



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2008-0026562  
 (43) 공개일자 2008년03월25일

- (51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2007-7030521  
 (22) 출원일자 2007년12월27일  
 심사청구일자 없음  
 번역문제출일자 2007년12월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/021293  
 국제출원일자 2006년06월01일  
 (87) 국제공개번호 WO 2006/130773  
 국제공개일자 2006년12월07일
- (30) 우선권주장  
 60/687,118 2005년06월02일 미국(US)  
 60/751,092 2005년12월15일 미국(US)
- (71) 출원인  
**갤럭시 바이오테크, 엘엘씨**  
 미국 캘리포니아 쿠퍼티노 샌 주안 로드 22830 (우:95014)  
**케네디 크리거 인스티튜트, 인코포레이티드**  
 미국 메릴랜드 볼티모어 노스 브로드웨이 707 (우: 21205)  
**존스 홉킨스 유니버시티**  
 미국 메릴랜드 21218 볼티모어 노스 찰스 스트리트 3400
- (72) 발명자  
**김경진**  
 미국 95014 캘리포니아 쿠퍼티노 샌 주안 로드 22830  
**라티라, 존**  
 미국 21212 메릴랜드 볼티모어 세인트 알반스 웨이 5401  
**랄, 바흐츄**  
 미국 21208 메릴랜드 피케스빌 서드베일 로드 1315
- (74) 대리인  
**남상선**

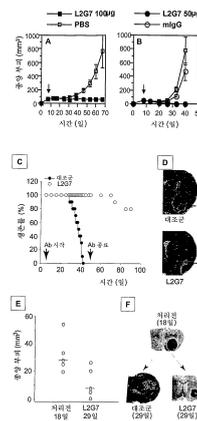
전체 청구항 수 : 총 23 항

**(54) 항체를 이용한 뇌종양 치료 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 모노클로날 항체를 전신 투여하는 것을 포함하여 환자의 뇌종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.

**대표도** - 도3



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

뇌종양을 지닌 환자에 모노클로날 항체 (mAb)를 전신 투여함으로써 상기 뇌종양을 치료하는 것을 포함하여 상기 환자의 뇌종양을 치료하는 방법.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, mAb가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제 1항에 있어서, mAb가 중화 항-HGF mAb임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제 2항에 있어서, mAb가 인간화된 L2G7 mAb임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, mAb가 정맥내 투여됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 뇌종양이 신경아교종임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제 6항에 있어서, 뇌종양이 아교모세포종임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제 1항에 있어서, 환자가 인간임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제 1항에 있어서, 환자가 또한 방사선 요법으로 치료됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제 1항에 있어서, mAb가 하나 이상의 기타 활성 항암 약물과 함께 투여됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제 1항에 있어서, mAb가 혈관내피세포성장인자 (VEGF), 신경성장인자 (NGF), 뇌 유래 신경영양인자 (BDNF), NT-3, 전환성장인자 (TGF)-알파 (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 표피성장인자 (EGF), 헤레글린, 에피레글린, 엠피레글린, 뉴레글린 (NRG)-1 알파 (NRG-1 $\alpha$ ), NRG-1 $\beta$ , NRG-2 $\alpha$ , NRG-2 $\beta$ , NRG-3, NRG-4, 인슐린-유사 성장인자 (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, 산성 섬유모세포 성장인자 (FGF) (FGF-1), 염기성 FGF (FGF-2), 및 FGF-n (n은 3 내지 23중 임의의 수임)으로 구성된 군으로부터 선택된 성장인자에 결합함을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

뇌종양을 지닌 환자에 모노클로날 항체 (mAb)를 전신 투여함으로써 상기 뇌종양의 퇴행을 야기시키는 것을 포함하여 상기 환자의 뇌종양의 퇴행을 야기시키는 방법.

**청구항 13**

제 12항에 있어서, mAb가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 12항에 있어서, mAb가 중화 항-HGF mAb임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 13항에 있어서, mAb가 인간화된 L2G7 mAb임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제 12항에 있어서, mAb가 정맥내 투여됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 12항에 있어서, 뇌종양이 성상세포종임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 17항에 있어서, 뇌종양이 아교모세포종임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 12항에 있어서, 퇴행이 완전한 퇴행임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 12항에 있어서, 방사선 요법으로 환자를 치료하는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제 12항에 있어서, mAb가 하나 이상의 기타 활성 항암 약물과 함께 투여됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제 12항에 있어서, mAb가 혈관내피세포성장인자 (VEGF), 신경성장인자 (NGF), 뇌 유래 신경영양인자 (BDNF), NT-3, 전환성장인자 (TGF)-알파 (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 표피성장인자 (EGF), 헤레굴린, 에피레굴린, 엠펜레굴린, 뉴레굴린 (NRG)-1 알파 (NRG-1 $\alpha$ ), NRG-1 $\beta$ , NRG-2 $\alpha$ , NRG-2 $\beta$ , NRG-3, NRG-4, 인슐린-유사 성장인자 (IGF)-1 (IGF-1), IGF-2, 산성 섬유모세포 성장인자 (FGF) (FGF-1), 염기 성 FGF (FGF-2), 및 FGF-n (n은 3 내지 23중 임의의 수임)으로 구성된 군으로부터 선택된 성장인자에 결합함을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

진신 투여에 의해 뇌종양을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 중화 항-HGF 항체의 용도.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 일반적으로 항체를 이용한 뇌종양의 치료, 더욱 특히 예를들어 간세포 성장인자에 결합하고 이를 중화시키는 모노클로날 항체를 이용한 뇌종양의 치료에 관한 것이다.

**배경기술**

<2> 인간 간세포 성장인자 (HGF)는 중간엽 세포에 의해 생성되는 다기능성 이종이합체 폴리펩티드이다. HGF는 혈관 신생, 형태발생 및 유사분열을 자극할 뿐만 아니라, 다양한 세포 유형의 성장 및 분산을 자극하는 것을 밝혀졌다 (Bussolino et al., J. Cell. Biol. 119: 629, 1992; Zarnegar and Michalopoulos, J. Cell. Biol. 129:1177, 1995; Matsumoto et al., Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier and Gherardi, Trends Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin et al. Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). HGF의 다면발현 활성화는 이의 수용체인, 원종양유전자 cMet에 의해 엔코딩되는 막횡단 티로신 키나아제를 통해 매개된다. 다양한 정상적인 세포 기능을 조절하는 것 이외에, HGF 및 이의 수용체 c-Met는 종양의 개시, 침범 및 전이와 관련된 것으로 밝혀졌다 (Jeffers et al., J. Mol. Med. 74:505, 1996; Comoglio and Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002).

HGF/cMet는 폐암, 결장암, 직장암, 위암, 신장암, 난소암, 피부암, 다발골수종 및 갑상선 조직암으로부터 유래된 종양을 포함하는 다양한 인간 고형 종양에서 공동발현되고, 종종 과다 발현된다 (Prat et al., *Int. J. Cancer* 49:323, 1991; Chan et al., *Oncogene* 2:593, 1988; Weidner et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:229, 1993; Derksen et al., *Blood* 99:1405, 2002). HGF는 상기 종양에 대해 자가분비 성장인자 (Rong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4731, 1994; Koochekpour et al., *Cancer Res.* 57:5391, 1997) 및 측분비 성장인자 (Weidner et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:229, 1993) 및 항-아프토티시스 조절인자 (Gao et al., *J. Biol. Chem.* 276:47257, 2001)로 작용한다. 따라서, HGF-cMet 경로를 차단하는 길항 분자, 예를 들어 항체는 잠재적으로 광범위한 항암 치료 가능성을 지닌다.

<3> HGF는 혈액 응고의 플라스미노겐 및 기타 효소와 서열 및 구조 유사성을 지니는 102 kDa의 단백질이다 (Nakamura et al., *Nature* 342:440, 1989; Weidner et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:229, 1993, 각각의 문헌은 참조로서 본원에 포함됨). 인간 HGF는 728개의 아미노산 전구물질 (프레프로HGF)로 합성되고, 이는 세포내에서 분해되어, 비활성의 단일 사슬 형태 (프로HGF)가 된다 (Nakamura et al., *Nature* 342:440, 1989; Rosen et al., *J. Cell. Biol.* 127:1783, 1994). 세포의 분비 후, 프로HGF는 분해되어  $\alpha$ -서브유닛 및  $\beta$ -서브유닛으로 구성된 생물학적으로 활성인 이황화 연결된 이종이합체 분자를 생성한다 (Nakamura et al., *Nature* 342:440, 1989; Naldini et al., *EMBO J.* 11:4825, 1992).  $\alpha$ -서브유닛은 N-말단 헤어핀 도메인 및 4개의 크링글 (kringle) 도메인으로 구성된 440개의 잔기 (당화된 69 kDa)를 함유한다.  $\beta$ -서브유닛은 234개의 잔기 (34 kDa)를 함유하고, 단백질 분해 활성이 결핍된 세린 프로테아제 유사 도메인을 지닌다. HGF의 분해가 수용체 활성화에 필요하나, 수용체 결합에는 필요치 않다 (Hartmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11574, 1992; Lokker et al., *J. Biol. Chem.* 268:17145, 1992). HGF는 4개의 추정적인 N-당화 부위를 함유하고, 이는  $\alpha$ -서브유닛에 1개가 존재하고,  $\beta$ -서브유닛에 3개가 존재한다. HGF는 세포 표면 및 세포외 기질에 존재하는 cMet 수용체에 대한 고친화성 ( $K_d = 2 \times 10^{-10}$  M) 결합 부위 및 헤파린 설페이트 프로테오글리칸 (HSPG)에 대한 저친화성 ( $K_d = 10^{-9}$  M) 결합 부위의 2개의 독특한 세포 특이적 결합 부위를 지닌다 (Naldini et al., *Oncogene* 6:501, 1991; Bardelli et al., *J. Biotechnol.* 37:109, 1994; Sakata et al., *J. Biol. Chem.*, 272:9457, 1997). NK2 ( $\alpha$ -서브유닛의 N-말단 및 처음 2개의 크링글 도메인을 포함하는 단백질)는 cMet에 결합하여 운동성을 위한 신호 캐스케이드를 활성화시키기에 충분하나, 유사분열 반응을 위해서는 전장 단백질이 필요하다 (Weidner et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:229, 1993). HSPG는 HGF의 N 말단과 상호작용함으로써 HGF에 결합한다 (Aoyama, et al., *Biochem.* 36:10286, 1997; Sakata, et al., *J. Biol. Chem.* 272:9457, 1997). HSPG-HGF 상호작용에서 자명한 역할은 HGF 생체이용률, 생물학적 활성 및 올리고머화의 향상을 포함한다 (Bardelli, et al., *J. Biotechnol.* 37:109, 1994; Zioncheck et al., *J. Biol. Chem.* 270:16871, 1995).

<4> cMet은 클래스 IV 단백질 티로신 키나아제 수용체족중 하나의 일원이다. 전장 cMet 유전자는 클로닝되고, cMet 원종양유전자로 확인되었다 (Cooper et al., *Nature* 311:29, 1984; Park et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6379, 1987). cMet 수용체는 처음에 단일 사슬의 부분적으로 당화된 전구물질인 p170(MET)로 합성되었다 (도 1) (Park et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6379, 1987; Giordano et al., *Nature* 339:155, 1989; Giordano et al., *Oncogene* 4:1383, 1989; Bardelli et al., *J. Biotechnol.* 37:109, 1994). 추가 당화 후, 단백질은 50 kDa의  $\alpha$ -서브유닛 (잔기 1-307) 및 145 kDa의  $\beta$ -서브유닛으로 구성된 이종이합체의 190 kDa의 성숙 단백질 (1385개의 아미노산)으로 단백질 분해적으로 분해된다.  $\beta$ -서브유닛의 세포질 티로신 키나아제 도메인은 신호전달과 관련된다.

<5> HGF/cMET의 효과적인 길항 분자; 즉 NK1 (N 말단 도메인 + 크링글 도메인 1; Lokker et al., *J. Biol. Chem.* 268:17145, 1993), NK2 (N 말단 도메인 + 크링글 도메인 1 및 2; Chan et al., *Science* 254:1382, 1991) 및 NK4 (N-말단 도메인 + 4개의 크링글 도메인; Kuba et al., *Cancer Res.* 60:6737, 2000) 및 항-cMet mAbs (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998)와 같은 트렁케이팅 (truncating)된 HGF 단백질을 수득하기 위한 일환으로 여러 다양한 실험이 연구되었다.

<6> 가장 최근에, 카오 등 (Cao et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98: 7443, 2001, 참조로서 본원에 포함됨)은 HGF에 대한 3개의 mAb의 배합물의 투여가 마우스의 피하 신경아교종 이종이식편의 성장을 억제하였음을 보고하였다. 모든 목적상 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 WO 2005/017107 A2호에는 단일한 항-HGF mAb를 이용한 처리가 마우스의 피하 신경아교종 이종이식편의 성장을 억제함이 보고되어 있다. 그러나, 이들 공개는 항-HGF 또는 기타 mAb의 전신 투여가 혈액뇌장벽이 장애물로 작용하는 뇌의 종양의 성장을 억제할 수 있는지의 여

부의 문제를 다루지 않는다 (Rich et al., Nat. Rev. Drug Discov. 3: 430, 2004). 또한, 중추신경계 (CNS) 종양에 대한 전신적 항체 요법의 기존에 관찰된 무효능은 CNS 전이에 대한 제한된 혈관 투과성에 기인되었다 (Bendell et al., Cancer 97: 2972, 2003).

<7> 따라서, mAb의 전신 투여에 의해 뇌종양을 치료하는 방법이 요구된다. 본 발명은 이러한 요구 및 기타 요구를 충족시킨다.

**발명의 상세한 설명**

<8> **발명의 개요**

<9> 한 구체예에서, 본 발명은 mAb의 전신 투여에 의해 환자의 뇌종양을 치료하는 방법을 제공한다. 뇌종양은 신경아교종, 예를들어 성상세포종, 예를들어 아교모세포종일 수 있다. 예를들어, 투여는 정맥내, 근내 또는 피하 경로에 의할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, mAb는 간세포 성장인자 (HGF)에 대한 중화 mAb, 예를들어 인간화된 L2G7 mAb이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, mAb, 예를들어 중화 항-HGF mAb의 전신 투여는 뇌종양의 퇴행을 유도하기 위해 사용된다.

**실시예**

<42> 1. 항-HGF mAb의 생성 및 시험관내 특성

<43> 완전 중화 항-HGF mAb L2G7의 개발은 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 출원 공개 US 2005/0019327 A1호에 기술되어 있다. 요약하면, Balb/c 마우스를 족저 주사에 의해 재조합 인간 HGF로 광범위하게 면역화시키고, 통상적인 방법에 의해 이들로부터 하이브리도마를 생성시켰다. Flag 펩티드에 융합된 HGF (HGF-Flag), 및 인간 IgG1 Fc 영역에 융합된 Met 세포외 도메인 (Met-Fc)으로 구성된 키메라 융합 단백질을 통상적인 재조합 기술로 생성시키고, Met 수용체에 대한 HGF의 결합을 억제하는 항-HGF mAb의 능력을 결정하기 위해 사용하였다. 도 1a는 각각 상이한 에피토프를 인지하여 용액 중의 HGF를 포획하는 세개의 별개의 항-HGF mAb의 능력을 입증한다. IgG2a mAb L2G7은 결합 능력에 의해 판단하는 경우 HGF에 대한 중간 친화성을 지니지만, ELISA에서는 mAb만이 Met-Fc에 대한 HGF-Flag의 결합을 완전히 차단하는 것으로 확인된다 (도 1b). mAb L2G7는 VEGF, FGF 또는 EGF와 같은 기타 성장인자에는 결합을 나타내지 않으므로, HGF에 대해 특이적이다.

<44> Met에 대한 HGF 결합을 차단시키는 mAb L2G7의 능력은 mAb L2G7가 모든 HGF에 의해 유도되는 세포 반응을 억제하는 것을 암시하지만, HGF의  $\alpha$  및  $\beta$ -서브유닛은 다양한 활성을 매개하므로 상기 가정은 입증은 필요로 한다 (Lokker et al, EMBO J. 11: 2503, 1992; Hartmann et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 89: 11574, 1992). 대안적 명칭인 "분산 인자"가 유래되는,  $\alpha$ -서브유닛을 통해 매개되는 HGF의 하나의 중요한 생물 활성은 세포 분산을 유도하는 능력이다. 도 2a는 L2G7가 HGF 분산 활성을 정량하기 위한 생물학적 검정으로 광범위하게 사용되는 MDCK 내피 세포의 HGF에 의해 유도되는 분산을 완전히 억제할 수 있음을 나타낸다.  $\beta$  서브유닛을 통해 매개되는 HGF의 중요한 생물학적 활성은 특정 세포 유형의 유사분열이다. 도 2b는 Mv 1 Lu 밍크 폐 내피세포에서 1:1 몰비의 mAb 대 HGF에서 L2G7가 HGF에 의해 유도되는 3H-티미딘 통합을 완전하게 억제하는 것을 나타낸다. 따라서, mAb L2G7은  $\alpha$ - 및  $\beta$ -HGF 서브유닛 둘 모두에 기인하는 HGF에 의해 유도되는 생물학적 활성을 차단한다.

<45> 고형 종양의 성장에는 혈관신생이 필요하다. HGF는 효능있는 혈관신생 인자이고 (Grant et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 90: 1937, 1993), HGF의 종양 수준은 신경아교종을 포함하는 인간 악성종양의 혈관 밀도와 관련된다 (Schmidt, et al. Int. J. Cancer 84: 10, 1999). HGF는 또한 기타 혈관신생 인자, 예를들어 VEGF의 생성을 자극할 수 있고, VEGF에 의해 유도되는 혈관신생에 효력을 더할 수 있다 (Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001). 혈관신생과 관련된 두개의 초기 단계는 내피세포 증식 및 세관 형성이다. 따라서, 3 차원 콜라겐 겔에서의 인간 제정맥 내피 세포 (HUVEC)의 HGF에 의해 유도된 증식 및 혈관-유사 세관의 형성에 대한 L2G7의 효과를 결정하였다. HGF (50 ng/ml, 72 시간)에 의한 HUVEC 증식의 자극은 1.5:1의 mAb 대 HGF 몰비에 서 L2G7에 의해 완전히 억제되었다 (도 2c). 3-D 콜라겐 겔에 부유된 HUVEC은 HGF (200 ng/ml, 48 시간)의 자극 후에 상호연결된 분지된 세관 네트워크를 발달시킨 반면, HGF + L2G7로 처리된 세포는 상기 세관 형성을 거의 나타내지 않거나 아예 나타내지 않았다 (도 2d). 그러므로 L2G7는 HGF에 의해 유도되는 혈관신생의 증식성 및 형태적 양상을 차단한다.

<46> HGF는 암 치료에 통상적으로 사용되는 DNA-손상 작용제를 포함하는 다수의 종류에 의해 유도된 아포토시스 사멸로부터 종양 세포를 보호한다 (Bowers et al. Cancer Res. 60: 4277, 2000; Fan et al. Oncogene 24: 1749,

2005). 인간 악성종양 신경아교종 세포의 대부분은 이들 세포를 시험관 내에서 항-FAS 항체에 의해 유도되는 아포토시스에 민감하게 만드는 사멸 수용체 FAS를 발현한다 (Weller et al. J. Clin. Invest. 94: 954, 1994). 따라서, 아포토시스 항-FAS mAb CH-11로 처리된 U87 신경아교종 세포의 HGF 매개 세포보호에 대한 L2G7의 효과를 결정하였다. CH-11 처리 (24시간)후의 U87 세포 생활력은 처리되지 않은 대조군의 생활력의 ~45%로 감소하였고, 이러한 효과는 세포를 관계 없는 동형 대조 항체의 존재하에서 HGF와 함께 인큐베이션시키는 것과 완전히 반대였으나, L2G7의 존재하에서 HGF와의 인큐베이션은 그렇지 않았다 (도 2e).

<47> 2. 신경아교종 이종이식 종양 모델에서의 항-HGF mAb의 효과

<48> HGF의 다중 종양 촉진 활성을 차단하는 L2G7의 능력은 이러한 mAb가 최소한 HGF+/Met+ 인간 종양에 대해 항종양 활성을 지니는 것을 암시한다. 대부분의 신경아교종은 Met 및 HGF를 발현하는 것으로 보인다 (Rosen et al. Int. J. Cancer 67: 248, 1996). 신경아교종 세포주 U87 및 U118에 대해, Met 발현은 유세포분석법에 의해 확인되었고, HGF-특이적 ELISA를 이용하는 7-일의 컨플루언스 (confluence) 배양물로부터의 상층액 중에서 ~20-35 ng/ml의 HGF가 검출되었다. 미리 확립된 U118 및 U87 피하 이종이식편의 누드 마우스 모델에서의 L2G7의 항종양 효과를 검출하였다. 문헌[Kim et al., Nature 362: 841, 1993, 참조로서 본원에 포함됨]에 기술된 바와 같이 종양 크기가 ~50 mm<sup>3</sup>에 도달된 후 매주 2회 L2G7를 복막내 투여하였다. 주사당 100 µg (~5 mg/kg)에서, L2G7는 U118 종양의 성장을 완전히 억제하였다 (도 3a). U87 이종이식편 모델에서, 주사당 50 µg 또는 100 µg의 L2G7는 종양 성장을 억제하였을 뿐만 아니라, 실질적으로 종양 퇴행을 야기시켰다 (도 3b). 대조 mAb (주사당 100 µg)는 PBS 대조군에 비해 종양 성장을 단지 약간 억제시켰다. L2G7는 Met를 발현하나 HGF를 분비하지 않는 U251 신경아교종 종양 이종이식편의 성장에 효과가 없었다. 이러한 생체내 결과는 단일 작용제로서 L2G7가 HGF 활성을 특이적으로 차단함으로써 종양 성장을 방지하는 것을 입증한다.

<49> 다음으로, 미리 확립된 두개내 U87 신경아교종 이종이식편을 지니는 마우스에서 L2G7 효능을 검사하였다. 우측 꼬리/조가비핵으로의 정위 주사에 의해 U87 인간 악성종양 신경아교종 세포 (100,000 세포/동물)를 마우스에 이식하였다. 5일 내지 52일의 이식후 투여된 L2G7 (100 µg/주사, 복막내, 1주일에 2회)는 동물 생존을 현저하게 연장시켰다 (도 3c). 대조 마우스에서, 정중 생존은 39일이었고, 모든 마우스는 41일까지 진행성 종양으로 사망하였다. 대조적으로, L2G7 처리된 모든 마우스는 70일에 걸쳐 생존하였고, 80%는 90에 걸쳐 생존하였으며, mAb 처리의 중지후 7주간 생존하였다 (도 3c). 희생된 마우스에서, L2G7의 3회 투여후 21일째에 대조 종양은 L2G7 처리된 종양보다 10배가 컸다 (6.6 + 2.7 mm<sup>3</sup> 대 0.54 + 0.17 mm<sup>3</sup>) (도 3d).

<50> 보다 엄격한 조건하에서 mAb 효능을 시험하기 위해, 유사한 실험으로 L2G7 처리의 개시를 18일까지 지연시켰다. 마우스의 서브셋 (n = 그룹당 5마리) 처리 과정 초기에 희생시키고, 컴퓨터 보조 영상 분석을 이용하여 H&E 염색된 뇌 절편의 종양 단면 영역을 측정함으로써 종양 부피를 정량하였다. L2G7는 실질적인 종양 퇴행을 유도하였다 (도 3e, f). 특히, 18일째에 전처리된 종양 부피는 26.7 + 2.5 mm<sup>3</sup> (범위 19.5-54 mm<sup>3</sup>, 정중 27.9 mm<sup>3</sup>)이었다. 29일째에, L2G7의 3회 투여후, 종양은 단지 11.7 + 5.0 mm<sup>3</sup> (범위 0-26.2 mm<sup>3</sup>, 정중 7.5 mm<sup>3</sup>)이었고, 종양은 크기가 평균 50% 또는 이 이상으로 실질적으로 퇴행하거나 수축하였다. 동형 매치된 대조군 mAb로 처리된 마우스로부터 29일째의 종양 부피는 134.3 + 22.0 mm<sup>3</sup> (범위 71.2-196.8 mm<sup>3</sup>, 정중 128 mm<sup>3</sup>)이었다. 그러므로, 대조 mAb로 처리된 종양은 L2G7 처리된 종양보다 12배 더 큰 평균 부피와 함께 거의 5배로 성장하였다. 희생되지 않은 마우스 (n = 그룹당 10마리)에서, 대조군 마우스에서의 정중 생존은 32일이었고 42일째에 모두 사망한 데 비해, L2G7 처리된 마우스는 46일까지 사망하지 않았으며, L2G7는 정중 생존을 61일까지 연장시켰다. 따라서, L2G7는 매우 높은 종양 부담을 지니는 마우스에서 종양 퇴행을 유도하였다.

<51> L2G7의 항종양 효과의 잠재적인 메커니즘을 연구하기 위해 두개내 종양의 조직학적 단면의 보다 상세한 분석을 수행하였다 (도 4). L2G7의 3회의 투여후, 종양 세포 증식 (Ki-67 지표) 및 혈관신생 (혈관 밀도, 즉 종양 영역의 백분율에 따른 항-알라닌 염색된 종양 혈관의 영역)은 각각 51% 및 62%로 감소한 반면, 활성화된 카스파아제-3 양성 세포의 수에 의해 정량화된 종양 세포의 아포토시스 지표는 6배 증가하였다. L2G7 요법을 개시한 직후 발생한 현저한 종양 퇴행은 효능제인 항-사멸 수용체 4 (TRAIL1) mAb로 처리된 인간 결장 종양 콜로 (Colo) 205 이종이식편에서 관찰된 것과 유사한 세포 사멸 반응을 나타낸다 (Chuntharapai et al. J. Immunol. 166: 4891, 2001).

<52> 본원에 보고된 결과는 독소 또는 방사선훈종과 관련되지 않은 mAb로부터의 뇌종양 반응의 인상적인 예시이다. 비교시, 피하 이종이식 모델에서 후에 인간화되어 약물 아바스틴 (Avastin®)을 생성시키는 항-VEGF 무린 mAb

A4.6.1은 G55 인간 신경아교종의 성장을 단지 ~50-60% 억제 (Kim et al., Nature 362: 841, 1993)하는 것과는 대조적으로, mAb L2G7에 의해서는 U87 및 U118 신경아교종의 성장이 본질적으로 완전히 억제되었다. 동소 두개 내 종양 모델에서, G55 신경아교종 세포 이식과 동시에 전신 투여된 항-VEGF mAb는 동물 생존을 단지 2-3주 연장시켰다 (Rubenstein et al. Neoplasia 2: 306, 2000). 유사하게, EGF 수용체의 변이체에 대한 mAb의 전신 투여는 변이체 EGF 수용체로 트랜스펙션된 신경아교종 세포의 두개내 이종이식편을 지닌 마우스의 정중 생존을 일반적으로 약간 (13일 내지 21일 또는 13일 내지 19일, 몇몇 경우에는 19일 내지 58일; Mishima et al., Cancer Res. 61: 4349, 2001) 연장시켰다. 그러나, 이러한 약간의 효과는 mAb 투여가 이종이식편 이식과 동시 또는 직후에 시작하는 경우에 달성되므로, 이종이식편 혈관신생의 개시의 지연에 의해서는 최소한 부분적으로는 미리 존재하는 뇌종양을 지닌 환자를 표적으로 할 수 없는 경우가 야기될 수 있다. 대조적으로, 항-HGF mAb L2G7의 전신 투여는 생존을 연장시켰고, 종양이 미리 확립된 경우 이식후 5일 또는 18일 후에 투여되는 경우에도 종양 퇴행을 야기시켰고, 따라서 인간 환자의 상황에 부합한다.

- <53> mAb L2G7의 현저한 항암 효과는 이의 분자 표적인 HGF의 독특한 다기능 특성, 즉 유사분열, 혈관신생 및 세포보호에 기인하는 듯 하다 (Birchmeier et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 915, 2003; Trusolino et al. Nat. Rev. Cancer 4: 289, 2002). 신경아교종 퇴행을 유도하는 L2G7의 능력은, Met에 대한 HGF 결합에 의해 차단되는 Fas 매개 아포토시스 (Wang et al. Cell. 9 : 411, 2002), 또는 포스포티딜 이노시톨 3-키나아제, Akt 및 NF-카파B 중간체를 포함하는 HGF에 의해 유도되는 세포보호 경로의 비활성화 (Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005)로부터 발생할 수 있는 세포 사멸 반응을 의미한다. HGF의 세포보호 및 신생혈관 효과를 차단하는 L2G7의 능력은 전신 전달된 L2G7가 악성종양 뇌종양을 치료하기 위해 현재 사용되는 세포독성 종류, 예를 들어  $\gamma$ -방사선 및 화학요법에 효력을 더하는 것을 예상케 한다.
- <54> 본 발명은 바람직한 구체예를 참조로 기술하였으나, 본 발명을 벗어남이 없이 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.
- <55> 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물, 특허 및 특허 출원이 이들의 전체 내용이 모든 목적상 본원에 참조로서 포함되는 것으로 특별히 개별적으로 지시되어 있는 경우와 같이 전체 내용이 모든 목적상 참조로서 본원에 포함된다.

**도면의 간단한 설명**

- <10> 도 1. ELISA에 의해 측정된 항-HGF mAb의 결합 및 차단 활성. A. 결합에서, mAb는 염소 항-마우스 IgG 코팅된 ELISA 플레이트 상에 포획되고, BSA로 블로킹되고, HGF-Flag (1  $\mu$ g/ml)와 함께 인큐베이션된 후, HRP-M2 항-Flag mAb (Invitrogen)와 함께 인큐베이션되었다. B. Met-Fc 결합에 대한 HGF-Flag의 블로킹에서, 플레이트는 염소 항-인간 IgG-Fc로 코팅되고, BSA로 블로킹되고, Met-Fc (2  $\mu$ g/ml)와 함께 인큐베이션된 후, HGF-Flag (1  $\mu$ g/ml) +/- 항-HGF mAb와 함께 인큐베이션되었다. HGF-Flag 결합은 HRP-M2 항-Flag mAb로 검출되었다.
- <11> 도 2. HGF의 분산, 유사분열, 혈관신생, 항-아포토시스 활성에 대한 mAb L2G7의 블로킹 효과. A. MDCK 세포 (ATCC)는 문헌[Cao et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 98: 7443, 2001]에 기술된 바와 같이 2일 동안 50 ng/ml의 HGF +/- 10  $\mu$ g/ml의 L2G7로 자극되었다. 세포는 크리스탈 바이올렛으로 염색된 후 100x의 배율에서 사진이 찍혔다. B. Mv 1 Lu 링크 폐 내피 세포 (ATCC; 5 x 10<sup>4</sup> 세포/ml)가 24시간 동안 HGF (50 ng/ml) 및 L2G7 또는 동형 매치된 대조군 mAb (mIgG)를 지니거나 이를 지니지 않는 혈청을 포함하지 않는 DMEM에서 인큐베이션되고, 세포 증식의 수준이 6시간 동안 3H-티미딘의 첨가에 의해 결정되었다. C. 문헌[Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001]에 기술된 바와 같이, HUVEC (CAMBREX; 10<sup>4</sup> 세포/100  $\mu$ l/웰)은 72시간 동안 HGF (50 ng/ml) 및 L2G7 또는 대조군 mAb를 지니거나 이를 지니지 않는 EBM-2/0.1% FCS에서 인큐베이션되고, 증식 수준은 WST-1의 첨가에 의해 결정되었다. D. 문헌[Xin et al. Am. J. Pathol. 158, 1111, 2001]에 기술된 바와 같이, DMEM/젤의 HUVEC (6 x 10<sup>4</sup> 세포/100  $\mu$ l/웰)은 200 ng/ml의 HGF +/- 20  $\mu$ g/ml의 L2G7를 지니거나 이를 지니지 않는 100  $\mu$ l/웰의 EBM-2/0.1% FCS/0.1% BSA로 오버레이(overlaying)되었다. 48시간의 인큐베이션 후, 세포는 고정되고, 툴루이딘 블루를 이용하여 염색되고, 40x의 배율로 사진이 찍혔다. E. 문헌[Fan et al. Oncogene 24: 1749, 2005]에 기술된 바와 같이, 혈청을 포함하지 않는 DMEM 중의 U87 종양 세포는 48시간 동안 HGF (20 ng/ml) +/- mAb L2G7 (20  $\mu$ g/ml) 또는 동형 대조군 항체 (mIgG)를 이용하거나 이를 이용하지 않고 처리된 후, 24시간 동안 항-Fas mAb CH-11 (Upstate Biotechnology, 40 ng/ml)로 처리되고, 세포 생활력이 WST-1의 첨가에 의해 결정되었다. b, c 및 e에서, 값은 평균 +/- s.d.이다.

<12> 도 3. L2G7에 의한 신경아교종 종양 이중이식편의 억제 또는 퇴행. U118 (A) 또는 U87 (B) 신경아교종 종양 세포는 문헌[Kim et al., Nature 362: 841, 1993]에 기술된 바와 같이 NIH III 베이지/누드 마우스로 피하 이식되고, 종양 크기가 모니터되었다. 종양 크기가 ~50mm<sup>3</sup>에 도달한 후, 마우스 그룹 (n = 6 또는 7마리)은 표시된 바와 같이 1주일에 2회 50 또는 100 μg의 L2G7 또는 100 μg의 동형 매치된 대조군 mAb (mIgG) 또는 PBS로 정맥내 처리되었다; 화살표는 치료의 첫번째 날을 나타낸다. 값은 평균 종양 부피 +/- s.e.m.이다. C. U87 종양 세포 (마우스당 10<sup>5</sup>개)가 문헌[Abounader et al. FASEB J. 16, 108, 2002]에 기술된 바와 같이 Scid/베이지 마우스의 꼬리/조가비핵에 두개내 주사되었다. 화살표로 표시된 바와 같이 5일 및 52일에서의 각각의 출발 및 종료시, 마우스 그룹 (n = 10마리)에 1주일에 2회 100 μg의 L2G7 또는 PBS가 복막내 투여되고, 생존이 관찰되었다. 카플란-마이어 작도로 생존 연구가 분석되었다. D. 문헌[Abounader et al. FASEB J. 16, 108, 2002]에 기술된 바와 같이 1주일에 2회 100 μg의 L2G7 또는 PBS로 복막내 처리의 3번 투여 후 21일째에 희생된 대표 마우스로부터 U87 두개내 이중이식편의 크기를 나타내는 뇌 단면이 제조되었다. E. L2G7으로 처리 시작 18일 전 및 3회 처리 후 29일 후의 개별적 마우스에서의 두개내 U87 종양 부피. F. L2G7 또는 대조군 mAb로 처리 시작 18일 전 및 처리 후 29일 후의 대표 마우스로부터의 뇌 단면.

<13> 도 4. U87 두개내 이중이식편을 지닌 마우스로부터의 뇌 단면의 조직학적 분석. 미리 확립된 종양을 L2G7 또는 대조군으로 1주일에 2회 3번 투여의 치료 후에 마우스가 희생되었다. 관류-고정된 냉동미세절단 단면이 H&E 및 지정된 항체를 이용하여 염색되고, 컴퓨터-보조 영상 분석을 이용하여 지수가 정량화되었다. A. 증식 세포를 검출하기 위한 항-Ki67 (DAKO). B. 혈관을 검출하기 위한 항-라미닌 (Life Technologies). C. 아포토시스 종양 세포 반응을 검출하기 위한 분해된 카스파아제-3에 대한 항체 (Cell Signaling Technology).

<14> **발명의 상세한 설명**

<15> 본 발명은 HGF에 대한 중화 mAb, 또는 성장인자와 같은 기타 사이토카인 또는 사이토카인 수용체와 같은 세포 표면 단백질에 대한 항체를 전신 투여함으로써 뇌종양을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 실시를 위해 메커니즘의 이해가 요구되지는 않지만, 본 발명의 성공은 적어도 부분적으로는 종양 내의 불완전한 혈액뇌장벽에 기인한 혈액으로부터의 뇌종양으로의 항체의 통과에 기인되는 것으로 생각된다.

<16> 1. 항체

<17> 항체는 복잡한 내부 구조를 지니는 매우 거대하고 복잡한 분자 (~150,000 또는 약 1320개의 아미노산의 분자량)이다. 천연 항체 분자는 두개의 동일한 쌍의 폴리펩티드를 함유하고, 각각의 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 지닌다. 각각의 경쇄 및 중쇄는 차례로 두개의 영역으로 구성된다: 표적 항원의 결합과 관련된 가변 ("V") 영역, 및 면역계의 기타 성분과 상호작용하는 불변 ("C") 영역. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 함께 3차원 공간으로 폴딩되어 항원 (예를들어, 세포의 표면 상의 수용체)에 결합하는 가변 영역을 형성한다. 각각의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내에는 상보성 결정 영역 ("CDR")로 불리는 세계의 짧은 세그먼트 (평균 10개의 아미노산 길이)가 존재한다. 항체 가변 도메인의 6개의 CDR (경쇄로부터 3개 및 중쇄로부터 3개)은 함께 3-D 공간으로 폴딩되어 표적 항원을 붙잡는 실제 항체 결합 부위를 형성한다. CDR의 위치 및 길이는 문헌[Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987]에 정확하게 규명되어 있다. CDR에 함유되지 않은 가변 영역의 부분은 CDR에 대한 환경을 형성하는 프레임워크로 언급된다.

<18> 모노클로날 항체 (mAb)는 단일 분자 항체종이고, 따라서 항원을 동물 (예를들어, 설치류, 래빗 또는 염소)에 주사하고, 상기 동물로부터 혈청을 추출함으로써 생성된 폴리클로날 항체를 포함하지 않는다. 인간화된 항체는 마우스 항체 (래트, 햄스터 또는 기타 유사종일 수도 있는 "공여자 항체")로부터의 CDR이 인간 항체 ("수용자 항체")로 이식된 유전공학처리된 (모노클로날) 항체이다. 인간화된 항체는 또한 마우스 항체로부터의 덜 완전한 CDR을 이용하여 제조될 수 있다 (참조: Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). 따라서, 인간화된 항체는 공여자 항체로부터의 CDR, 및 인간 항체로부터의 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역을 지니는 항체이다. 또한, 높은 결합 친화성을 보유하기 위해, 두개의 추가 구조 요소중 하나 이상이 이용될 수 있다. 인간화된 항체의 제작에 대한 상세한 설명을 제공하는, 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제 5,530,101호 및 제 5,585,089호를 참조하라.

<19> 첫번째 구조 요소에서, 인간화된 항체의 중쇄 가변 영역의 프레임워크는 다수의 공지된 인간 항체로부터 수용자 항체를 적절하게 선택함으로써 공여자 항체의 중쇄 가변 영역의 프레임워크와 최대 서열 동일성 (65% 내지 95%)을 지니도록 선택된다. 두번째 구조 성분에서, 인간화된 항체의 제작에서 인간 수용자 항체의 프레임워크

(CDR 외부) 내에서 선택된 아미노산은 특정된 규칙에 따라 공여자 항체로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된다. 특히, 프레임워크 내에서 대체되는 아미노산은 CDR과 상호작용하는 이들의 능력을 기초로 하여 선택된다. 예를들어, 대체된 아미노산은 3-차원 공간에서 측정시 공여자 항체 서열 내의 CDR에 인접될 수 있거나 인간화된 항체 내의 CDR의 4-6 용스트롬 내에 인접될 수 있다.

<20> 키메라 항체는 마우스 (또는 기타 설치류) 항체의 가변 영역이 인간 항체의 불변 영역과 조합된 항체이며; 유전 공학에 의한 이들의 제작은 널리 공지되어 있다. 이러한 항체는 인간 항체의 약 2/3인 마우스 항체의 결합 특이성을 보유한다. 마우스, 키메라 및 인간화된 항체에 존재하는 비인간 서열의 비율은 키메라 항체의 면역원성이 마우스 및 인간화된 항체 사이의 중간임을 암시한다. 마우스 항체에 비해 감소된 면역원성을 지닐 수 있는 유전공학처리된 항체의 기타 유형은 파지 디스플레이 방법 (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; and Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, 이들 각각은 본원에 참조로서 포함됨) 또는 트랜스제닉 동물 (Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, 이들 각각은 본원에 참조로서 포함됨)을 이용하여 제조된 인간 항체를 포함한다.

<21> 본원에서 사용되는 용어 "인간-유사" 항체는 하나 또는 둘 모두의 사슬의 아미노산 서열의 많은 (예를들어, 약 50% 또는 이 이상)이 인간 면역글로불린 유전자로부터 유래된 mAb를 의미한다. 그러므로, 인간-유사 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 사용되는 "감소된-면역원성" 항체는 인간 환자에 투여시 마우스 항체 보다 현저하게 적은 면역원성을 지니는 것으로 예상되는 것이다. 이러한 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체 뿐만 아니라 B-세포 에피토프 또는 T-세포 에피토프, 예를들어 노출되는 잔기에 기여할 수 있는 마우스 항체 내의 특정 아미노산을 대체함으로써 제조된 항체를 포함한다 (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). 본원에서 사용되는 "유전공학처리된" 항체는 유전자 재조합 DNA 기술의 도움으로 제작되거나 비천연 환경 (예를들어, 마우스내 또는 박테리오파지 상의 인간 유전자)에 놓여진 것이며, 따라서 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 제조된 마우스 mAb를 포함하지 않는다.

<22> mAb의 에피토프는 mAb가 결합하는 항원의 영역이다. 두개의 항체는 각각의 항체가 항원에 대한 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제 (차단)하는 경우 동일한 에피토프 또는 중첩 (overlapping) 에피토프에 결합한다. 즉, 하나의 항체의 1x, 5x, 10x, 20x 또는 100x 과량은 경쟁 결합 분석으로 측정시 50% 이상, 바람직하게는 75%, 90% 또는 99%으로 다른 항체의 결합을 억제한다 (참조: Junghans et al, Cancer Res. 50:1495, 1990, 본원에 참조로서 포함됨). 대안적으로, 두개의 항체는 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 항원 내의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항원의 결합을 감소시키거나 배제시키는 경우 동일한 에피토프를 지닌다. 두개의 항체는 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 몇몇 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 배제시키는 경우 중첩 에피토프를 지닌다.

<23> 2. 중화 항-HGF 항체

<24> HGF에 결합하는 모노클로날 항체 (mAb) (즉, 항-HGF mAb)는 이러한 결합이 HGF의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제하는 경우 (즉, mAb가 단일 작용제로 사용되는 경우) HGF를 중화한다고 말하거나 HGF가 중화된다고 말한다. 중화 항체가 억제할 수 있는 HGF의 생물학적 특성은, 예를들어 인간 혈관내피세포 (HUVEC) 증식 또는 관 형성의 자극 또는 병아리 배아용모요막 (CAM)에 적용시 혈관의 유도에 의해 측정시 cMet 수용체에 결합하여 특정 세포주, 예를들어 매딘-다비 (Madin-Darby) 개 신장 (MDCK) 세포의 분산을 야기시키거나; 간세포, 4MBr-5 원숭이 내피 세포, 및 다양한 인간 종양 세포를 포함하는 특정 세포의 증식 (즉, 상기 세포들의 유사분열)을 자극시키거나; 혈관신생을 자극하는 HGF의 능력이다. 본 발명에 사용되는 항체는 바람직하게는 인간 HGF, 즉 등록 번호 D90334를 지닌 유전자은행 (GenBank) 서열에 의해 엔코딩되는 단백질에 결합한다. 유사하게, 중화 항체, 즉 임의의 사이토카인 또는 사이토카인 수용체에 대한 길항 항체는 수용체에 대한 사이토카인의 결합을 억제할 수 있고/거나 사이토카인에 의한 세포로의 신호 전달을 억제할 수 있다. 사이토카인 이성장 인자인 경우, 상기 항체는 사이토카인에 의해 유도된 세포의 증식을 억제할 수 있다.

<25> 본 발명에 사용된 중화 mAb는 통상적으로 예컨대 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 또는 50 µg/ml의 농도에서 사이토카인, 예를들어 HGF의 생물학적 기능 (예를들어, 증식 또는 혈관신생의 자극)을 하기 실시예에 기술된 방법 또는 당 분야에 공지된 방법으로 측정시 50% 이상, 바람직하게는 75%, 더욱 바람직하게는 90% 또는 95% 또는 99%로 억제한다. 통상적으로, 억제 정도는 사용되는 사이토카인의 양이 단지 생물학적 활성을 완전히 자극하기에 충분하거나, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3 또는 10 µg/ml인 경우에 측정된다. 바람직하게는, 50%, 75%, 90% 또는 95% 이상 또는 본질적으로 완전한 억제는 사이토카인에 대한 항체의 몰 비가 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x 또는 10x인

경우에 달성된다. 바람직하게는, mAb는 단일 작용제로 사용되는 경우에 생물학적 활성을 억제하는 중화 항체이지만, 몇몇 방법에서, 두개의 mAb가 함께 사용되어 억제를 발생시킨다. 가장 바람직하게는, mAb는 단지 하나가 아니라 상기 기술된 생물학적 활성중 여러 활성을 중화시키는데; 본원에서의 목적상 HGF의 모든 생물학적 활성을 중화시키는 단일 작용제로 사용되는 항-HGF mAb가 "완전 중화"로 언급되고, 이러한 mAb가 가장 바람직하다. 본 발명에 사용되는 mAb는 바람직하게는 HGF에 대해 특이적으로, 이들은 HGF와 관련된 단백질, 예를들어 섬유모세포 성장인자 (FGF) 및 혈관내피세포 성장인자 (VEGF)에 결합하지 않거나, 훨씬 적은 정도로 이에 결합한다. mAb는 통상적으로  $10^7 M^{-1}$  이상, 바람직하게는  $10^8 M^{-1}$  또는 이 이상, 가장 바람직하게는  $10^9 M^{-1}$  또는 이 이상, 또는  $10^{10} M^{-1}$  또는 이 이상의 결합 친화성 ( $K_a$ )을 지닌다.

<26> 본 발명에 사용되는 mAb는 천연 테트라머 형태 (2개의 경쇄 및 2개의 중쇄)의 항체를 포함하고, 공지된 동형 IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE, 및 이들의 서브타입, 즉 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3중 임의의 것일 수 있다. mAb는 또한 항체의 단편, 예를들어 Fv, Fab 및 F(ab')<sub>2</sub>; 이작용성 하이브리드 항체 (참조: Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), 단일-사슬 항체 (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); 및 변경된 불변 영역을 지니는 항체 (참조: U.S. Patent No. 5,624,821)을 포함하는 것을 의미한다. mAb는 동물 (예를들어, 마우스, 래트, 햄스터 또는 닭)에서 유래될 수 있거나, 이들은 유전공학처리될 수 있다. 설치류 mAb는, 예를들어 하기 실시예에 기술된 바와 같이 적절한 애뉴먼트 중의 HGF를 복막내, 정맥내 또는 족저로 다수 면역화시킨 후, 비장 또는 림프절 세포를 적출하고, 적절한 무한증식 세포주와 융합시킨 후, HGF에 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마에 대한 선택을 포함하는, 당 분야에 널리 공지된 표준 방법에 의해 제조된다. 상기 언급된 당 분야에 공지된 방법에 의해 제조된 키메라 및 인간화된 mAb가 본 발명의 바람직한 구체예에 사용된다. 예를들어, 파지 디스플레이 또는 트랜스제닉 마우스 방법에 의해 제조된 인간 항체가 또한 바람직하다 (참조: Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, supra). 더욱 일반적으로, 본원에 규정된 바와 같은 인간-유사의 감소된 면역원성을 지닌 항체 및 유전공학처리된 항체가 모두 바람직하다.

<27> 중화 항-HGF mAb L2G7 (부다페스트 조약에 따라 ATCC 번호 PTA-5162로 미국 미생물 보존센터에 기탁됨)이 본 발명에 사용하기 위한 Mab의 바람직한 예이다. 기탁은 공인된 기탁기관에서 유지될 것이고, 기탁기관에 의한 샘플의 공개에 대한 가장 최근의 요청을 수령후 5년 이상의 기간 동안, 기탁일 후 30년 이상의 기간 동안, 또는 관련 특허의 실시가능한 기간 동안중 가장 긴 기간 동안 돌연변이, 비생활력 또는 파괴의 발생시에 대체될 것이다. 이러한 세포주의 공개적인 이용가능성에 대한 모든 제한은 출원으로부터 특허의 발행시 변경할 수 없이 해제될 것이다. L2G7와 같이 동일하거나 중첩되는 에피토프를 지닌 중화 mAb는 기타 예를 제공한다. L2G7의 변이체, 예를들어 L2G7의 키메라 형태 또는 인간화된 형태가 특히 바람직하다. 본원에 기술된 시험관내 또는 생체내 분석에서 HGF에 결합하고 HGF를 중화시키기 위해 L2G7와 경쟁하는 mAb가 또한 바람직하다. 최소한 CDR 내의 가변 영역 아미노산 서열에서 L2G7와 90%, 95% 또는 99% 동일 (예를들어, 카바트 (Kabat) 번호매김 시스템에 의해 정렬시; Kabat et al., op. cit.)하고, 이의 기능적 특성을 유지하는 mAb, 또는 작은 수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환 (예를들어, 보존성 치환), 결실 또는 삽입에 의해 L2G7와 다른 mAb와 같은 L2G7의 기타 변이체가 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 기타 바람직한 mAb는 본원에 규정된 바와 같은 인간-유사, 감소된 면역원성 및 유전공학처리된 mAb를 포함한다.

<28> 예시된 면역글로불린으로부터의 임의의 아미노산 치환은 바람직하게는 보존성 아미노산 치환이다. 보존성 또는 비보존성으로 아미노산 치환을 분류하기 위해, 아미노산은 다음과 같이 그룹화될 수 있다: 그룹 I (소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II (중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III (산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV (염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V (사슬 배향에 영향을 주는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI (방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존성 치환은 동일한 부류의 아미노산 사이의 치환을 포함한다. 비보존성 치환은 상기 부류중 하나의 일원의 다른 부류의 일원에 대한 변경으로 구성된다.

<29> 본 발명에 사용하기에 바람직한 기타 mAb는 명백하게 명칭 또는 서열로 기술되거나 암시적으로 기술되거나 명백하게 기술된 mAb와 관련하여 기술되는지 간에 US 2005/0019327 A1 또는 WO 2005/017107 A2 (인용된 둘 모두의 출원은 항체 및 모든 기타 목적의 기술을 위해 참조로서 본원에 포함됨)에 기술된 모든 항-HGF mAb를 포함한다. 특히 바람직한 mAb는 상기 참조에 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 및 3.10.1로서 명명되고, WO2005/017107 A2의 SEQ ID NO 24-43으로 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 의해 각각 정의된 하이브리도마에 의해 생성된 mAb; 상기 기술된 mAb중 임의의 것과 동일한 각각의 CDR을 지니는 mAb; 상기 기술된 mAb의 각각의 가변 영역과 90%, 95% 또는 99% 이상 동일하거나, 중요하지 않은 아미노산 치환, 결

실 또는 삽입에 의해서만 상기 mAb와 상이한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 지니는 mAb; 상기 기술된 mAb중 임의의 것과 동일한 HGF의 에피토프에 결합하는 mAb, 및 상기 참조의 청구항 제 1항 내지 제 94항에 포함되는 모든 mAb이다. 서열 동일성은 카뮈 번호매김 규칙을 이용하여 정렬된 면역글로불린 가변 영역 서열 사이에서 결정된다.

<30> 기타 구체예에서, 본 발명에 사용하기 위한 mAb, 즉 mAb의 전신 투여에 의해 뇌종양을 치료하기 위한 mAb는 하기 성장 인자중 하나 이상에 결합한다: 혈관내피 세포성장인자 (VEGF); 신경영양인자, 예를들어 신경성장인자 (NGF), 뇌 유래 신경영양인자 (BDNF), 또는 NT-3; 전환성장인자, 예를들어 TGF-알파 또는 TGF-베타 (TGF-β1 및/또는 TGF-β2); 혈소판 유래 성장인자 (PDGF); 내피세포 성장인자 (EGF); 헤레귤린; 에피레귤린; 엠피레귤린; 뉴레귤린 (NRG-1α 및/또는 NRG-1β, NRG-2α 및/또는 NRG-2β, NRG-3, 또는 NRG-4), 인슐린-유사 성장인자 (IGF-1 및 IGF-2); 또는 한 바람직한 구체예에서, 섬유모세포 성장인자 (FGF), 특히 산성 FGF (FGF-1) 또는 가장 바람직하게는 염기성 FGF (FGF-2), 대안적으로 FGF-n (여기서, n은 3 내지 23중 임의의 수임). 일반적으로, 이러한 mAb는 중화 mAb이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에 사용하기 위한 mAb는 상기 언급된 성장인자중 임의의 하나 이상에 대한 세포내 수용체에 결합한다.

<31> 본 발명에 사용하기 위한 천연 mAb는 이들의 하이브리도마로부터 생성될 수 있다. 유전공학처리된 mAb, 예를들어 키메라 또는 인간화된 mAb는 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 발현될 수 있다. 예를들어, 이들의 경쇄 및 중쇄 V 영역을 엔코딩하는 유전자는 중첩 올리고뉴클레오티드로부터 합성되고, 이용가능한 C 영역과 함께 필수 조절 영역, 예를들어 프로모터, 인핸서, 폴리 A 부위 등을 제공하는 발현 벡터 (예를들어, 인비트로젠사 (Invitrogen)에서 시판됨)로 삽입될 수 있다. CMV 프로모터-인핸서의 사용이 바람직하다. 이후, 발현 벡터는 다양한 널리 공지된 방법, 예를들어 리포펙틴 또는 전기천공을 이용하여 다양한 포유동물 세포주, 예를들어 CHO 또는 Sp2/0 및 NS0를 포함하는 비생성 골수종, 및 적절한 항생제 선택에 의해 선택된 항체를 발현하는 세포로 트랜스펙션될 수 있다. 미국 특허 제 5,530,101호를 참조하라. 세포를 시판되는 바이오리액터에서 성장시킴으로써 보다 많은 양의 항체가 생성될 수 있다.

<32> 발현된 후, 본 발명에 사용하기 위한 mAb 또는 기타 항체는 당 분야의 표준 공정, 예를들어 미세여과, 초여과, 단백질 A 또는 G 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 유기 염료 등에 기초한 기타 형태의 친화성 크로마토그래피에 따라 정제될 수 있다. 약학적 용도를 위해 약 90 또는 95% 이상의 균질성의 실질적으로 순수한 항체가 바람직하고, 98% 또는 99% 또는 이 이상의 균질성이 가장 바람직하다.

<33> 3. 치료 방법

<34> 한 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 mAb를 포함하는 약학적 제형을 이용한 치료 방법을 제공한다. 항체의 약학적 제형은 동결건조되거나 수용액의 형태의, 임의로 부형제 또는 안정제를 지니는 생리학적으로 허용되는 담체 중의 mAb를 함유한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 통상적으로 5.0 내지 8.0, 가장 흔하게는 6.0 내지 7.0의 pH의 포스페이트, 시트레이트 또는 아세테이트와 같은 완충제; 염화나트륨, 염화칼륨 및 등장성을 만들기 위한 기타 염과 같은 염; 항산화제, 보존제, 저분자량 폴리펩티드, 단백질, 친수성 중합체, 예를들어 폴리소르베이트 80, 아미노산, 탄수화물, 킬레이트제, 당, 및 당업자에게 공지된 기타 표준 성분을 포함한다 (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). mAb는 통상적으로 1-100 mg/ml, 예를들어 10 mg/ml의 농도로 존재한다. mAb는 또한 리포솜과 같은 운반 작용제로 캡슐화될 수 있다.

<35> 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 mAb, 예를들어 중화 항-HGF mAb 또는 사이토카인 또는 이의 수용체에 대한 항체의 전신 투여에 의해 뇌종양을 지닌 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 환자는 바람직하게는 인간이나, 임의의 포유동물일 수 있다. 전신 투여는 본원에서 mAb가 순환계에 대한 일반적인 접근을 지니, 이에 따라 뇌의 혈관을 포함하는 신체 기관으로 투여되는 경로를 의미한다. 달리 말하면, mAb는 혈액뇌장벽의 주변부에 투여된다. 전신 투여의 예는 정맥내 주입 또는 볼루스 주사, 또는 근내 또는 피하 또는 복막내 투여를 포함한다. 그러나, 전신 투여는 종양, 또는 뇌 또는 이의 주변막 또는 뇌척수액과 같은 기관으로의 직접 주사를 포함하지 않는다. 정맥내 주입은 15분과 같이 짧은 시간에 걸쳐 제공될 수 있으나, 더욱 흔히 30분 동안, 또는 1, 2, 3 또는 4시간 이상에 걸쳐 제공될 수 있다. 제공되는 용량은 치료되는 질환의 추가의 발달을 치료하고, 적어도 부분적으로는 완화시키거나 억제하기에 충분하다 ("치료적 유효량"). 치료적 유효량은 바람직하게는 종양의 퇴행을 야기시키거나, 더욱 바람직하게는 종양의 제거를 야기시킨다. 치료적 유효량은 보통 0.1 내지 5 mg/kg, 예를들어 1, 2, 3 또는 4 mg/kg이나, 10 mg/kg 또는 15 또는 20 mg/kg 만큼 높을 수 있다. 고정된 단위 용량이, 예를들어 50, 100, 200, 500 또는 1000 mg으로 제공될 수 있거나, 상기 용량은 환자의 표면적, 예를

들어 100 mg/m<sup>2</sup>에 기초될 수 있다. 치료되는 질환의 추가 발달을 치료하고, 적어도 부분적으로는 완화시키거나 억제하기에 충분한 빈도로 투여되는 치료적 유효 투여량은 치료적 유효 요법으로 언급된다. 이러한 요법은 바람직하게는 종양의 퇴행을 야기시키거나, 더욱 바람직하게는 종양의 제거를 야기시킨다. 보통, 암을 치료하기 위해 1 내지 8회의 투여 (예를들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)로 투여되나, 10, 20 또는 이 이상의 투여가 제공될 수 있다. mAb는, 예를들어 mAb의 반감기를 기초로 하여 매일, 1주일에 2회, 매주, 격주, 매월 또는 몇몇 기타 간격으로 1주, 2주, 4주, 8주, 3-6개월 또는 이 이상 동안 투여될 수 있다. 만성 투여와 같이 반복 과정의 치료가 또한 가능하다.

<36> 본 발명의 방법, 예를들어 mAb, 예를들어 항-HGF mAb, 특히 L2G7 및 인간화된 L2G7를 포함하는 이의 변이체의 전신 투여는 수막종; 뇌실막세포종, 희소돌기아교세포종, 및 모든 유형의 성상세포종 (저등급, 역형성, 및 다형성 교모세포종 또는 단순 교모세포종)을 포함하는 신경아교종; 수모세포종, 신경절교종, 신경집종, 척삭종; 및 원시신경 외배엽 종양을 포함하는 원발성의 유아의 뇌종양을 포함하는 모든 뇌종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 원발성 뇌종양 (즉, 뇌에서 발생) 및 속발성 또는 전이성 뇌종양 둘 모두가 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있다. 특히 상승된 수준으로 Met 및/또는 HGF를 발현하는 뇌종양이 L2G7 또는 이의 변이체와 같은 중화 항-HGF 항체의 전신 투여에 의한 치료에 특히 적합하다.

<37> 한 바람직한 구체예에서, mAb는 기타 항암 치료와 조합 (즉, 항암 치료전, 치료 동안 또는 치료후)되어 함께 투여된다. 예를들어, mAb, 예를들어 항-HGF mAb, 예를들어 L2G7 및 이의 변이체는 종양학 분야의 당업자에게 공지된 임의의 하나 이상의 화학요법 약물, 예를들어 알킬화제, 예를들어 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥시플라틴, 프로카르바진, 및 시클로포스파미드; 항대사물질, 예를들어 플루오로우라실, 플록스우리딘, 플루다라빈, 젠시타빈, 메토틱세이트 및 히드록시우레아; 천연 생성물, 예를들어 식물 알칼로이드 및 항생제, 예를들어 블레오마이신, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 에토포시드, 미토마이신, 미톡산트론, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 탁솔 (파클리탁셀) 또는 관련 화합물, 예를들어 탁소테레 (Taxotere®); 뇌종양에 대해 특별히 승인된 작용제, 예를들어 테모졸로미드 및 카르무스틴 함유 글리아텔 (Gliadel®) 웨이퍼; 및 기타 약물, 예를들어 이리노테칸 및 글리벡 (Gleevec®) 및 WO 2005/017107 A2 (본원에 참조로서 포함됨)에 기술된 모든 승인된 항암제 및 실험적 항암제와 함께 투여될 수 있다. mAb는 예를들어 표준 화학치료 요법에서 상기 작용제중 1, 2, 3개 또는 이 이상과 조합되어 투여될 수 있다. 항-HGF mAb와 함께 투여될 수 있는 기타 작용제는 생물학적 약제, 예를들어 모노클로날 항체, 예를들어 HER2 항원에 대한 헤르셉틴 (Herceptin™), VEGF에 대한 아바스틴 (Avastin™), EGF 수용체에 대한 항체, 예를들어 에르비투스 (Erbix®), 또는 항-FGF mAb, 뿐만 아니라 소분자 항-혈관신생 약물 또는 EGF 수용체 길항 약물, 예를들어 이레싸 (Iressa®) 및 타르세바 (Tarceva®)를 포함한다. 또한, mAb는 외부 방사선 및 강도 조절 방사선 요법 (IMRT)를 포함하는 임의의 형태의 방사선 요법, 및 감마 나이프 (Gamma Knife), 사이버나이프 (Cyberknife), 라이낙 (Linac), 및 간극 방사선 (interstitial radiation)을 포함하는 임의의 형태의 방사선수술 (예를들어, 이식된 방사능 시드, 글리아사이트 발룬 (GliaSite balloon))과 함께 투여될 수 있다.

<38> 본 발명의 한 바람직한 구체예에서, mAb는 임의의 기타 작용제에 연결되거나 컨쥬게이팅되지 않지만, 기타 구체예에서 mAb는 방사성 동위원소, 화학요법 약물 또는 프로드러그 또는 독소에 컨쥬게이팅될 수 있다. 예를들어, 이는 알파, 베타 및/또는 감마선, 예를들어 90Y를 방출하는 방사성 동위원소, 요오드의 동위원소, 예를들어 131I, 또는 비스무트의 동위원소, 예를들어 212Bi 또는 214Bi; 식물 또는 박테리아 단백질 독소, 예를들어 리신 또는 슈도모나스 외독소 또는 이들의 단편, 예를들어 PE40; 소분자 독소, 예를들어 칼리케아미신 (calicheamicin), 아우리스타틴 (auristatin) 또는 마이탄신 (maytansine)과 관련되거나 이로부터 유래된 화합물; 또는 독소루비신과 같은 화학요법 약물 또는 상기 기술된 임의의 기타 화학요법 약물에 연결될 수 있다. 상기 작용제를 mAb에 연결시키는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

<39> 임의로 기타 치료 (예를들어, 화학요법 또는 방사선 요법)와 함께 mAb, 예를들어 중화 항-HGF mAb, 예를들어 L2G7 또는 이의 변이체의 전신 투여는 특정 뇌종양을 지닌 환자의 생존기간의 정중값 (median progression-free survival) 또는 전체 생존 시간을 mAb의 투여가 없는 대조 요법과 비교시 30% 또는 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60% 내지 70% 또는 100% 또는 이 이상으로 증가시킬 수 있다. 항-HGF mAb의 투여가 기타 치료, 예를들어 화학요법 또는 방사선요법과 동반되는 경우, 기타 치료는 또한 대조 요법에 포함된다. 항-HGF mAb가 기타 치료 없이 투여되는 경우, 대조 요법은 위약이거나 특정 치료가 존재하지 않는다. 또한 또는 대안적으로, 기타 치료 (예를들어, 화학요법 또는 방사선요법)와 함께 mAb, 예를들어 중화 항-HGF mAb, 예를들어 L2G7 또는 이의 변이체의 전신 투여는 상기 기술된 바와 같이 특정 뇌종양을 지닌 환자의 완전반응률 (종양의 완전 퇴행, 즉 소실), 부분반응률 (환자에서의 부분적 반응은, 예를들어 30% 또는 50% 이상으로 종양 크기의 부분적 축소를 의미함),

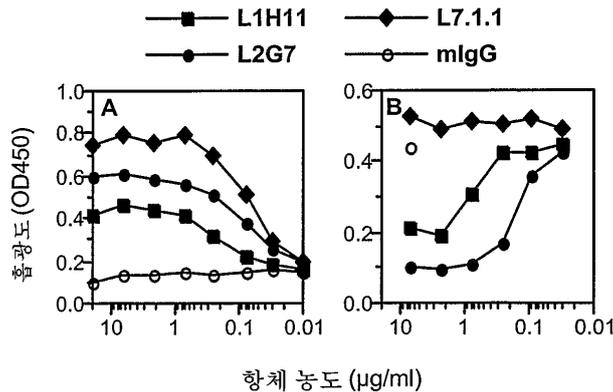
또는 객관적 반응률 (완전반응률 + 부분반응률)을 mAb의 투여가 없는 대조 요법과 비교시 환자의 30% 또는 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60% 내지 70% 또는 90% 또는 이 이상으로 증가시킬 수 있다. 치료에 감응한 종양 크기의 변화는 MRI, CT 주사 등에 의해 결정될 수 있다.

<40> 유사하게, 예를들어 하기 실시예 2에 기술되는 바와 같이 인간 신경아교종 종양의 두개내 이종이식편을 지니는 동물 (예를들어, 면역결핍 마우스, 예를들어 누드마우스 또는 SCID 마우스)에 전신 투여되는 경우, 중화 항-HGF mAb 또는 항-FGF mAb 또는 기타 mAb는 동물의 생존 정중값을 약 25 또는 30 또는 40일, 바람직하게는 50, 60 또는 70일 또는 이 이상으로 연장시킬 것이고, 이러한 연장은 통계적으로 유의할 것이다. 이는 치료 개시가 종양 세포 이식 후 최소한 5일 또는 18일 또는 이 이상까지 지연되는 경우에서도 사실일 것이다. 더욱이, 이러한 치료는 종양을 25% 이상, 바람직하게는 50% 또는 75%로 평균적으로 수축시킬 것이고; mAb로 처리된 동물의 평균 종양 부피는 대조 처리된 동물의 평균 종양 부피의 50% 미만 25% 또는 10% 미만일 것이다. 종양 크기는 통상적으로 종양 세포 이식후 21 또는 29일 후에 측정될 것이다.

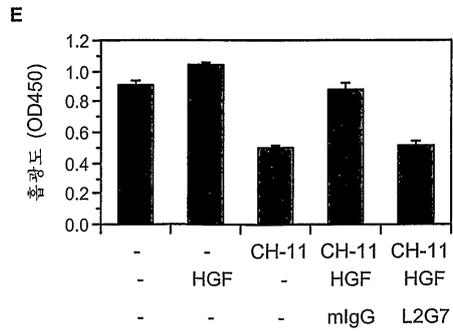
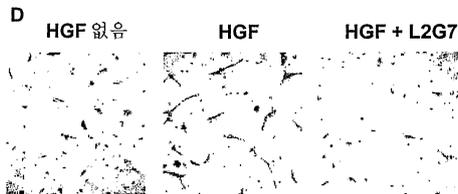
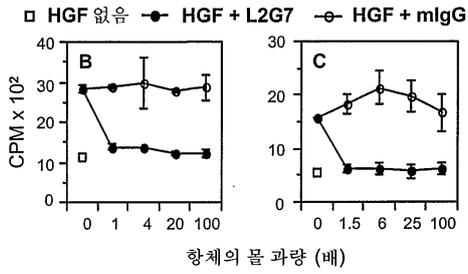
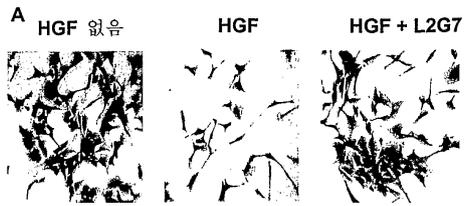
<41> 통상적으로, 임상 실험 (예를들어, 단계 II, 단계 II/III 또는 단계 III 실험)에서, 항체 없이 대조 요법을 받은 환자에 비해, 임의로 기타 치료와 함께 mAb, 예를들어 항-HGF mAb의 투여로 치료된 환자의 생존기간의 정중값 및/또는 반응률에서의 상술된 증가는, 예를들어  $p = 0.05$  또는  $0.01$  또는  $0.001$  수준에서 통계적으로 유의하다. 완전반응률 및 부분반응률은 예를들어 상기 기술되거나 미국 국립암연구소 및/또는 식품의약국에 의해 승인된 암에 대한 임상 실험에서 통상적으로 사용되는 객관적 기준에 의해 결정된다.

도면

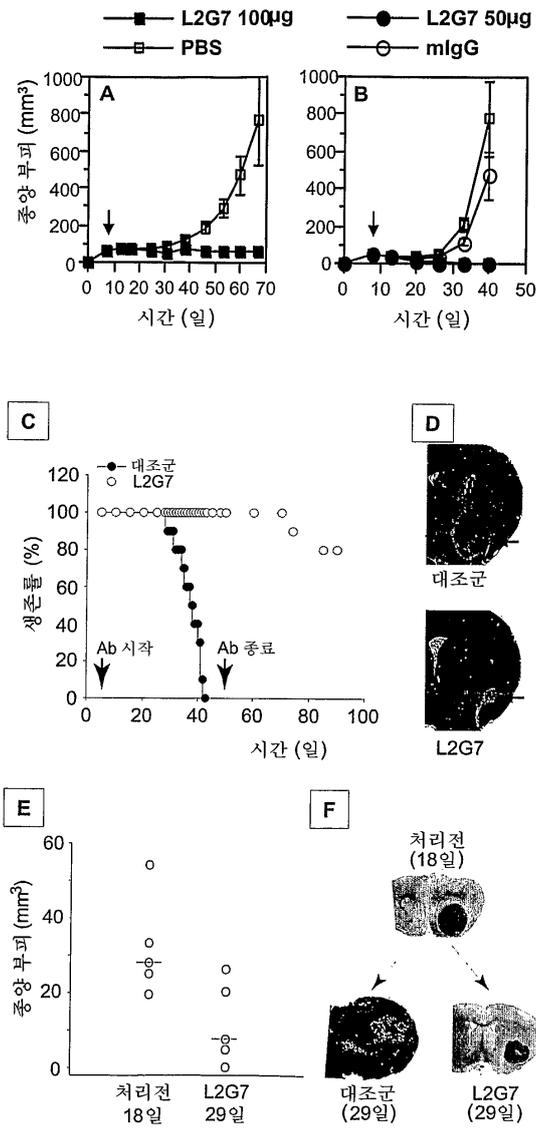
도면1



도면2



도면3



도면4

