcactg ccagttcaag tgtcagttcc aattacttgc 180  
actggtacca gcagaagcca ggatccgccc ccaatctctg gatttatagc acatccaacc 240  
tggcttctgg agtcccagct cgttttcagtg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca 300  
caatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccaccag tatcttcggt 360  
ccccaccgac gttcgggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgtaagtag aatccaaagt 420  
ctaga 425

<210> 8  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> chimeric antibody

<400> 8

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60

Ser Ala Pro Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His  
100 105 110

Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
115 120 125

Ile Lys Asp Met Ser Val Asp Met Ser Val  
130 135