



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월07일  
(11) 등록번호 10-1261749  
(24) 등록일자 2013년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-7013529(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2000년08월25일  
심사청구일자 2011년07월13일  
(85) 번역문제출일자 2011년06월13일  
(65) 공개번호 10-2011-0071147  
(43) 공개일자 2011년06월28일  
(62) 원출원 특허 10-2011-7000817  
원출원일자(국제) 2000년08월25일  
심사청구일자 2011년02월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/023391  
(87) 국제공개번호 WO 2001/15730  
국제공개일자 2001년03월08일  
(30) 우선권주장  
60/151,018 1999년08월27일 미국(US)  
60/213,822 2000년06월23일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO1999031140 A1  
전체 청구항 수 : 총 5 항

(73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1  
(72) 발명자  
바우만, 샤론, 앤  
미국 94065 캘리포니아주 레드우드 시티 킬슨 씨  
클 520  
셰크, 스티븐  
미국 94010 캘리포니아주 벌링게임 캠프리지 로드  
1133  
(74) 대리인  
김영, 주성민

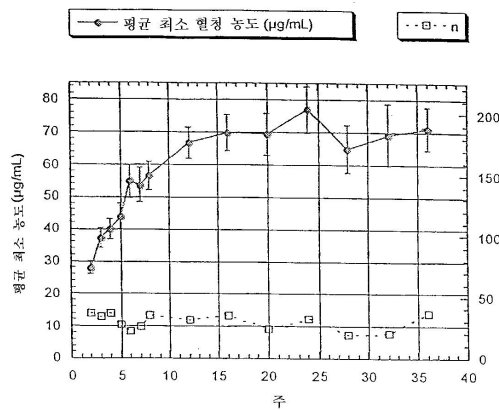
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 항-E r b B2 항체 투여 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 사용하여 ErbB2를 과다발현하는 암에 걸리기 쉽거나 또는 이 암에 걸린 것으로 진단되는 사람 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

(i) 항-ErbB2 항체 huMab4D5-8를 포함하는 약학적 조성물을 포함하는 용기 및  
 (ii) 상기 조성물이 항-ErbB2 항체를 8 mg/kg의 초기 투여량 및 수회의 6 mg/kg의 후속 투여량으로 투여하고, 각 투여를 3주의 시간 간격을 두고 분리하여 투여함으로써 HER2의 과다발현을 특징으로 하는 유방암을 치료하기 위한 것임을 나타내는, 상기 용기에 결합된 포장 삽입물을 포함하는 키트.

**청구항 2**

제1항에 있어서, (iii) 제약학적으로 허용되는 완충제를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함하는 키트.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 제약학적으로 허용되는 완충제가 인산염 완충 생리수, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액인 키트.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 포장 삽입물이 상기 조성물을 안트라사이클린계 화학요법제와 병용하는 것을 금기하는 지침을 포함하는 것인 키트.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 안트라사이클린계 화학요법제가 독소루비신 또는 에피루비신인 키트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 ErbB2의 과다발현을 특징으로 하는 질환 또는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 발현시키는 질환을 나타내는 사람 또는 동물에게 ErbB2에 결합하는 항체를 치료 유효량 투여하는 것을 포함하는, 상기 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 정맥 및(또는) 피하 투여에 의한 치료 동안 프론트 로딩 (front loading)에 의해 투여되는 항-ErbB2 항체를 사용하는, ErbB2를 과다발현하거나 EGFR을 발현시키는 암에 걸리기 쉽거나 또는 이러한 암에 걸린 것으로 진단되는 사람 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 임의로 항-ErbB2 항체와, 탁소이드를 포함하지만 이에 한정되지 않는 화학요법제를 병용하여 사람 환자의 암을 치료하는 것을 포함한다. 탁소이드는 파클리탁셀 또는 도세탁셀일 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 또한 항-ErbB2 항체와, 안트라사이클린 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 화학요법제를 병용하여 사람 환자의 암을 치료하는 것을 포함한다. 임의로, 항-ErbB2와 안트라사이클린 유도체를 병용하는 치료는 유효량의 심장보호제를 사용하는 치료를 포함한다. 본 발명은 또한 항-ErbB2 항체를 간헐적으로 투여하는 것에 관한 것이다.

**배경 기술**

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

[0003] ErbB2 과다발현 종양의 병태 및 임상적 공격성에 있어서의 ErbB2의 직접적인 역할을 뒷받침하는 여러 방면의 증거가 있다. ErbB2를 비-종양성 세포로 도입하면 이들의 악성 형질전환이 유발되는 것으로 나타났다 (Hudziak

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7159-7163 (1987), DiFiore et al., Science 237: 78-182 (1987)). HER2를 발현하는 형질전환 (transgenic) 마우스는 유선 종양을 발병하는 것으로 밝혀졌다 (Guy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10578-10582 (1992)).

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

[0005] 문헌[Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989)]에는 사람 유방암 세포주 SKBR3를 사용하여 특성화한 일군의 항-ErbB2 항체의 생성이 기재되어 있다. 상기 항체에 노출시킨 후 SKBR3 세포의 상대적 세포 증식은 72시간 후에 단일층의 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 측정하였다. 상기 분석을 사용하여 세포 증식을 56% 억제하는 4D5로 불리는 항체를 사용하여 최대 억제율을 얻었다. 7C2 및 7F3를 비롯하여 상기 군의 다른 항체는 상기 분석에서 보다 작은 정도로 세포 증식을 저하시켰다. 상기 문헌에서는 SKBR3 세포가 배지로부터 항체의 제거 후에 거의 정상 속도로 증식을 재개하기 때문에 4D5 항체의 SKBR3 세포에 대한 효과가 세포독성이라기 보다는 세포정지성이라고 결론지었다. 항체 4D5는 또한 p185<sup>erbB2</sup> 과다발현 유방 종양 세포주를 TNF- $\alpha$ 의 세포 독성 효과에 대해 감수성이 있는 것으로 만든다는 것이 밝혀졌다 (1989년 7월 27일 공개된 국제 특허 출원 공개 제W089/06692호 참조). 문헌[Hudziak et al.]에서 논의된 항-ErbB2 항체는 또한 다른 문헌[Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990); Kotts et al., In Vitro 26(3):59A (1990); Sarup et al., Growth Regulation 1:72-82 (1991); Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11(3):117-127 (1991); Kumar et al., Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986 (1991); Lewis et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993); Pietras et al. Oncogene 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al., Cancer Research 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994); Scott et al., Chem. 266:14300-5(1991); 및 D'Souza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206 (1994)]에서 특징이 규명되어 있다.

[0006] 문헌 [Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991)]에는 ErbB2를 과다발현하는 폐 선암종 세포주 (Calu-3)에 대한 반응성을 기준으로 선택된 2개의 항체가 기재되었다. 이 항체들 중 MGR3로 불리는 항체는 ErbB2를 내부화하여 ErbB2의 인산화를 유도하고 시험관내 종양 세포 증식을 억제한다.

[0007] 문헌 [McKenzie et al., Oncogene 4:543-548 (1989)]은 TA1으로 명명된 항체를 포함하여 에피토프 특이성이 상이한 일군의 항-ErbB2 항체를 기재하고 있다. 이 TA1 항체는 ErbB2의 세포내이입의 촉진을 유도하는 것으로 밝혀졌다 (Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369 (1991) 참조). 문헌[Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3:350-362(1990)]은 TA1 항체가 유방암 세포주 AU-565 (*erbB2* 유전자를 과다발현함) 및 MCF-7 (*erbB2* 유전자를 과다발현하지 않음)의 성숙을 유도한다고 보고하였다. 상기 세포에서의 성숙 표현형의 성장 및 수득의 억제는 세포 표면에서의 ErbB2 수용체의 개수 감소 및 세포질에서의 일시적인 개수 증가와 관련되는 것으로 밝혀졌다.

[0008] 문헌 [Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 91991)]은 일군의 항-ErbB2 항체를 생성시켜 누드 마우스에 복강내 주사하고 *erbB2* 유전자의 과다발현에 의해 형질전환된 쥐 섬유아세포의 종양 증식에 대한 상기 항체의 효과를 평가하였다. 4개의 항체에 대해서는 다양한 정도의 종양 억제가 검출되었지만, 항체 중의 하나 (N28)는 일관되게 종양 증식을 자극하였다. 모노클로날 항체 N28은 ErbB2 수용체의 상당한 인산화를 유도하였지만, 다른 4개의 항체는 일반적으로 낮은 인산화 유도 활성을 보이거나 전혀 보이지 않았다. 또한, SKBR3 세

포의 증식에 대한 항-ErbB2 항체의 효과를 분석하였다. 상기 SKBR3 세포 증식 분석에서, 2개의 항체 (N12 및 N29)는 대조구에 비해 세포 증식의 저하를 야기하였다. 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및 항체 매개 세포 의존성 세포독성 (ADCC)을 통한 시험관내 세포 용해를 유도하는 여러 항체의 능력을 평가하고, 상기 문헌의 저자들은 항체의 억제 기능이 CDC 또는 ADCC 때문은 아니라고 결론지었다.

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

[0010] 문헌 [Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408(1993)]은 일군의 항-ErbB2 항체의 에피토프 결합 특이성 뿐만 아니라 SKBR3 세포의 부착 비의존성 및 부착 의존성 증식을 억제하는 능력 (개개의 항체의 능력 및 항체의 조합에 의한 능력), 세포 표면 ErbB2를 조절하는 능력 및 리간드 자극된 부착 비의존성 성장을 억제하는 능력을 평가하였다 (항-ErbB2 항체 조합물에 대해서는 1994년 1월 6일 공개된 국제 특허 출원 공개 제W094/00136호 및 Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776 (1992) 참조). 다른 항-ErbB2 항체는 문헌 [Hancock et al., Cancer Res. 5:4575-4580 (1991); Shawver et al. Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. Cancer Res. 54:3578-3765 (1994) 및 Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992)]에서 논의되었다.

[0011] 재조합 인간화 항-ErbB2 모노클로날 항체 (쥐의 항-ErbB2 항체 4D5의 인간화된 형태는 rhuMab HER2, HERCEPTIN (등록상표) 또는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체로 불림) ErbB2-과다발현 전이성 유방암 환자에게 항암 치료 전에 다량 투여하면, 임상적으로 활성이 있었다 (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN (등록상표)에 대하여 초기 투여량은 90분-주입으로서 4 mg/kg 투여할 것이 추천된다. 초기 투여량이 충분히 허용된다면 추천되는 주 단위의 유지 투여량은 2 mg/kg이며 30분 주입으로 투여될 수 있다.

[0012] ErbB2 과다발현은 특히 액와 림프절에 관련된 원발성 질병 환자에게 있어서 흔히 불량한 예후의 조짐으로서 여겨지며 (Slamon et al., (1987) 및 (1989), 상기 문헌, Ravidin and Chamness, Gene 159:19-27 (1995), Hynes and Stern, Biochem Biophys Acta 1198: 165-184 (1994)), CMF (시클로포스파미드, 메토티렉세이트 및 플루오로우라실) 및 안트라사이클린류를 포함하는 화학요법 및 호르몬요법에 대한 감수성 및(또는) 내성과 연관된 것으로 보고되었다 (Baselga et al., Oncology 11 (3 Suppl 1):43-48 (1997)). 그러나, ErbB2 과다발현과 불량한 예후와의 관련성에도 불구하고, HER2-양성 환자가 탁산 치료에 대해 임상적으로 반응할 가능성은 HER2-음성 환자의 3배 이상이었다 (같은 책). rhuMab HER2는 HER2를 높은 수준으로 발현하는 BT-474 사람 유방 선암종 세포를 주사한 누드 마우스에게서 파클리탁셀 (등록상표명 탁솔 (Taxol)) 및 독소루비신의 유방암 이식편 억제 활성을 향상시키는 것으로 나타났다 (Baselga et al., Breast Cancer, Proceedings of ASCO, Vol. 13, Abstract 53 (1994)).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0013] <발명의 개요>

[0014] 본 발명은 항-ErbB2 항체의 초기 투여 또는 투여들을 제공한 다음, 상기 항체를 동량 또는 그 보다 적게 투여함으로써 (더 큰 프론트 로딩) 효능 목표 최소 혈청 농도를 초기에 달성하는 것이 종래의 치료법보다 더 효과적이라는 발견에 관한 것이다. 효능 목표 최소 혈청 농도는 4주내, 바람직하게는 3주내, 보다 바람직하게는 2주내, 가장 바람직하게는 1주내 (1일내 포함)에 달성된다. 이후에, 나머지 치료 과정 동안 또는 질병 증상이 억제될 때까지 상기 항체를 동량 또는 그 보다 적은 양으로 유지 투여하여 목표 혈청 농도를 유지한다.

[0015] 본 발명은 또한 치료 유효량의 항-ErbB2 항체를 피하 투여하는 것을 포함하는, ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 질환에 걸리기 쉽거나 또는 이러한 질환에 걸린 것으로 진단되는 사람 환자의 치료 방법에 관한 것이

다. 바람직하게는, 초기 투여 (또는 투여들) 및 이후의 유지 투여 또는 투여들은 피하로 투여된다. 임의로, 항-ErbB2 항체에 대한 환자의 내성이 알려지지 않은 경우, 초기 투여는 정맥 주입에 의해 투여한 다음, 항체에 대한 환자의 내성이 허용되는 경우 피하 투여에 의해 유지 투여한다.

[0016] 본 발명에 따라, 치료 방법은 항-ErbB2 항체를 약 4 mg/kg 이상, 바람직하게는 약 5 mg/kg 이상의 초기 투여량으로 투여하는 것을 포함한다. 최대 초기 투여량 또는 이후의 투여량은 50 mg/kg, 바람직하게는 40 mg/kg, 보다 바람직하게는 30 mg/kg을 초과하지 않는다. 투여는 정맥 또는 피하 투여, 바람직하게는 정맥 주입 또는 환제 주사, 보다 바람직하게는 피하 환제 주사이다. 초기 투여는 4주내, 바람직하게는 3주내, 보다 바람직하게는 2주내, 가장 바람직하게는 1주내 (1일내 포함)에 목표 최소 혈청 농도에 도달하기에 충분하도록 1회 이상 약물을 투여하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 따라, 초기 투여 또는 투여들 이후에는 항체의 최소 혈청 농도를 효능 목표 수준 또는 그 이상으로 유지하기에 충분하도록 간격을 두고 초기 투여와 동량 또는 그 보다 적은 양으로 투여된다. 바람직하게는, 초기 투여량 또는 이후의 투여량은 50 mg/kg을 초과하지 않으며, 초기 이후의 각 투여량은 0.01 mg/kg 이상이다. 바람직하게는, 투여되는 약물의 양은 투여 주기 사이의 간격이 1주 이상이도록 목표 최소 혈청 농도를 유지하기에 충분한 양이다. 바람직하게는, 최소 혈청 농도가 2500 µg/ml를 초과하지 않으며, 치료 동안 0.01 µg/ml 미만으로 감소되지 않는다. 본 발명의 프론트 로딩 약물 치료 방법은 치료 초기에 목표 혈청 약물 농도에 도달함으로써 효능이 증가되는 이점을 갖는다. 본 발명에 따른 피하 전달에 의한 유지 투여는 약물 치료 시간을 줄이고 비용을 절감함으로써 환자 및 건강 관리 종사자에게 있어 편리한 이점을 제공한다. 바람직하게는, 초기 투여 (또는 일련의 초기 투여에서 마지막 투여)가 최초 이후의 투여로부터 4주내, 바람직하게는 3주내, 보다 바람직하게는 1주내의 시간 간격을 두고 분리되어 있다.

[0018] 본 발명의 실시양태에서, 항-ErbB2의 초기 투여는 정맥 또는 피하 투여, 예를 들어 정맥 주입 또는 피하 환제 주사에 의해 6 mg/kg, 8 mg/kg 또는 12 mg/kg의 양으로 전달된다. 초기 이후의 유지 투여는 정맥 주입, 정맥 환제 주사, 피하 주입 또는 피하 환제 주사에 의해 1주에 1회 2 mg/kg의 양으로 전달된다. 초기 및 유지 투여를 위한 전달 방법의 선택은 신체에 대한 항체의 도입을 허용하는 동물 또는 사람 환자의 능력에 따라 결정된다. 항체가 충분히 허용되는 경우, 주입 시간이 줄어들 수 있다. 이러한 실시양태에 대하여 개시된 바와 같은 전달 방법의 선택은 본 발명에 따라 고려되는 모든 약물 전달 요법에 적용된다.

[0019] 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 12 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 3주에 1회 6 mg/kg의 양으로 유지 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 8 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 3주에 1회 6 mg/kg의 양으로 유지 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 8 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 주당 1회 8 mg/kg 또는 2주 내지 3주에 1회 8 mg/kg의 양으로 유지 투여하는 것을 포함한다.

[0022] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 1, 2 및 3일째에 각각 1 mg/kg 이상, 바람직하게는 4 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 3주에 1회 6 mg/kg의 양으로 유지 투여하는 것을 포함한다.

[0023] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 4 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 3일 간격으로 나누어 주당 2회 2 mg/kg의 양으로 유지 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 3주 동안 주당 2 내지 3회 항-ErbB2 항체를 전달하는 투여 주기를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 사람 환자에 대한 각 투여량은 약 25 mg/kg 이하, 바람직하게는 약 10 mg/kg 이하이다. 이 3주 주기는 바람직하게는 질병 증상을 억제하는데 필요할 경우에 반복된다.

[0025] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 5일 동안 매일 항-ErbB2 항체를 전달하는 투여 주기를 포함한다. 본 발명에 따라, 이 주기는 바람직하게는 질병 증상을 억제하는데 필요할 경우에 반복된다.

[0026] 이런 질환은 바람직하게는, ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 양성 또는 악성 종양, 예를 들면 유방암, 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간 종양, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 타액선암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 두부 및 경부 암 등의 암이다. 또한, 본 발명의 방법은 안트라사이클린, 예를 들어 독소루비신 또는 에피루비신 이외의 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 화학요법제는 바람직하게는 탁솔 (등록상표) (파클리탁셀) 또는 탁솔 (등록상표) 유도체 등의 탁소이드이다.

- [0027] 바람직한 항-ErbB2 항체는 ErbB2 수용체의 세포의 도메인, 바람직하게는 ErbB2 세포의 도메인 서열내의 에피토프 4D5 또는 3H4에 결합한다. 보다 바람직하게는, 항체는 항체 4D5, 가장 바람직하게는 인간화 형태의 항체이다. 다른 바람직한 ErbB2-결합 항체로는 바람직하게는 인간화 형태의 항체 7C2, 7F3 및 2C4가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 방법은 ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 유방암 또는 난소암의 치료에 특히 적합하다.
- [0029] 본 발명은 또한 항-ErbB2 항체를 간헐적으로 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 암 (예를 들어, ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 암)에 걸린 사람 환자에게 항-ErbB2 항체를 최초 투여하고 이후에 이 항체를 1회 이상 투여하는 것을 포함하며, 여기서 최초 투여와 이후의 투여가 약 2주 이상 (예를 들어, 약 2주 내지 약 2개월), 임의로 약 3주 이상 (예를 들어, 약 3주 내지 약 6주)의 시간 간격을 두고 서로 분리되어 있는, 상기 암의 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 항체는 약 3주 마다 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 투여될 수 있다. 최초 투여 및 이후의 투여는 각각 약 2 mg/kg 내지 약 16 mg/kg; 예를 들어, 약 4 mg/kg 내지 약 12 mg/kg; 임의로 약 6 mg/kg 내지 약 12 mg/kg일 수 있다. 일반적으로는, 최초 이후에 2회 이상 (예를 들어, 최초 이후에 약 2 내지 약 10회 투여) 항체를 환자에게 투여하며, 최초 이후의 투여는 바람직하게는 약 2주 이상 (예를 들어, 약 2주 내지 약 2개월), 임의로 약 3주 이상 (예를 들어, 약 3주 내지 약 6주) 시간 간격을 두고 서로 분리되어 있다. 최초 이후의 투여 중 2회 이상은 각각 약 2 mg/kg 내지 약 16 mg/kg; 약 4 mg/kg 내지 약 12 mg/kg; 또는 약 6 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 양으로 투여될 수 있다. 본 발명은 또한 용기, 용기내의 항-ErbB2 항체 함유 조성물, 및 상기 방법에 따른 항체 투여 지침을 포함하는 포장 삽입물을 포함하는 제품을 제공한다.
- [0030] 본원에 기재된 투여 프로토콜은 항-표피 성장인자 수용체 (EGFR), 항-ErbB3 및 항-ErbB4 항체와 같은 다른 항-ErbB 항체에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 암에 걸린 사람 환자에게 항-ErbB 항체를 약 5 mg/kg 이상의 초기 투여량으로 투여하는 단계, 및 그 후, 상기 환자에게 상기 항체를 초기 투여량과 대략 동일하거나 그 보다 적은 양으로 다수회 투여하는 단계로 이루어지는, 상기 사람 환자에게 유효량의 항-ErbB 항체를 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다. 별법으로 또는 추가적으로, 본 발명은 항-ErbB 항체를 사람 환자에게 최초 투여하고 이후에 이 항체를 1회 이상 더 투여하며, 최초 투여와 이후의 투여가 약 2주 이상의 시간 간격을 두고 서로 분리되어 있는 것인, 사람 환자의 암 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 용기, 용기내의 항-ErbB 항체 함유 조성물, 및 상기 방법에 따른 항체 투여 지침을 포함하는 포장 삽입물을 포함하는 제품을 제공한다.
- [0031] 또다른 측면으로, 본 발명은 용기; 용기내의 항-ErbB2 항체 함유 조성물; 임의로, 상기 조성물이 ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 증상의 치료에 사용될 수 있음을 나타내는 용기상에 있거나 그와 결합되는 표지; 및 상기 조성물을 안트라사이클린계 화학요법제와 병용하는 것을 금지하는 지침을 포함하는 포장 삽입물을 포함하는 제품에 관한 것이다. 본 발명에 따라, 포장 삽입물에는 항-ErbB2 항체를 5 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고, 이후에 이 항체를 초기 투여량과 동일하거나 그 보다 적은 양으로 투여할 것을 지시하는 지침이 포함되어 있다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 포장 삽입물은 1회 이상의 투여, 바람직하게는 초기 이후의 모든 투여, 가장 바람직하게는 모든 투여에서 항-ErbB2 항체를 피하로 투여할 것을 지시하는 지침을 추가로 포함한다.
- [0032] 다른 측면으로, 본 발명은 ErbB2를 발현시키는 암에 걸린 사람 환자에게 유효량의 항-ErbB2 항체 및 화학요법제를 투여하는 것을 포함하는, 상기 암에 걸린 환자의 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 화학요법제는 과클리탁셀 및 도세탁셀을 포함하지만 이에 한정되지 않는 탁소이드이다. 또다른 실시양태에서, 화학요법제는 독소루비신 또는 에피루비신을 포함하지만 이에 한정되지 않는 안트라사이클린 유도체이다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체 및 안트라사이클린 유도체를 사용한 치료는 또한 환자에게 심장보호제를 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 안트라사이클린 유도체는 항-ErbB2 항체와 함께 환자에게 투여되지 않는다. 1종 이상의 다른 화학요법제가 환자에게 투여될 수도 있다. 암은 바람직하게는 ErbB2의 과다발현을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명은 또한 용기; 용기내의 항-ErbB2 항체 함유 조성물; 및 상기 조성물의 사용자가 환자에게 항-ErbB2 항체 조성물 및 화학요법제를 투여할 것을 지시하는 포장 삽입물을 포함하는 제품을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 화학요법제는 안트라사이클린 이외의 것이며, 바람직하게는 탁소이드, 예를 들어 TAXOL (등록상표)이다. 또다른 실시양태에서, 화학요법제는 독소루비신 또는 에피루비신을 포함하지만 이에 한정되지 않는 안트라사이클린이다. 또다른 실시양태에서, 화학요법제는 안트라사이클린이며, 포장 삽입물은 또한 사용자가 심장보호제를 투여할 것을 지시한다.
- [0034] 본 발명의 방법 및 조성물은 항-ErbB2 항체 및 인간화 항-ErbB2 항체를 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한

ErbB2에 결합하는 항체 함유 조성물, 및 사람의 ErbB2 발현 암, 예를 들어 ErbB2 과다발현 암을 치료하는데 있어서 상기 항체의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 EGFR을 발현하는 암의 치료를 위한 상기 항체의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체는 모노클로날 항체 4D5, 예를 들어 인간화 4D5 (및 바람직하게는 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체), 또는 모노클로날 항체 2C4, 예를 들어 인간화 2C4이다. 항체는 원형 항체 (예를 들어, 원형 IgG<sub>1</sub> 항체) 또는 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab)<sub>2</sub> 및 디아바디 등)일 수 있다. 인간화 항-ErbB2 항체 2C4의 가변 경쇄 영역 및 가변 중쇄 영역은 도 5a 및 5b에 나타나 있다.

**과제의 해결 수단**

[0035] **<바람직한 실시양태의 상세한 설명>**

[0036] **I. 정의**

[0037] "ErbB 수용체"는 EGFR, HER2, ErbB3 및 ErbB4 수용체뿐만 아니라 TEGFR (미국 특허 제5,708,156호) 및 향후 확 인될 이 족의 다른 구성원들을 포함하는, ErbB 수용체 족에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이다. ErbB 수 용체는 일반적으로 ErbB 리간드에 결합할 수 있는 세포외 도메인; 지질친화성 막횡단 도메인; 보존된 세포내 티 로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 여러 티로신 잔기를 보유하는 카르복시-말단 신호 도메인을 포함한다. ErbB 수용체는 천연 서열 ErbB 수용체이거나 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는 ErbB 수용체는 천연 서열 인간 ErbB 수용체이다.

[0038] "ErbB1", "표피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"이라는 용어는 본원에서 서로 바꾸어 쓸 수 있으며, 예를 들어 문 헌 [Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987)]에 개시된 바와 같은 천연 서열 EGFR 및 그의 변 이체 [예를 들어, 문헌 (Humphrey et al. PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1990))에 개시된 바와 같은 결실 변이체 EGFR]를 의미한다. *erbB1*은 EGFR 단백질 산물을 코딩하는 유전자를 의미한다. EGFR에 결합하는 항체의 예로는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) [문헌 [미국 특허 제4,943,533호, Mendelsohn 등] 참조], 및 이들의 변이체, 예를 들어 키메라 225 (C225) 및 재형된 인간 225 (H225) [문헌 [WO 96/40210, Imclone Systems Inc.] 참조]가 포함된다.

[0039] "ErbB3" 및 "HER3"는 예를 들어 미국 특허 제5,183,884호, 동 제5,480,968호 및 문헌 [Kraus et al. PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드 및 그의 변이체를 의미한다. HER3에 결합 하는 항체의 예로는 미국 특허 제5,968,511호 (Akita 및 Sliwkowski)에 기재된 바와 같이 예를 들어 8B8 항체 (ATCC HB 12070) 또는 그의 인간화 변이체가 있다.

[0040] "ErbB4" 및 "HER4"라는 용어는 본원에서 예를 들어 문헌 [유럽 특허 제599,274호; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); and Plowman et al., Nature, 366: 473-475 (1993)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드 및 그의 변이체, 예를 들어 WO99/19488에 개시된 HER4 이소폼을 의미한다.

[0041] 용어 "HER2", "ErbB2", "c-Erb-B2"는 서로 바꿔 사용할 수 있다. 다른 언급이 없는 한, 용어 "ErbB2", "c- Erb-B2" 및 "HER2"는 ErbB2 단백질을 의미하고, "*erbB2*", "*c-erb-B2*" 및 "*her2*"는 사람 유전자를 의미한다. 사람 *erbB2* 유전자 및 ErbB2 단백질은 문헌 [예를 들어 Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501] 및 Yamamoto et al., Nature 319:230-234(1986)]에 기재되어 있다 (Genebank 기탁 번호 X03363). ErbB2는 4개의 도메인 (도메인 1-4)으로 이루어진다.

[0042] "에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프 는 ErbB2의 막횡단 영역에 가깝다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해서, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차 차단 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 맵핑을 수행하여 (도 1 참조) 항체가 ErbB2 상 의 4D5 에피토프(즉, ErbB2의 대략 잔기 529, 예를 들어 대략 잔기 561 내지 대략 잔기 625을 포함하는 영역 내 의 하나 이상의 잔기)에 결합하는지를 평가할 수 있다.

[0043] "에피토프 3H4"는 ErbB2의 세포외 도메인에서 항체 3H4가 결합하는 영역이다. 이 에피토프를 도 1에 나타냈다. 이 에피토프는 ErbB2 세포외 도메인의 아미노산 서열에서 약 541 내지 약 599까지의 잔기를 포함한다.

[0044] "에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및(또는) 7F3 항체(ATCC에 기탁됨, 하기 참조)가 결합하는 ErbB2의 세포외 도메인의 N 말단에 위치한 영역이다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해서, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차 차단(cross-blocking) 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 맵핑을 수행하여 항체가 ErbB2

상의 7C2/7F3 에피토프(즉, ErbB2의 대략 잔기 22 내지 대략 잔기 53의 영역(서열 2)) 내의 하나 이상의 잔기에 결합하는지를 조사할 수 있다.

- [0045] 용어 "세포 사멸의 유도" 또는 "세포 사멸을 유도할 수 있는"이란 생존가능 세포를 비생존성으로 만드는 항체의 능력을 의미한다. 여기서 "세포"는 ErbB2 수용체를 발현하는 세포, 특히 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포이다. ErbB2를 "과다발현"하는 세포는 동일한 조직형의 비암세포에 비해 정상 수준보다 상당히 많은 양의 ErbB2를 갖는다. 바람직하게는, 세포는 암세포, 예를 들어 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광 세포이다. 시험관 내에서, 이 세포는 SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 시험관내 세포 사멸은 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)에 의해 유도되는 세포 사멸과 구별하기 위해 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 측정할 수 있다. 따라서, 세포 사멸 분석은 열 불활성화 혈청을 사용하여(즉, 보체의 부재 하에) 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 수행될 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해서, 요오드화프로피듐(PI), 트리판 블루 (Moore et al., Cytotechnology 17:1-11 (1995) 참조) 또는 7AAD (실시예 1 참조)의 흡수에 의해 평가되는 막 온전성의 상실을 비처리 세포에 비교하여 평가할 수 있다. 바람직한 세포 사멸 유도 항체는 "BT474 세포에서 PI 흡수 분석"에서 PI 흡수를 유도하는 항체이다.
- [0046] 문구 "세포사멸의 유도" 또는 "세포사멸을 유도할 수 있는"이란 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 세포체의 팽창, 세포 과편화 및(또는) 막 비지클(세포사멸체로 칭함)의 형성에 의해 측정되는 계획된 세포 사멸 (programmed cell death)을 유도하는 항체의 능력을 의미한다. 여기서 세포는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포이다. 바람직하게는, "세포"는 종양 세포, 예컨대, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관 내에서는 상기 세포가 SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 세포사멸에 관련된 세포 반응을 평가하기 위해 다양한 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 포스포티딜 세린(PS) 위치전이는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고, DNA 단편화는 본원 실시예에 기재된 바와 같이 DNA 래더링(laddering)을 통하여 평가할 수 있고, DNA 단편화와 함께 핵/크로마틴 농축은 저2배체(hypodiploid) 세포의 증가에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포사멸을 유도하는 항체는 "BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석" (하기 참조)에서 미처리 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 더 잘 유도하는 항체이다.
- [0047] 때때로, 세포사멸 유도 항체는 ErbB2/ErbB3 결합체 (예를 들어 7F3 항체)의 HRG 결합/활성화를 차단하는 것이다. 다른 환경에서, 항체는 HRG에 의한 ErbB2/ErbB3 수용체 결합체의 활성화를 그다지 차단하지 않는 항체 (예를 들어 7C2)이다. 또한, 항체는 세포사멸을 유도하지만 S기 세포의 비율을 크게 저하시키지 않는 7C2와 같은 항체(예를 들어 대조구에 비해 상기 세포의 비율을 단지 약 0 내지 10% 감소시키는 항체)일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 항체는 사람 ErbB2에 특이적으로 결합하고, erbB1, erbB3 및(또는) erbB4 유전자에 의해 코딩되는 단백질과 같은 다른 단백질과 그다지 잘 교차반응하지 않는 7C2와 같은 항체이다. 때때로, 항체는 문헌 [Schechter et al., Nature 312:513(1984) 및 Drebin et al., Nature 312:545-548(1984)]에 기재된 바와 같이 쥐 neu 단백질과 그다지 교차반응하지 않을 수 있다. 이러한 실시양태에서, 항체와 상기 단백질과의 결합 (예를 들어 내인성 수용체에 대한 세포 표면 결합)의 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성 면역 침전법 (RIA)에 의해 측정시에 약 10% 미만일 것이다.
- [0049] "헤레글린 (HRG)"은 ErbB2-ErbB3 및 ErbB2-ErbB4 단백질 결합체를 활성화시키는(즉, 결합체에 부착하면 결합체 내의 티로신 잔기의 인산화를 유도하는) 폴리펩티드를 의미한다. 상기 용어에 포함되는 다양한 헤레글린 폴리펩티드는 문헌[Holmes et al., Science, 256:1205-1210(1992); WO92/20798; Wen et al., Mol. Cell. Biol., 14(3):1909-1919; 및 Marchionni et al., Nature, 362:312-318(1993)]에 기재되어 있다. 상기 용어는 천연 HRG 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편 및(또는) 변이체, 예를 들어 그의 EGF 유사 도메인 단편 (예를 들어 HRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub>)를 포함한다.
- [0050] "ErbB2-ErbB3 단백질 결합체" 및 "ErbB2-ErbB4 단백질 결합체"는 각각 ErbB2 수용체 및 ErbB3 수용체 또는 ErbB4 수용체의 올리고머에 비공유적으로 결합된다. 결합체는 이들 수용체 둘 다를 발현하는 세포가 HRG에 노출될 때 결합체가 형성되고 문헌[Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994)]에 기재된 바와 같이 면역침전에 의해 단리되고 SDS-PAGE에 의해 분석될 수 있다.
- [0051] "항체"(Ab) 및 "면역글로불린"(Ig)은 동일한 구조적 특성을 갖는 당단백질이다. 항체는 특이적인 항원에 결합 특이성을 보이지만, 면역글로불린은 항체 및 항원 특이성이 결여된 다른 항체 유사 분자를 모두 포함한다. 항체 유사 분자 종류의 폴리펩티드는 예를 들어 림프계에 의해 낮은 수준으로, 골수종 세포에 의해 증가된 수준으로



로 생성된다.

- [0052] "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 일반적으로 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성되는 약 150,000 달톤의 헤테로테트라머의 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 디설피드 공유결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설피드 결합의 개수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 변한다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적 간격으로 사슬 내부의 디설피드 결합을 갖는다. 각각의 중쇄는 한 말단에 가변 도메인( $V_H$ ) 및 이 도메인에 후속하는 많은 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한 말단에 가변 도메인( $V_L$ ) 및 다른 말단에 불변 도메인을 갖고, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 한줄로 위치하고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 한줄로 위치한다. 특정 아미노산 잔기들이 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 생각된다.
- [0053] 용어 "가변"은 항체들 간에 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 크게 상이하고 그 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인에서 보존도가 보다 높은 부분은 프레임워크 영역(FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결을 형성하며 어떤 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 이루는 3개의 CDR에 의해, 주로  $\beta$ -시트의 입체형태인 프레임워크 영역 4개가 연결되어 이루어진다. 각 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 서로 매우 근접하게 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669 (1991) 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합시에 직접 관여하지 않지만, 항체 의존적 세포의 세포독성에서 항체의 관여와 같은 다양한 이펙터 기능을 보인다.
- [0054] 항체를 파파인 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 항원 결합 부위를 하나씩 갖는 "Fab" 단편, 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하여 이름 붙여진 나머지 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신을 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 가지며 여전히 항원에 교차결합할 수 있는  $F(ab')_2$  단편이 생성된다.
- [0055] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하게 비공유결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이것은 각 가변 도메인의 CDR 3개가 상호작용하여  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 한정하는 배열로 존재한다. 결론적으로 보면, 6개의 CDR이 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 하나의 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)의 경우에도 전체 결합 부위보다 친화성은 낮지만 항원을 인식하여 항원에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0056] 또한, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체의 힌지 영역에서 유래한 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기가 첨가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 의미한다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 몇쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되었다.
- [0057] 임의의 척추동물종으로부터 유래한 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로 불리는 2개의 명백하게 상이한 종류 중의 하나로 분류될 수 있다.
- [0058] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 여러 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 주요 클래스가 존재하고, 이들 중 몇 개는 서브클래스(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 지칭된다. 면역글로불린의 여러 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 잘 알려져 있다.
- [0059] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 완전한 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 완전한 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한 항체 단편도 포함한다.
- [0060] "항체 단편"은 완전한 항체의 일부, 바람직하게는 완전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab,  $F(ab')$ ,  $F(ab')_2$ , 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체 (Zapata et al., Protein Eng.

8(10):1057-1062 (1995)), 단일쇄 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 등이 있다.

[0061] 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균일한 항체의 군집으로부터 수득된 항체를 말한다. 즉, 군집을 구성하는 개개의 항체는 미량 존재할 지 모르는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되는 것으로, 높은 특이성을 갖는다. 또한, 일반적으로 여러 항원 결정자(에피토프)에 대해 작용하는 여러 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 항원 결정자에 대해서만 지시된다. 특이성 외에, 모노클로날 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 유리하다. "모노클로날"이란 수식어는 실질적으로 균일한 항체 군집으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내고, 어떤 특정 방법에 의해 항체 생성을 요구하는 것으로서 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 문헌 [예를 들어 Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0062] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 대응 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라(chimera)" 항체(면역글로불린), 및 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한 이 항체의 단편도 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0063] 비인간(예를 들어 쥐과) 항체의 "인간화" 형태는 키메라 면역글로불린, 즉, 비사람 면역글로불린으로부터 유래한 최소한의 서열을 포함하는 면역글로불린 사슬 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원 결합 서열)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 사람 면역글로불린 (수용 항체)의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기가, 필요한 특이성, 친화도 및 능력을 갖는, 마우스, 쥐 또는 토끼와 같은 비인간종(공여 항체)의 CDR의 잔기로 대체된 사람 면역글로불린이다. 어떤 경우에는 사람 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR)이 대응하는 비사람 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열 중 어디에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이런 변형은 항체 성능을 더욱 증가시키고 극대화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비사람 면역글로불린의 CDR 영역에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역이 사람 면역글로불린 서열의 FR 영역인 하나 이상, 일반적으로 2개의 가변 도메인 모두를 실질적으로 포함할 것이다. 또한, 인간화 항체는 적어도 면역글로불린 불변 영역(Fc), 일반적으로 사람 면역글로불린의 불변 영역의 일부를 포함할 것이다 (세부 사항에 대하여는, 문헌 (Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) 참조). 인간화 항체는 항체의 항원 결합 영역이 목적 항원으로 짧은꼬리원숭이를 면역시켜 생성된 항체로부터 유래된 PRIMATIZED(상표) 항체가 있다.

[0064] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 중에 존재하는 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 필요한 구조를 형성하도록 하는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다(sFv에 관해서는 문헌 (Pluecktham in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 및 Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)) 참조).

[0065] 용어 "디아바디(diabody)"는 동일한 폴리펩티드 사슬 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) 내의 경쇄 가변 도메인(V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 도메인을 다른 사슬의 상보성 도메인과 강제로 페어링시켜 2개의 항원 결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097, W093/11611 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0066] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및(또는) 회수된 항체이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정시 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과, 또는 (2) 스피닝 컵(spining cup) 서열분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산의 잔기 15개 이상을 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제될 것이다. 단리된 항체

는 그 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 원위치에서의 항체이다. 그러나, 단리된 항체는 일반적으로 하나 이상의 정제 단계에 의해 정제될 것이다.

- [0067] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "샬비지(salvage) 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 기능을 수행하는 IgG 분자 (예를 들어 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>)의 Fc 영역의 에피토프를 의미한다.
- [0068] "치료"는 치료적 처리 및 예방적 또는 억제적 조치를 모두 의미한다. 치료를 필요로 하는 대상은 질환이 억제되어야 하는 대상 뿐만 아니라 이미 질환을 앓고 있는 대상을 포함한다.
- [0069] 치료를 위한 "포유동물"은 인간, 가축, 및 동물원, 경기용 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0070] "질환"은 항-ErbB2 항체를 사용한 치료에 의해 호전되는 모든 상태이다. 이것은 포유동물이 문제의 질환에 걸리게 하는 병태를 포함하여 만성 및 급성 질환 또는 질병을 포함한다. 본원에서 치료되는 질환의 예로는 양성 및 악성 종양, 백혈병 및 임파선 악성 질환, 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선, 마크로파지, 상피, 기질 및 포배강 질환, 및 염증성, 혈관형성 및 면역 질환이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] "치료적 유효량"이란 용어는 항증식 효과를 갖는 양을 지칭하는 데 사용된다. 바람직하게는 치료적 유효량이 세포자멸 활성을 갖거나 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 바람직하게는 양성 또는 악성 종양 세포, 특히 암 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 효능은 치료되는 상태에 따라 통상적인 방식으로 측정할 수 있다. 암 치료의 경우 효능 측정은 예를 들면 질병 진행 시간 (TTP) 평가 또는 반응률 (RR) 결정을 통해 이루어질 수 있다 (하기 실시예 1의 설명 참조). 치료 유효량은 또한 일정 기간 동안 유지되는 경우 질병 증상을 억제하는데 효과적인 것으로 나타난 최소 혈청 농도와 같은 목표 혈청 농도를 의미한다.
- [0072] 용어 "암" 및 "암성"은 미조절된 세포 증식이라는 전형적 특징을 갖는 포유동물의 생리 상태를 의미하거나 규정한다. 암의 예로는 암종, 임파종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 구체적인 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 타액선암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종 및 여러 종류의 두부 및 경부 암을 포함한다.
- [0073] 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 저해하거나 억제하고(하거나) 세포를 파괴시키는 물질을 의미한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup> 및 Re<sup>186</sup>), 화학요법제 및 독소, 예를 들면 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성을 갖는 독소 또는 그의 단편을 포함하는 것을 의미한다.
- [0074] "화학요법제"란 암의 치료에 유용한 화학 화합물을 의미한다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시클로포스파미드 (CYTOXAN (등록상표)); 알킬 술포네이트, 예를 들어 부솔판, 임프로솔판 및 피포솔판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스파오라미드 및 트리메틸롤멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노베티신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조토신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예를 들어 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 테노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미퓨린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시타빈, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 공급원, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히도록시우

레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토코산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK (등록상표); 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁산, 예를 들어 파클리탁셀 (TAXOL (등록상표), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 및 도세탁셀 (TAXOTERE (등록상표), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토티렉세이트; 플라티늄 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 플라티늄; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토코산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포아이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레틴산; 에스페라마이신; 카페시타빈; 및 상기 언급된 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다. 또한 상기 정의에는, 예를 들어 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 저해제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (Fareston)을 포함하는 항-에스트로겐제; 및 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 루프롤리드 및 고세렐린과 같은 항-안드로겐제; 및 상기 언급된 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체와 같이 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제가 포함된다.

[0075] "증식 억제제"는 세포, 특히 ErbB2 과다발현 암세포의 시험관 내 또는 체내 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 ErbB2 과다발현 세포의 S기 비율을 크게 감소시키는 물질이다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 시기에서) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제로는 빈카스 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔, 및 토포 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신 등이 있다. 또한, G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지에도 작용한다. 추가 정보는 문헌 [Murakami et al., *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" (WB Saunders: Philadelphia, 1995), Chapter 1, 특히 13면]에 기재되어 있다. 4D5 항체 (및 그의 기능적 등가물)도 상기 목적을 위해 사용할 수 있다.

[0076] "독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 완전한 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리테옥사- $\alpha$ -L-리소-헥소피라노실)옥소]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0077] "사이토카인"은 하나의 세포 군집에 의해 방출되는, 세포간 매개체로서 다른 세포에 대해 작용하는 단백질의 일반 명칭이다. 이러한 사이토카인의 예는 임포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토카인에는 성장 호르몬, 예를 들어 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- $\alpha$  및 - $\beta$ ; 물레리안 억제 물질; 마우스 고나도트로핀 연합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- $\beta$ ; 혈소판 형성 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ ; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$  및 - $\gamma$ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 마크로파지-CSF (M-CSF); 과립구-마크로파지-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- $\alpha$  및 TNF- $\beta$ ; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)를 비롯한 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 사이토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0078] 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 대한 세포독성이 작고 효소에 의해 활성화되거나 보다 활성인 모 형태로 전환될 수 있는 제약상 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 의미한다 (예를 들어 Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borhardt et al., (ed.), pp.247-267, Humana Press (1985) 참조). 본 발명의 전구약물은 인산염 함유 전구약물, 티오포스페이트 함유 전구약물, 황산염 함유 전구약물, 펩티드 함유 전구약물, D-아미노산 변형 전구약물, 글리코실화 전구약물,  $\beta$ -락탐 함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드 함유 전구약

물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드 함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 바와 같은 화학요법제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0079] "고상 (solid phase)"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비수성 매트릭스를 의미한다. 고상의 예는 부분적으로 또는 완전하게 유리 (예를 들어 세공 조절된 유리), 폴리스카리이드 (예를 들어 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘을 포함한다. 특정 실시양태에서, 내용에 따라 고상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있다. 즉, 고상은 정제 컬럼 (예를 들어 친화도 크로마토그래피 컬럼)이다. 이 용어는 또한 미국 특허 제4,275,149호에 기재된 것과 같은 별개 입자의 비연속적 고상을 포함한다.
- [0080] "리포솜"은 약물 (예를 들어 항-ErbB2 항체, 및 임의로 화학요법제)의 포유동물로의 전달에 유용한 다양한 형태의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 구성되는 작은 비지름이다. 리포솜의 성분은 통상 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 2층 형성으로 배열된다.
- [0081] "포장 삽입물"이란, 치료용 제품의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 지시사항으로서, 이러한 치료용 제품의 사용과 관련한 징후, 사용법, 투여량, 투여방법, 금기 및(또는) 경고에 관한 정보를 담고 있다.
- [0082] "혈청 농도", "혈청 약물 농도" 또는 "혈청 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 농도"라는 용어는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체와 같은 약물로 치료받은 동물 또는 사람 환자의 혈청에서 상기 약물의 농도를 의미한다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 혈청 농도는 예를 들어 면역분석에 의해 결정되는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 면역분석은 본원에 개시된 방법에 따른 ELISA이다.
- [0083] "피크 혈청 농도"라는 용어는 약물이 동물 또는 사람 환자에게 전달된 직후, 약물이 혈류계를 통해 분포된 후이 되, 신체에 의한 약물 조직내 현저한 분포, 대사 또는 분비가 일어나기 이전의 약물의 혈청내 최대 농도를 의미한다.
- [0084] "최소 혈청 농도"란 용어는 앞선 약물 투여 전달 후 및 이후에 일련의 투여로 약물을 전달하기 직전의 시간에서 혈청내 약물 농도를 의미한다. 일반적으로, 최소 혈청 농도는 일련의 약물 투여에서 최소로 유지되는 효능 약물의 농도이다. 또한, 최소 혈청 농도는 그가 치료 요법의 일부로서 투여되는 다른 약물의 혈청 농도를 나타내기 때문에 흔히 효능을 위한 최소 혈청 농도로서 목표가 된다. 약물이 정맥 투여에 의해 전달되는 경우, 최소 혈청 농도는 프론트 로딩 초기 약물 전달 1일내에 달성되는 것이 가장 바람직하다. 약물이 피하 투여에 의해 전달되는 경우, 피크 혈청 농도는 바람직하게는 3일 이내에 달성된다. 본 발명에 따라, 최소 혈청 농도는 본원에 개시된 임의 약물 전달 방법을 이용하여 바람직하게는 4주내, 보다 바람직하게는 3주내, 보다 더 바람직하게는 2주내, 가장 바람직하게는 1주내 (1일 포함)에 달성된다.
- [0085] "정맥 주입"이라는 용어는 약 5분 초과, 바람직하게는 약 30 내지 90분의 시간 동안 동물 또는 사람 환자의 정맥내에 약물을 도입하는 것을 의미하지만, 본 발명에 따라, 정맥 주입은 10시간 이하 동안 투여되는 것을 의미하기도 한다.
- [0086] "정맥내 환제" 또는 "정맥내 푸싱"이라는 용어는 신체가 약 15분내, 바람직하게는 5분내에 약물을 수용하도록 동물 또는 사람의 정맥에 약물을 투여하는 것을 의미한다.
- [0087] "피하 투여"라는 용어는 약물 용기로부터 비교적 느리고 지속적인 전달에 의해 동물 또는 사람 환자의 피부 아래쪽, 바람직하게는 피부와 피하 조직 사이의 공간내에 약물을 도입하는 것을 의미한다. 상기 공간은 피부를 피하 조직으로부터 들어올리거나 끌어당겨서 형성시킬 수 있다.
- [0088] "피하 주입"이라는 용어는 30분내 또는 90분내를 포함하지만 이에 한정되지 않는 소정의 기간 동안 약물 용기로부터 비교적 느리고 지속적인 전달에 의해 동물 또는 사람 환자의 피부 아래쪽, 바람직하게는 피부와 피하 조직 사이의 공간내에 약물을 도입하는 것을 의미한다. 임의로, 주입은 미리 정해진 시간, 예를 들어 30분, 90분 또는 치료 요법의 전기간에 걸친 시간 동안 미리 정해진 양의 약물을 전달하는 펌프를 동물 또는 사람 환자의 피부 아래쪽에 피하 이식하여 수행할 수 있다.
- [0089] "피하 환제"라는 용어는 동물 또는 사람 환자의 피부 아래에 약물을 투여하는 것을 의미하는데, 여기서 환제 약물은 바람직하게는 약 15분내, 보다 바람직하게는 5분내, 가장 바람직하게는 60초내에 전달된다. 투여는 바람직하게는 피부와 피하 조직 사이의 공간에 투여되며, 여기서 상기 공간은 예를 들어 피부를 피하 조직으로부터 들어올리거나 끌어당겨서 형성시킬 수 있다.

- [0090] "프론트 로딩"이라는 용어는, 약물 투여를 의미하는 경우, 초기에 높은 양을 투여한 다음, 일정 시간 간격을 두고 이후의 투여에서 그와 동일하거나 그 보다 적은 양으로 투여하는 것을 의미한다. 초기 투여 또는 투여들의 양이 많은 것은 동물 또는 사람 환자의 혈청 약물 농도가 효능 목표 혈청 농도로 보다 빠르게 증가하는 것을 의미한다. 본 발명에 따라, 프론트 로딩은 3주내에 동물 또는 환자의 혈청 농도를 목표 혈청 최소 농도에 도달시키는, 전달되는 초기 투여 또는 투여들에 의해 달성된다. 바람직하게는, 초기 프론팅 로딩 투여 또는 일련의 투여들은 2주내, 보다 바람직하게는 1주내 (1일 포함)에 투여된다. 가장 바람직하게는, 초기 투여가 단일 투여이고 이후에 1주 이상 동안 유지 투여하지 않는 경우, 초기 투여는 1일내에 투여된다. 초기 투여가 일련의 투여들인 경우, 각 투여는 3시간 이상이되 3주내, 바람직하게는 2주내, 보다 바람직하게는 1주내, 가장 바람직하게는 1일내의 시간 간격을 두고 분리되어 있다. 이전에 항-ErbB2 항체 (예를 들어, HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체)로 치료받은 적이 없는 동물 또는 환자에서 상기 항체와 같은 항체 약물에 대한 반대의 면역 반응을 피하기 위해, 정맥 주입에 의해 상기 항체의 초기 투여를 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명은 정맥내 또는 피하로의 주입 또는 환제 투여에 의해 초기 및 유지 투여를 프론트 로딩 약물 전달하는 것을 포함한다.
- [0091] 항-ErbB2 항체에 관련된 간행물 정보로는 1989년 1월 5일 공개된 PCT/US89/00051; 1990년 5월 18일 공개된 PCT/US90/02697; 1997년 7월 23일 허여된 EU0474727; 1997년 7월 23일 허여된 DE69031120.6; 1997년 10월 9일 공개된 PCT/US97/18385; 1997년 10월 14일 허여된 SA97/9185; 1997년 10월 14일 허여된 US5677171; 1998년 2월 24일 허여된 US5720937; 1998년 2월 24일 허여된 US5720954; 1998년 3월 10일 허여된 US5725856; 1998년 6월 23일 허여된 US5770195; 1998년 6월 30일 허여된 US5772997; 1998년 12월 10일 공개된 PCT/US98/2626; 및 1999년 3월 26일 공개된 PCT/US99/06673과 같은 허여된 특허 및 간행물이 포함되며, 이들 특허문헌 및 간행물 각각은 본원에 그의 전체가 참고로 포함된다.
- [0092] II. 항-ErbB2 항체의 제조
- [0093] 아래에는 본 발명에 따라 사용되는 항체의 생산을 위한 예시적인 기술에 관하여 설명한다. 항체 생산에 사용되는 ErbB2 항원은 예를 들면, 원하는 에피토프를 포함하는 ErbB2 세포외 도메인의 가용성 형태 또는 그의 일부일 수 있다. 별법으로, 세포 표면에 ErbB2를 발현하는 세포 (예를 들면, ErbB2를 과다발현하도록 형질전환된 NIH-3T3 세포 또는 SKBR3 세포와 같은 암종 세포주 {문헌[Stancovski et al., PNAS (USA) 88: 8691-8695 (1991)] 참조})를 사용하여 항체를 생산할 수 있다. 항체를 생산하기에 유용한 ErbB2의 다른 형태는 당업계의 기술자에게 명백할 것이다.
- [0094] (i) 폴리클로날 항체
- [0095] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 보조제를 피하(sc) 또는 복강내(ip)로 여러번 주사하여 동물 내에서 유발시킨다. 그 관련 항원을, 면역시키고자 하는 중에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키홀 샷조개 (keyhole limpet) 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 타이로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제에, 이관능성 작용제 또는 유도화제, 예를 들면, 말레이미도벤조일 술포숙신아미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통해 결합), N-히드록시숙신아미드 (라이신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl<sub>2</sub>, 또는 R<sup>1</sup>N=C=NR (여기에서, R 및 R<sup>1</sup>은 상이한 알킬기임)를 사용하여 결합시키는 것이 유용할 수 있다.
- [0096] 동물을 예를 들면, 100 μg 또는 5 μg의 단백질 또는 결합물 (각각 토끼와 마우스에 대해)을 3 부피의 프로인드 (Freund's) 완전 보조제와 혼합하고, 이 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 결합물 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후에, 동물을 원래의 양의 1/5 내지 1/10의 프로인드 완전 보조제 중의 펩티드 또는 결합물로 다수 부위에 피하 주사함으로써 재면역시켰다. 7 내지 14일 후, 동물을 출혈시키고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석하였다. 역가가 정체 (plateau)될 때까지 동물을 재면역시킨다. 바람직하게는, 동일한 항원을 상이한 단백질에, 및(또는) 상이한 가교결합제를 통해 결합시킨 결합물로 동물을 재면역화한다. 결합물은 또한 단백질 용합체로서 재조합 세포 배양을 통해 제조할 수 있다. 또한, 명반(alum)과 같은 응집제를 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.
- [0097] (ii) 모노클로날 항체
- [0098] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 얻으며, 즉, 집단을 이루는 개별적인 항체들은 소량 존재할 수 있는 가능한 자연 변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 변형 "모노클로날"은 별개의 항체들의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 지시한다.
- [0099] 예를 들면, 모노클로날 항체는 문헌[코홀러 (Kohler) 등, Nature, 256: 495 (1975)]에서 처음 기술된 하이브리

도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)을 이용하여 제조할 수 있다.

- [0100] 하이브리도마 방법에서, 면역화를 위해 사용된 단백질에 충분히 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 백혈구를 유도하도록 마우스, 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 동물을 상기한 바와 같이 면역화시킨다. 별 방법으로, 백혈구를 시험관 내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 백혈구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합제를 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 [고딩 (Goding), *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].
- [0101] 이렇게 제조한 하이브리도마 세포를 바람직하게는 비융합 골수종 모세포의 성장 또는 생존을 억제시키는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배지 중에 접종하고 배양시킨다. 예를 들면, 골수종 모세포가 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우, 하이브리도마용 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이며, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제시킨다.
- [0102] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 높은 수준의 안정한 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 이들 중, 바람직한 골수종 세포주는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11, 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것과 같은 쥐 골수종 세포주이다. 사람 골수종 세포주 및 마우스-사람 헤테로골수종 세포주가 또한 사람 모노클로날 항체의 생산에 대해 기술되었다 [코즈보르 (Kozbor), *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); 및 브로듀어 (Brodeur) 등, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].
- [0103] 하이브리도마 세포가 성장하는 배지를 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석하였다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침강법에 의해, 또는 방사성면역분석법 (RIA) 또는 효소 결합 면역 흡수 분석법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석에 의해 측정하였다.
- [0104] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들면, 먼슨 (Munson) 등 [*Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 측정할 수 있다.
- [0105] 원하는 특이성, 친화도 및(또는) 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝시키고 표준 방법 [고딩, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]으로 배양시켰다. 이러한 목적에 적합한 배지는 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수종양으로서 생체내 배양시킬 수 있다.
- [0106] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들면, 단백질 A-세파로즈 (Sephrose), 히드록시아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 절차에 의해 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리시킨다.
- [0107] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차 (예를 들면, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써)를 이용하여 쉽게 분리되고 서열결정된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 기원으로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 이어서, 그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이(E. coli) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성시킨다. 항체를 코딩하는 DNA의 세균에서의 재조합 발현에 대한 리뷰 문헌은 문헌[스케라 (Skerra) 등, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993); 및 플뤼틴 (Plueckthun), *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0108] 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 문헌[맥카퍼티 (McCafferty) 등, *Nature*, 348: 551-554 (1990)]에 기술된 기법을 이용하여 생산된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌[클랙슨 (Clackson) 등, *Nature*, 352: 624-628 (1991) 및 막스 (Marks) 등, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에서는 파지 라이브러리를 사용하는 쥐 및 사람 항체의 단리를 각각 기술하였다. 이후의 문헌에서는 체인 서플링(chain shuffling)에 의한 고친화도(nM 범위)의 사람 항체의 생산 [막스 등, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)] 뿐만 아니라, 매우 큰 파지 라이브러리의 제조 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 [워터하우스 (Waterhouse) 등, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)]을 기술하였다. 따라서, 이들 기법은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전

통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기법과 병용가능한 방법이다.

- [0109] DNA는 또한 예를 들면, 동종 쥐 서열 대신 사람 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 문헌[모리슨(Morrison) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)]), 또는 비면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수 있다.
- [0110] 전형적으로 그러한 비면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나, 항체의 한 항체-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어 항원에 특이성을 갖는 하나의 항체-결합 부위 및 상이한 항원에 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.
- [0111] (iii) 인간화 항체 및 사람 항체
- [0112] 비사람 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비사람 기원으로 부터의 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비사람 아미노산 잔기는 종종 "임포트(import)" 잔기로 부르며, 전형적으로 "임포트" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 사람 항체의 상응하는 서열 대신 설치류 CDRs 또는 CDR 서열로 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 등의 방법 [존스(Jones) 등, Nature, 321: 522-525 (1986); 리치만(Riechmann) 등, Nature, 332: 323-327 (1988); 베르호옌(Verhoeven) 등, Science, 239: 1534-1536 (1988)]에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 실질적으로 보다 적은 무손상 사람 가변 도메인이 비사람 종으로부터 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기를 설치류 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기로 치환시킨 사람 항체이다.
- [0113] 인간화 항체를 제조하기 위해 사용되는 사람 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 도메인 모두)의 선택은 항원성을 감소시키기 위해 매우 중요하다. 소위 "베스트핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지의 사람 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 사람 서열을 인간화 항체를 위한 사람 프레임워크(FR)로서 수용한다 [심스(Sims) 등, J. Immunol, 151: 2296 (1993); 코티아(Chothia) 등, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)]. 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 사람 항체의 인식 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 몇종의 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 [카터(Carter) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); 프레스타(Presta) 등, J. Immunol., 151: 2623 (1993)].
- [0114] 항원에 대한 높은 친화도와 다른 양호한 생물학적 특성을 보유하면서 항체를 인간화시키는 것이 또한 중요하다. 이러한 목적을 이루기 위해, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하는 모서열과 다양한 구상되는 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하고, 당업계의 기술자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 배위 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이를 점검하면 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기들의 유망한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 끼치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 원하는 항체 특성을 성취하도록, 수여자 및 임포트 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 결합시킬 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 끼치는데 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여된다.
- [0115] 별법으로, 지금은 내인성 면역글로불린 생산의 부재하에 면역시 사람 항체의 완전한 레퍼터리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 마우스)을 제조할 수 있다. 예를 들면, 키메라 및 생식세포주 돌연변이 마우스에서 항체의 중쇄 연결 영역 ( $J_H$ ) 유전자를 동질적으로 삭제시키면 내인성 항체 생산의 완전히 억제시키는 것이 기술되었다. 사람 생식세포주 면역글로불린 유전자 배열을 그러한 생식세포주 돌연변이 마우스에 전달시키면 항원 켈린지시 사람 항체를 생산할 것이다. 예를 들면, 문헌[제이코보비츠(Jakovits) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); 제이코보비츠 등, Nature, 362: 255-258 (1993); 브루거만(Bruggermann) 등, Year in Immuno., 7: 33 (1993)] 참조. 사람 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수 있다 [후겐봄(Hoogenboom) 등, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); 막스 등, J. Mol. Bio., 222: 581-597 (1991)].
- [0116] (iv) 항체 단편
- [0117] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기법이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 단백질의 단백질 분해성 소화에 의해 유래되었다 (예를 들면, 문헌[모리모토(Morimoto) 등, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) 및 브렌난(Brennan) 등, Science, 229: 81 (1985)]을 참조). 그러



나, 이들 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리시킬 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수하고 화학적으로 결합시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다 [카터 (Carter) 등, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)]. 다른 방법에 따라, F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리시킬 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기법은 숙련된 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. 국제 특허 공개 제WO 93/16185호 참조.

[0118] (v) 이중특이적 항체

[0119] 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 ErbB2 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들면, 하나의 아암은 7C2/7F3 에피토프과 같은 ErbB2의 도메인 1에서의 에피토프에 결합할 수 있고, 다른 하나의 아암은 상이한 ErbB2 에피토프, 예를 들면, 4D5 에피토프에 결합할 수 있다. 그러한 다른 항체는 ErbB2 결합 부위를 EGFR, ErbB3 및(또는) ErbB4에 대한 결합 부위(들)에 결합시킬 수 있다. 별법으로, 항-ErbB2 아암은 T-세포 수용체 분자와 같은 백혈구 상의 트리거링 분자 (예를 들면, CD2 또는 CD3), 또는 Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) 및 Fc $\gamma$ RIII (CD16)과 같은 IgG (Fc $\gamma$ R)에 대한 Fc 수용체에 결합하는 아암과 결합시킬 수 있다. 이중특이적 항체는 ErbB2를 발현하는 세포에 세포독성제를 배치시키기 위해 사용할 수 있다. 이들 항체는 ErbB2-결합 아암 및 세포독성제 (예를 들면, 사포린, 항-인터페론- $\alpha$ , 빙카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토크세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)과 결합하는 아암을 갖는다. 이중특이적 항체는 완전한 길이의 항체 또는 항체 단편 (예를 들면, F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로서 제조할 수 있다.

[0120] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 완전한 길이의 이중특이적 항체의 전통적인 제법은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하며, 여기에서, 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 [밀스타인 (Millstein) 등, Nature, 305: 537-539 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 구분으로 인해, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하며, 이중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계로 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 국제 특허 공개 제WO 93/08829호 및 문헌[트라우네커 (Traunecker) 등, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다.

[0121] 다른 방법에 따라, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체의 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2의 적어도 일부 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합물의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물, 및 원하는 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터에 삽입하고, 적당한 숙주 유기체로 동시형질감염시킨다. 이렇게 하면 제작에 사용된 비동등한 비율의 3개의 폴리펩티드 사슬이 최적의 수율을 제공하는 경우 실제에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 우수한 융통성을 제공한다. 그러나, 동등한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현이 높은 수율을 제공하는 경우 또는 비율이 특히 중요하지 않은 경우, 2개 또는 3개의 모든 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터 내에 삽입하는 것도 가능하다.

[0122] 이 방법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 아암에서 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄와 다른 아암에서 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 단지 1/2에서의 면역글로불린 경쇄가 손쉬운 분리 방식을 제공하므로, 이러한 비대칭 구조가 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이 방법은 국제 특허 공개 제WO 94/04690호에 기술되어 있다. 이중특이적 항체를 생산하기 위한 보다 상세한 내용은 예를 들면, 문헌[수레쉬(Suresh) 등, Methods in Enzymology, 121: 210(1986)] 참조.

[0123] 국제 특허 공개 제WO 96/27011호에 기재된 다른 방법에 따라, 한 쌍의 항체 분자들 사이의 계면을 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 헤테로다имер의 백분율을 최대화하도록 유전공학적으로 처리할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C<sub>H3</sub> 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예를 들면, 티로신 또는 트립토판)으로 치환시킨다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄 (예를 들면, 알라민 또는 트레오닌)로 치환시킴으로써 제2 항체의 계면 상에 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보충적인 "공간"이 생성된다. 이렇게 하여 호모다имер과 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물 보다 헤테로다имер의 수율을 증가시키는 기전을 제공한다.

[0124] 이중특이적 항체는 가교결합된 또는 "헤테로결합" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로결합물 내의 항체 중 하

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

[0125] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 제조하는 기법은 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조할 수 있다. 문헌[브렌난(Brennan) 등, Science, 229: 81 (1985)]에서는  $F(ab')_2$  단편을 제조하기 위해 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단시키는 절차를 기술하였다. 이들 단편은 디티올 착화제인 아미산나트륨의 존재하에 환원되어 인근(vicinal) 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸아민으로 환원시킴으로써 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 제제로서 사용할 수 있다.

[0126] 최근의 진보로 이. 콜라이로부터 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수가 용이해졌고, 이는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 결합될 수 있다. 문헌[샬라비(Shalaby) 등, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에서는 완전한 인간화 이중특이적 항체  $F(ab')_2$  분자의 생산을 기술하였다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되고, 시험관 내에서 화학 결합시켜 이중특이적 항체를 형성한다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 사람 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 사람 유방암 표적에 대해 사람 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발시킨다.

[0127] 제조할 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리시키는 다양한 기법이 또한 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 류신 지퍼(zipper)를 사용하여 생산되었다 [코스텔나이(Kostelny) 등, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 호모다имер을 힌지 영역에서 환원시켜 모노머를 형성한 다음, 재산화시켜 항체 헤테로다имер을 형성하였다. 이 방법은 또한 항체 호모다имер의 생산에 이용될 수 있다. 문헌[홀링거(Hollinger) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기술되어 있는 "디아바디" 기법에서는 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적인 기전을 제공하였다. 단편은 동일 사슬 상의 2개의 도메인 사이를 짝지우기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인( $V_H$ )을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 다른 단편의 상보적인  $V_L$  및  $V_H$  도메인과 짝을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위를 형성하게 된다. 단일 사슬 Fv (sFv)를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 다른 방법이 또한 보고되었다 (문헌[그루버(Gruber) 등, J. Immunol., 152: 5368 (1994)] 참조).

[0128] 2 이상의 역가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 [투트(Tutt) 등, J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0129] (vi) 원하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝

[0130] 항체를 생산하는 기법은 상기에 기술하였다. 상기한 특징을 갖는 이들 항체를 선별한다.

[0131] 세포 사멸을 유도하는 항체를 선별하기 위해, 예를 들면, PI, 트리판 블루 또는 7AAD 흡수에 의해 지시되는 막 자체의 손실을 대조구에 비해 평가하였다. 바람직한 평가는 "BT474 세포를 사용한 PI 흡수 분석"이다. 이 분석에 따라, BT474 세포 (이는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, 매릴랜드주 록빌))으로부터 입수할 수 있음)를 10% 열불활성화 FBS (Hyclone) 및 2mM L-글루타민을 보충한 돌베코 개질 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; D-MEM):Ham's F-12 (50:50)에서 배양시킨다. (따라서, 분석은 보체 및 면역 작용기(effector) 세포의 부재하에 수행한다.) BT474 세포를 100×20 mm의 접시에 접시당  $3 \times 10^6$ 의 밀도로 접종하고 밤새 부착시킨다. 이어서, 배지를 제거하고, 신선한 배지만 또는 10 $\mu$ g/ml의 적절한 MAb를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 배양시킨다. 각각의 처리 후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신 분해 (trypsinization)에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 4°C에서 12000rpm으로 4분 동안 원심분리시키고, 펠렛을 3ml의 빙냉  $Ca^{2+}$  결합 완충액 (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ )에 재현탁시키고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35mm 여과기 캐핑된 12×75 시험관 (시험관당 1ml, 처리군당 3개의 시험관)에 분취하였다. 이어서, 시험관에 PI (10 $\mu$ g/ml)을 넣었다. FACSCAN™ 유동 세포 계산기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소

소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 측정할 때 통계학적으로 유의한 수준으로 세포를 사멸시키는 항체를 선별하였다.

[0132] 세포사멸을 유발하는 항체를 선별하기 위해, 하기 실시예 2에 기술한 바와 같은 "BT474 세포를 사용하는 아넥신 결합 분석"이 이용가능하다. 앞서 단락에서 기술한 바와 같이 BT474 세포를 배양하고 접시에 접종시켰다. 이어서, 배지를 제거하고, 신선한 배지만 또는 10 $\mu$ g/ml의 MAB를 함유하는 배지로 교체한다. 3일간의 배양 기간 이후, 단일층을 PBS로 세척하고 트립신분해에 의해 탈착시켰다. 이어서, 상기 논의한 바와 같이 세포 사멸 분석을 위해 세포를 원심분리시키고, Ca<sup>2+</sup> 결합 완충액에 재현탁시키고, 시험관에 분취하였다. 이어서, 시험관에 표지된 아넥신 (예를 들면, 아넥신 V-FTIC) (1 $\mu$ g/ml)을 넣었다. FACSCAN™ 유동 세포 계산기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 사용하여 시료를 분석할 수 있다. 대조구에 비해 통계학적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 세포사멸 유도 항체로서 선별하였다.

[0133] 앞서 단락에서 논의한 아넥신 결합 분석 이외에, "BT474 세포를 사용하는 DNA 염색 분석"이 이용가능하다. 이 분석을 수행하기 위해, 앞서의 두 단락에 기술한 바와 같이 관심있는 항체로 처리한 BT474 세포를 9 $\mu$ g/ml의 HOECHST 33342™을 사용하여 37°C에서 2시간 동안 배양시킨 다음, MODFITLT™ 소프트웨어 (Verity Software House)를 사용하여 EPICS ELITE™ 유동 세포 계산기 (Coulter Corporation) 상에서 분석하였다. 비처리 세포 (100% 이하의 사멸 세포) 보다 2배 이상 (바람직하게는 3배 이상)으로 세포사멸 세포의 비율을 변화시키는 항체를 이 분석을 이용한 세포사멸 유도 항체로서 선별할 수 있다.

[0134] 관심있는 항체에 의해 결합된 ErbB2 상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 에드 할로우(Ed Harlow) 및 데이빗 레인(David Lane) (1988)]에 기술된 것과 같은 보통의 교차 차단 분석을 수행할 수 있다. 별법으로, 실시예 2에 기술된 에피토프 맵핑을 수행할 수 있다.

[0135] 세포 배양물에서 SKBR3 세포의 성장을 50-100% 억제하는 항-ErbB2 항체를 동정하기 위해, 국제 특허 공개 제WO 89/06692호에 기재된 SKBR3 분석을 수행할 수 있다. 이 분석에 따라, SKBR3 세포를 10% 태아 송아지 혈청, 글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신을 보충한 F12 및 DMEM 배지의 1:1 혼합물 중에서 배양시켰다. SKBR3 세포를 35mm 세포 배양 접시 내에 20,000 세포로 플레이팅시켰다 (2ml/35mm 접시). 1 접시당 2.5 $\mu$ g/ml의 항-ErbB2 항체를 첨가하였다. 6일 후, 비처리 세포에 대한 세포의 수를 전자적 COULTER™ 세포 계수기를 사용하여 계수하였다. SKBR3 세포의 성장을 50-100% 억제하는 항체가 원하는 바의 세포사멸 항체와 함께 선별된다.

[0136] (vii) 이펙터 기능 유전공학적 처리

[0137] 예를 들면, 암을 치료하는 데 있어서 항체의 유효성을 증가시키기 위해, 작동기 기능에 대해 본 발명의 항체를 개질시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)을 Fc 영역에 도입하여, 이 영역에서 쇠간 디설피드 결합 형성을 허용할 수 있다. 이렇게 생산된 호모다имер 항체는 증진된 내부이행(internalization) 능력 및(또는) 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포독성(ADCC)를 가질 수 있다. 문헌[카론(Caron) 등, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992); 및 쇼페스, 비. (Shopes, B.) J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)] 참조. 문헌[울프(Wolff) 등, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같이 헤테로이관능성 가교결합기를 사용하여 증진된 항종양 활성을 갖는 호모다имер 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 유전공학적으로 처리할 수 있고, 이에 의해 보체 용해 및 ADCC 능력을 증진시킬 수 있다. 문헌[스테벤슨(Stevenson) 등, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)] 참조.

[0138] (viii) 면역결합물

[0139] 본 발명은 또한 화학요법제, 독소(예를 들면, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (예를 들면, 방사성결합물)에 결합된 본원에 기술한 항체를 포함하는 면역결합물에 관한 것이다.

[0140] 그러한 면역결합물의 생산에 유용한 화학요법제는 상기 기술하였다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사 (Pseudomonas aeruginosa)로부터), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모텍신 A 사슬, 알파-사르신, 알루라이츠 포르디 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 파이놀라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (sapaonaria officinalis) 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노미신, 에노미신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성결합된 항-ErbB2 항체를 생산하기 위해 다양한 방사성뉴클리드가 이용가능하다. 그

예로는 <sup>211</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>90</sup>Y 및 <sup>186</sup>Re를 포함한다.

- [0141] 항체 및 세포독성제의 결합은 다양한 2기능성 단백질 결합제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3(2-피리딜디티올) 프로 피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피메이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르 알데히드), 비스-아 지도 화합물(예를 들어 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄 벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 툴리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098(1987)]에 기재된 바에 따라 제조될 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오 시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)는 방사성 뉴클레오티드를 항체에 결합시키기 위 한 킬레이팅제의 예이다 (예를 들어 W094/11026 참조).
- [0142] 다른 실시양태에서, 항체는 종양 예비 표적화에 사용하기 위한 "수용체" (예를 들어 스트렙타비딘)에 결합될 수 있고, 항체-수용체 결합체는 환자에게 투여된 후 정화제를 사용하여 비결합된 결합체를 순환물로부터 제거하고 이어서 세포독성제(예를 들어 방사성 뉴클레오티드)에 결합된 "리간드"(예를 들어 아비딘)이 투여된다.
- [0143] (ix) 면역리포솜
- [0144] 항-ErbB2 항체는 또한 면역리포솜으로서 제조될 수도 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 공지의 방법에 의해 제 조된다 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 및 미국 특허 제4,485,045호 및 4,544,545호]. 순환 시간이 증강된 리포솜은 미국 특허 제5,013,556호에 기재되어 있다.
- [0145] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)를 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 한정된 세공 크기를 갖는 필터를 통하여 압출하여 목적 직경을 갖는 리포솜을 생성시킨다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디술폰드 교환 반응을 통하여 문헌[Martin et al., Biol. Chem. 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 결합될 수 있다. 화학요 법제(예를 들어 독소루비신)은 리포솜 내에 임의로 함유된다 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989) 참조].
- [0146] (x) 항체 의존적 효소 매개 전구약물 요법 (ADEPT)
- [0147] 본 발명의 항체는 또한 전구약물(예를 들어 펩티드 화학요법제, W081/01145 참조)을 활성 함암 약물로 전환시키 는 전구약물 활성화 효소에 항체를 결합시킴으로써 ADEPT에 사용될 수 있다 (예를 들어 W088/07378 및 미국 특허 제4,975,278호 참조).
- [0148] ADEPT에 유용한 면역결합체의 효소 성분은 전구약물을 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 대해 작용할 수 있는 효소를 포함한다.
- [0149] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 인산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리 포스파타제; 황산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리 아릴술파타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항 암제인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카 베신 (예를 들어 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르 복시펩티다제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물 분해 효소, 예를 들어 β-갈 라토시다제 및 뉴라미니다제; β-락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β-락타마제; 및 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 아민 질소에서 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아미다제, 예를 들어 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제를 포함하고, 이에 제한되지 않는 다. 별법으로, 당업계에 "아브짐(abzyme)"으로도 알려진 효소 활성을 갖는 항체를 사용하여 본 발명의 전구약 물을 유리 활성 약물로 전환시킬 수 있다 (예를 들어 Massey, Nature 328:457-458(1987) 참조). 항체-아브짐 결합체는 아브짐의 종양 세포 군집으로의 전달에 대해서 본원에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 효소는 상기 논의한 헤테로 2기능성 가교결합제의 사용과 같은 당업계에 공지된 기술에 의해 항-ErbB2 항체에 공유결합될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할

수 있다 (예를 들어 Neuberger et al., Nature, 312:604-608(1984) 참조).

[0151] (xi) 항체-샬비지 수용체 결합 에피토프 융합

[0152] 본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어 중앙 투과를 증가시키기 위해서 완전한 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우, 항체 단편은 그의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 변형되는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 예를 들어 샬비지 수용체 결합 에피토프를 항체 단편에 (예를 들어 항체 단편의 적절한 영역의 변이에 의해 또는 예를 들어 DNA 또는 펩티드 합성에 의해 항체 단편의 말단 또는 중앙에 융합되는 펩티드 태그에 에피토프를 도입함으로써) 도입함으로써 달성될 수 있다.

[0153] 체내 반감기가 증가된 상기 항체 변이체를 제조하는 체계적인 방법은 몇단계로 이루어진다. 제1 단계는 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프에 결합하는 샬비지 수용체의 서열 및 배열을 동정하는 단계를 수반한다. 에피토프가 동정된 후에 목적 항체의 서열은 동정된 결합 에피토프의 서열 및 배열을 포함하도록 변형된다. 서열이 변이된 후에, 항체 변이체는 본래의 항체보다 긴 체내 반감기를 갖는지를 확인하기 위해 시험된다. 항체 변이체가 시험시에 보다 긴 체내 반감기를 갖지 않으면, 그 서열은 동정된 결합 에피토프의 서열 및 배열을 포함하도록 추가로 변형된다. 변형된 항체는 보다 긴 체내 반감기에 대해 시험되고, 이 과정은 보다 긴 체내 반감기를 보이는 분자가 수득될 때까지 계속된다.

[0154] 이와 같이 목적 항체에 도입된 샬비지 수용체 결합 에피토프는 상기 정의된 바와 같은 적합한 에피토프이고, 그의 특성은 변형된 항체의 종류에 따라 결정될 것이다. 이전은 목적 항체가 계속 생물학적 활성을 갖도록 제조된다.

[0155] 에피토프는 Fc 도메인의 하나 또는 두개의 루프로부터의 1 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사 위치로 이전된 영역을 구성하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, Fc 도메인의 하나 또는 두개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 이전된다. 보다 더 바람직하게는, 에피토프는 Fc 영역(예를 들어 IgG의)의 CH2 도메인으로부터 선발되어 항체의 CH1, CH3 또는 V<sub>H</sub> 영역, 또는 하나 이상의 상기 영역으로 이전된다. 별법으로, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 선발되어 항체 단편의 C<sub>L</sub> 영역 또는 V<sub>L</sub> 영역, 또는 두 영역 모두로 이전된다.

[0156] 가장 바람직한 한 실시양태에서, 샬비지 수용체 결합 에피토프는 서열 (5'에서 3'으로) PKNSSMISNTP (서열 3)를 포함하고, 임의로 HQSLGTQ (서열 4), HQNLSGDK (서열 5), HQNISDGK (서열 6) 및 VISSHLGQ (서열 7)로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 추가로 포함하고, 특히 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub>이다. 가장 바람직한 다른 실시양태에서, 샬비지 수용체 결합 에피토프는 서열(들) (5'에서 3'으로) HQNLSGDK (서열 5), HQNISDGK (서열 6) 또는 VISSHLGQ (서열 7) 및 서열 PKNSSMISNTP (서열 3)를 함유하는 폴리펩티드이다.

[0157] (xii) 항-ErbB2 항체의 정제

[0158] 제조할 기술을 사용할 때, 항체는 세포내에서, 세포질 주변(periplasm) 공간에서 생산될 수 있거나 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 파쇄 입자, 숙주 세포 또는 용균 단편이 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 세포질 주변 공간에 분비된 항체를 단리하는 방법이 기재되어 있다. 세포 페이스트는 아세트산나트륨(pH3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰플루오라이드(PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동된다. 세포 파쇄물은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우에는, 상기 발현 시스템으로부터의 상층물은 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축하는 것이 바람직하다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계에 포함될 수 있고, 항생도제는 외래 오염물의 성장을 억제하기 위해 포함될 수 있다.

[0159] 세포로부터 제조되는 항체 조성물은 예를 들어 히드록실아파티드 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피, 바람직하게는 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A는 사람  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 또는  $\gamma$ 4 중쇄를 기재로 한 항체의 정제에 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 사람  $\gamma$ 3을 위해 추천된다 (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). 친화도 리간드가 결합되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 사용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스는 세공 조절된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 사용하여 달성할 수 있는 것 보다 신속한 유속 및 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 경우에는, Bakerbond ABX 수지(등록상표) (J.T. Baker, 미국 뉴저지주 Phillipsburg 소재)가 정제에 유용하

다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온 교환 컬럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE(등록상표) 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를 들어 폴리아스파르산 컬럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 회수되는 항체에 따라 사용가능하다.

[0160] 예비 정제 단계(들) 후에, 목적 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 약 2.5 내지 4.5의 pH의 용출 완충액을 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 저 pH 소수성 크로마토그래피에 적용할 수 있다.

[0161] III. 혈청내 항-ErbB2 항체 농도의 결정

[0162] 하기 비-제한적 분석은 혈청, 양수, 유액, 태줄 도관 혈청, 안수 및 초자체 액체, 및 눈의 초자체 겔을 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유동물 체액내의 특정 rhuMab HER2 (HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 포함하는 인간화 항-p185<sup>HER2</sup> 모노클로날 항체)의 존재를 결정하거나 그의 양을 정량하는데 유용하다.

[0163] rhuMab HER2 (인간화 항-p185<sup>HER2</sup> 모노클로날 항체)에 대한 플레이트 결합 활성 분석

[0164] 본원에 기재된 rhuMab HER2 분석 방법은 이러한 방법의 한 예일 뿐이며 이에 한정되지는 않는다. 표준 rhuMab HER2 제제 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA), 대조구 및 혈청 샘플을 분석 희석액 (Assay Diluent) (PBS/0.5% BSA/0.05% 폴리스orb에이트 (Polysorbate) 20/0.01% 티메로살 (Thimerosal))으로 희석시켰다. 표준 곡선에 유용한 농도 범위로 표준 rhuMab HER2 희석액을 제조하였다. 샘플을 표준 곡선내에 해당하도록 희석시켰다.

[0165] 코팅 완충액 중 코팅 항원 (0.05 M 탄산나트륨 완충액 중 재조합 p185<sup>HER2</sup> (Genentech, Inc.))의 분획을 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 가하고 2 내지 8 °C에서 12 내지 72시간 동안 인큐베이션하였다. 코팅 용액을 제거하고 각 웰을 물로 6회 세척한 다음, 과량을 물을 흡수 제거하였다.

[0166] 분석 희석액 분획을 각 웰에 가하고 주변 온도에서 1 내지 2 시간 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 웰을 상기 단계에서와 같이 세척하였다.

[0167] 희석된 표준, 대조 및 샘플 용액의 분획을 각 웰에 가하고 주변 온도에서 1시간 동안 교반하면서 인큐베이션하여 항체를 코팅 항원에 결합시켰다. 웰을 상기 단계에서와 같이 물로 다시 세척하였다.

[0168] 양고추냉이 페록시다제-결합물 (HRP-결합물, 양고추냉이 페록시다제에 연결된 염소 항-사람 IgG Fc; Organon Teknika catalog #55253 또는 등가물)을 분석 희석액으로 희석하여 가장 높은 표준값과 가장 낮은 표준값 사이의 적절한 광학 밀도 범위를 얻었다. HRP-결합물 용액의 분획을 각 웰에 가하고 주변 온도에서 1시간 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 웰을 상기 단계에서와 같이 물로 세척하였다.

[0169] 기질 용액 (PBS 중의 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12.5 ml 중 o-페닐렌디아민 (OPD) 5 mg 정제 (Sigma P6912 또는 동등물))의 분획을 각 웰에 가하고 암조건하에 주변 온도에서 충분한 시간 (약 8 내지 10분) 동안 인큐베이션하여 발색시켰다. 4.5 N 황산 분획을 가하여 반응을 정지시켰다. 광학 밀도는 검출 흡광도에 대하여 490 내지 492 nm, 대조 흡광도에 대하여는 405 nm에서 판독하였다. 표준 곡선 데이터를 그래프로 나타내었으며, 대조구 및 시료에 대한 결과는 표준 곡선으로부터 결정하였다.

[0170] IV. 제약 제제

[0171] 본 발명에 따라 사용된 항체의 치료 제제는, 목적하는 순도를 가진 항체를 임의로 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합함으로써, 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 제조되어 저장된다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이들의 예로는 인산염, 시트르산염 및 기타 유기 산 등의 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 방부제 (예를 들면, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 폴리비닐 피롤리돈 등의 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신 등의 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한, 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물; EDTA 등의 킬레이

트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨 등의 당; 나트륨 등의 염 형성 반대이온; 금속 착물 (예: Zn-단백질 착물); 및(또는) TWEEN, PLURONICS (상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 등의 비이온성 계면활성제가 있다. 바람직한 동결건조된 항-ErbB2 항체 제제가 WO 97/04801에 기재되어 있고 이 출원의 개시내용은 본원에 포함되는 것으로 한다.

[0172] 본원의 제제는 또한, 치료받는 특정한 징후에 대해 필요한 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에 대해 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖고 있는 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들면, EGFR, ErbB2 (예: ErbB2 상의 상이한 에피토포에 결합하는 항체), ErbB3, ErbB4 또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)와 결합하는 항체를 하나의 제제 내에 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 조성물은 세포독성제, 사이토카인 또는 성장 억제제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는, 의도한 목적에 효과적인 양으로 함께 존재한다.

[0173] 활성 성분은 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 미소에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전 중에서, 코아세르베이션 (coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합반응에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐과 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

[0174] 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균해야 한다. 이러한 멸균은 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0175] 서방출형 제제를 제조할 수 있다. 서방출형 제제의 적합한 예에는 항체를 함유하는 고휘 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들면 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 서방출형 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들면 LUPRON DEPOT (상표명) (락트산-글리콜산 공중합체와 류프폴리드 아세테이트로 구성된 주사 가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 100일에 걸쳐 분자를 방출시킬 수 있지만, 일부 히드로겔은 보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 체내에서 장기간 동안 남아 있는 경우, 이들 항체는 37°C, 습기에 노출되었을 때 변성되거나 응집되어 생물학적 활성을 상실할 수 있고 가능하게는 면역원성의 변화를 초래할 수 있다. 관련된 메카니즘에 따라 합리적인 안정화 방법을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설파이드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합인 것으로 발견되면, 술폰히드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결시키고, 습기 함량을 조절하고, 적절한 첨가제를 사용하고, 특정한 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 안정화시킬 수 있다.

[0176] **V. 항-ErbB2 항체를 사용한 치료**

[0177] 본 발명에 따라, 항-ErbB2 항체를 사용하여 ErbB2 수용체의 과발현 및(또는) 활성화를 특징으로 하는 각종 증상을 치료할 수 있다는 것이 고려된다. 증상 또는 장애의 예에는 양성 또는 악성 종양 (예를 들어, 신, 간, 신장, 방광, 유방, 위, 난소, 결장직장, 전립선, 췌장, 폐, 외음, 갑상선, 간암, 육종, 교모세포, 및 다양한 두경부종); 백혈병 및 임파계 악성 종양; 기타 장애, 예를 들면 신경세포 장애, 신경교아 장애, 성상세포 장애, 시상하부 장애, 선상 장애, 마크로파지 장애, 상피 장애, 위 장애, 블라스토크엘릭 (blastocoelic) 장애; 및 염증, 혈관신생 및 면역학적 장애가 포함된다.

[0178] 본 발명의 항체는 공지된 방법, 예를 들면 정맥내 환제 투여 또는 일정 기간에 걸친 연속 관주, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 포막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여된다. 상기 항체의 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다.

[0179] 본 발명의 치료는 항-ErbB2 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여한 후, 일정한 간격을 두고 상기 항체의 투여량과 동일하거나 보다 적은 후속 투여량을 투여하여 치료하는 동안 목표 혈청 농도에 도달하여 이 농도를 유지하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 유지 투여량은 환제 전달, 바람직하게는 피하 환제 투여에 의해 전달하므로 환자 및 건강을 돌보는 전문가에게 편리하고 경제적인 치료법이다.

[0180] 화학요법제 (안트라사이클린 이외의 것)의 병행 투여가 필요한 경우, 병행 투여에는 분리된 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하여 함께 투여하는 것과 제제를 차례대로 연속 투여하는 것이 포함된다 (여기서, 바람직하게는 두 가지 (모든) 활성제는 동시에 그들의 생물학적 활성을 나타내는 기간이 있음). 이러한 화학요법제에 대한

제조 및 투여 스케줄은 제조업자의 지시에 따르거나 당해 분야의 숙련인에 의해 실험적으로 결정된 바에 따라서 이용될 수 있다. 이러한 화학요법에 대한 제조 및 투여 스케줄은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에도 기재되어 있다. 화학요법제는 본 발명의 항체를 투여하기 전 또는 투여한 후에 투여할 수 있고, 또는 상기 항체와 함께 동시에 투여할 수 있다. 상기 항체는 타목시펜과 같은 항-에스트로겐 화합물 또는 오나프리스톤과 같은 항-프로게스테론 (EP 616 812 참조)과 함께 사용될 수 있다 (상기 항-에스트로겐 화합물 또는 항-프로게스테론 화합물은 이들 분자에 대해 공지된 투여량으로 사용됨).

[0181] 다른 종양 관련 항원에 대한 항체, 예를 들어, EGFR, ErbB3, ErbB4 또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 결합하는 항체를 투여하는 것도 바람직할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 두 가지 이상의 항-ErbB2 항체를 환자에게 함께 투여할 수 있다. 종종, 1종 이상의 사이토카인을 환자에게 투여하는 것도 유리할 수 있다. ErbB2 항체는 성장 억제제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 성장 억제제를 먼저 투여한 후, ErbB2 항체를 투여할 수 있다. 그러나, 동시 투여 또는 ErbB2 항체의 투여도 먼저 고려된다. 성장 억제제에 적합한 투여량은 현재 사용되는 투여량이고 성장 억제제 및 항-ErbB2 항체의 조합된 작용 (상승작용)으로 인해 낮아질 수 있다.

[0182] 상기 치료법 이외에, 환자의 암세포를 외과적으로 제거하고(하거나) 환자를 방사선요법으로 치료한다.

[0183] 질병을 예방하거나 치료하기 위해서는, 항-ErbB2 항체의 적당한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료받고자 하는 질병의 유형, 항체를 예방 목적으로 투여하든 치료 목적으로 투여하든지 간에 해당 질병의 중증도와 경과, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응도, 및 주치의의 재량에 따라서 결정될 것이다. 항체는 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 전반에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 치료가 일련의 치료를 수반하는 경우, 초기 투여량을 투여한 후 1일 또는 1주 간격으로 유지 투여량을 투여한다. 각 유지 투여량은 초기 투여량으로 투여되는 항체의 양과 비교할 때 동일하거나 보다 적은 양의 항체를 제공한다.

[0184] 해당 질병의 유형과 중증도에 따라서, 1회 이상의 분리 투여에 의한 투여가든지 연속 관주에 의한 투여이든지, 환자에게 투여하기 위한 초기 용량은 약 1  $\mu$ g/kg 내지 15 mg/kg (예: 0.1 내지 20 mg/kg)의 항체이다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 요인들에 따라서, 약 1  $\mu$ g/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 것이다. 증상에 따라서 수 일 또는 그 이상에 걸쳐 반복하여 투여하는 경우에는, 목적하는 질환 증상의 억제가 이루어질 때까지 치료를 지속적으로 수행한다. 이러한 치료법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0185] 본 발명에 따라, 투여법에는 정맥내 또는 피하 관주에 의해 전달되는 6 mg/kg, 8 mg/kg 또는 12 mg/kg의 초기 투여 후, 정맥내 관주, 정맥내 환제 주사, 피하 관주 또는 피하 환제 주사에 의해 전달되는 2 mg/kg의 후속 투여를 매주 수행하는 것이 포함될 수 있다. 환자가 상기 항체에 대해 강한 내성을 보이는 경우, 관주 시간은 짧아질 수 있다.

[0186] 별법으로, 본 발명은 12 mg/kg의 항-ErbB2 항체의 초기 투여 후 3주 당 1회씩 6 mg/kg의 투여를 포함한다.

[0187] 또 다른 투여법은 8 mg/kg의 항-ErbB2 항체의 초기 투여 후 3주 당 1회씩 6 mg/kg의 투여를 포함한다.

[0188] 또 다른 투여법은 8 mg/kg의 항-ErbB2 항체의 초기 투여 후, 주 당 1회씩 8 mg/kg 또는 2 내지 3주 당 1회씩 8 mg/kg의 후속 유지 투여를 수행하는 것을 포함한다.

[0189] 대안적인 투여법으로서, 4 mg/kg의 항-ErbB2 항체의 초기 투여량을 1일, 2일 및 3일 각각에 투여한 후 3주 당 1회씩 6 mg/kg의 후속 유지 투여량을 투여할 수 있다.

[0190] 추가적인 투여법은 4 mg/kg의 항-ErbB2 항체의 초기 투여량을 투여한 후, 주 당 2회씩 2 mg/kg의 후속 유지 투여량을 투여하는 것을 포함하는데, 여기서 상기 유지 투여량은 3일 간격으로 투여한다.

[0191] 별법으로, 본 발명은 항-ErbB2 항체가 3주 동안 주 당 2-3회 전달되는 투여 주기를 포함할 수 있다. 이러한 3주 주기는 질환의 증상을 억제하는 데 필요한 만큼 반복하는 것이 바람직하다.

[0192] 본 발명은 항-ErbB2 항체가 5일 동안 매일 전달되는 순환 투여법도 포함한다. 본 발명에 따라, 주기는 질환의 증상을 억제하는 데 필요한 만큼 반복하는 것이 바람직하다. 적당한 투여량에 대한 추가 정보는 하기 실시예에 기재되어 있다.

[0193] **VI. 제품**

[0194] 본 발명의 또 다른 실시양태에서는, 상기 언급된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 이러한 제품은 용기, 표지 및 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들면 병, 바이알, 주사기 등이 포



함된다. 이러한 용기는 유리나 플라스틱과 같은 각종 재료로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 증상을 치료하는 데 효과적인 조성물을 보유하고 있으며, 멸균 출구를 가질 수 있다 (예를 들어, 이러한 용기는 피하 주사 바늘로 꿰뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 이러한 조성물 중의 하나 이상의 활성제가 항-ErbB2 항체이다. 용기 상의 표지 또는 용기에 부착된 표지는 해당 조성물이 선택된 증상을 치료하는 데 사용된다는 것을 지시해준다. 제품은 제약학적으로 허용가능한 완충제, 예컨대, 인산염 완충 생리수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 상업적인 관점 및 사용자의 관점에서 바람직한 다른 물질 (다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함함)도 포함할 수 있다. 또한, 제품은 예를 들어, 조성물이 안트라사이클린-타입 화학요법제, 예컨대, 독소루비신 또는 에피루비신과 함께 사용되어서는 안된다는 경고를 포함하는, 사용자를 위한 지시사항이 있는 포장 삽입물을 포함할 수 있다.

[0195] 물질의 기탁

[0196] 다음의 하이브리도마 세포주를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA; ATCC)에 기탁하였다:

[0197] 항체 명칭            ATCC 번호                            기탁일

[0198] 7C2                            ATCC HB-12215                        1996. 10. 17

[0199] 7F3                            ATCC HB-12216                        1996. 10. 17

[0200] 4D5                            ATCC CRL 10463                        1990. 5. 24

[0201] 2C4                            ATCC HB-12697                        1999. 4. 8

[0202] 본 발명의 더 상세한 내용은 하기 비제한적 실시예에 의해 설명된다.

**발명의 효과**

[0203] 본 발명의 프론트 로딩 약물 치료 방법은 치료 초기에 목표 혈청 약물 농도에 도달함으로써 효능이 증가되는 이점을 갖는다. 본 발명에 따른 피하 전달에 의한 유지 투여는 약물 치료 시간을 줄이고 비용을 절감함으로써 환자와 건강 관리 종사자에게 있어 편리한 이점을 제공한다. 본 발명의 방법은 ErbB2 수용체의 과다발현을 특징으로 하는 유방암 또는 난소암의 치료에 특히 적합하다.

**도면의 간단한 설명**

[0204] 도 1은 말단절단 돌연변이체 분석 및 부위-지시적 돌연변이에 의해 결정된 ErbB2 세포외 도메인의 에피토프 지도를 도시한 것이다 (Nakamura et al., J. of Virology 67(10):6179-6191 (1993년 10월); Renz et al., J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 (1994년 6월)). 항중식성 MAb 4D5 및 3H4는 막횡단 도메인에 인접하여 결합한다. 다양한 ErbB2-ECD 말단절단 또는 점 돌연변이체를 중합 효소 연쇄 반응 기술을 사용하여 cDNA로부터 제조하였다. ErbB2 돌연변이체는 포유동물 발현 플라스미드에서 gD 융합 단백질로서 발현되었다. 상기 발현 플라스미드는 삽입된 cDNA의 하류에 위치한 SV40 종결 및 폴리아데닐화 신호를 갖는 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서를 사용한다. 플라스미드 DNA를 사용하여 293S 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 1일 후에, 세포를 1% 투석된 우 태아 혈청, 및 <sup>35</sup>S 메티오닌 및 <sup>35</sup>S 시스테인을 각각 25 μCi씩 함유하는 메티오닌 및 시스테인 부재의 저 글루코스 DMEM 중에서 밤새 대사적으로 표지시켰다. 상층물을 수거하고, 이 상층물에 ErbB2 MAb 또는 대조구 항체를 첨가하여 4°C에서 2 내지 4시간 인큐베이션하였다. 결합체를 침전시키고 10 내지 20% 트리신 SDS 구배 겔에 적용하고 100 V에서 전기영동시켰다. 겔을 멤브레인 상에 전기 블롯팅하고 오토라디오그래피에 의해 분석하였다. 서열 8 및 9는 각기 3H4 및 4D5 에피토프를 나타낸다.

도 2는 ErbB2 도메인 1의 아미노산 서열 (서열 1)을 밑줄과 함께 도시한 것이다. 굵은 글씨로 나타낸 아미노산은 결실 맵핑에 의해 결정된 MAb 7C2 및 7F3에 의해 인식되는 에피토프, 즉 "7C2/7F3 에피토프" (서열 2)의 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 4 mg/kg의 초기 투여량으로 투여하고 이후에 매주 2 mg/kg을 투여하여 치료한 ErbB2 과다발현 환자에 있어서 2주 내지 36주 동안의 항-ErbB2 항체 (HERCEPTIN (등록상표)) 최소 혈청 농도에 관한 그래프이다. 각 시점에서 환자수는 "n" (백색 사각형)으로 나타내었다.

도 4a는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체로 치료한 마우스에서 시간에 따른 종양 체적의 변화를 나타내는

선형 그래프이다. 도 4b는 치료한 동물의 종양 체적의 변화를 보다 쉽게 관찰하도록 나타낸, 도 4a에서와 동일한 데이터에 관한 세미-로그 그래프이다.

도 5a 및 5b는 쥐 모노클로날 항체 2C4의 가변 경쇄 ( $V_L$ ) (도 5a) 및 가변 중쇄 ( $V_H$ ) (도 5b)의 아미노산 서열 (각각 서열 12 및 13); 인간화 Fab 형태 574 (각각 서열 12 및 13)의  $V_L$  및  $V_H$  도메인, 및 사람  $V_L$  및  $V_H$  컨센서스 프레임워크 (hum  $\kappa$ 1, 경쇄 카과 서브그룹 I; hum III, 중쇄 서브그룹 III) (각각 서열 14 및 15)의 배열을 나타낸다. 별표는 인간화 Fab 형태 574와 쥐 모노클로날 항체 2C4, 또는 인간화 Fab 형태 574와 인간 프레임워크의 차이를 나타낸다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 괄호로 나타내었다. ArgH71Val, AspH73Arg 및 IleH69Leu 변화를 갖는 인간화 Fab 형태 574는 본래의 키메라 2C4 Fab 단편의 것으로 복구된 결합을 갖는 것으로 보인다. 추가의 FR 및(또는) CDR 잔기, 예를 들어 L2, L54, L55, L56, H35 및(또는) H48을 변화시켜서 (예를 들어, IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser; 및 ValH48Ile와 같이 치환하여) 인간화 항체의 결합을 형성하거나 강화시킬 수 있다. 별법으로 또는 추가적으로, 인간화 항체는 친화도를 증가시켜 그의 친화성 및(또는) 기타 생물학적 활성을 더 향상시키거나 개선시킬 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0205] 실시예 1: HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 제조 및 효능
- [0206] 재료 및 방법
- [0207] 항-ErbB2 모노클로날 항체:
- [0208] ErbB2의 세포외 도메인에 특이적인 항-ErbB2 IgG<sub>1</sub>  $\kappa$  무린 모노클로날 항체 4D5는 문헌 (Fendly et al., Cancer Research 50: 1550-1558 (1990) and W089/06692)에 기재된 바와 같이 생산되었다. 요약하면, 문헌 (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84: 7159 (1987))에 기재된 바와 같이 생산된 NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> 세포 (세포 당 대략  $1 \times 10^5$  ErbB2 분자를 발현함)를 25 mM EDTA가 함유된 인산염 완충 생리수 (PBS)로 수거하고 BALB/c 마우스를 면역화시키는 데 사용하였다. 0주, 2주, 5주 및 7주에 0.5 ml PBS 중의  $10^7$  세포를 마우스에게 복강내 주사하였다. 9주 및 13주에, <sup>32</sup>P-표지 ErbB2를 면역침전시키는 항혈청을 갖는 마우스에게 소맥아 응집소-세파로스 (WGA)에 의해 정제된 ErbB2 막 추출물을 복강내 주사하였다. 이어서, ErbB2 시료 0.1 ml를 정맥내 주사하고, 비장세포를 마우스 골수종 세포주 X63-Ag8.653과 융합시켰다. ELISA 및 방사선면역침전법에 의해 하이브리도마 상등액을 ErbB2-결합에 대해 스크리닝하였다. MOPC-21 (IgG1) (Cappel1, Durham, NC)를 이소타입-매치 컨트롤로 사용하였다.
- [0209] 무린 4D5 항체 ((HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체)의 인간화 버전으로 처리하였다. 상기 인간화 항체는 무린 4D5 항체의 상보성 결정 영역을 컨센서스 인간 이뮤노글로불린 IgG<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>)의 골격에 삽입하여 제조하였다 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]). 생성된 인간화 항-ErbB2 모노클로날 항체는 p185<sup>HER2</sup>에 대해 높은 친화성을 갖고 (딜로히에이션 (Dilohiation) 상수 [ $K_d$ ] =0. 1 nmol/L), 시험관내 및 인간 이종이식조직에서 고농도의 p185<sup>HER2</sup>를 함유하는 유방암 세포의 성장을 현저하게 억제하고, 항체-의존성 세포독성 (ADCC)를 유도하고, 선행 치료법을 많이 받은 ErbB2 과발현 전이성 유방암 환자에서 단일 약제로서 임상적으로 활성적인 것으로 밝혀져 있다. HERCEPTIN(등록상표) 항-ErbB2 항체는, 배양 배지 내로 항체를 분비하는, 대규모로 성장된 유전적으로 조작된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주에 의해 생산된다. 상기 항체는 표준 크로마토그래피 및 여과 방법을 이용하여 CHO 배양 배지로부터 정제한다. 본 연구에 사용된 많은 각 항체를 분석하여 항체를 동정하고 그의 순도 및 효능을 검증하였을 뿐만 아니라, 멸균성 및 안전성에 대한 식품의약 안정성의 요구조건을 충족시켰다.
- [0210] 자격 기준:
- [0211] 환자는 하기 기준을 모두 충족시켜야 연구 대상으로서 자격이 있다:
- [0212] -전이성 유방암
- [0213] -ErbB2 (HER2) 은코진 (면역조직화학 또는 형광 제자리 혼성화 (FISH)에 의해 측정될 때 2+ 내지 3+)의 과발현. [ErbB2의 종양 발현은 문헌 (Slamon et al., [1987] and [1989])에 이미 기재된 바와 같이 환자의 파라핀-아침

종양 블록으로부터 제조된 박편 세트의 면역조직화학 분석에 의해 측정될 수 있다. 사용되는 주요 검출 항체는 치료에 사용되는 인간화 항체와 동일한 CDR을 갖는 뮤린 4D5 MAb이다. 종양은 25% 이상의 종양 세포가 p185<sup>HER2</sup>에 대한 특징적 막 염색을 나타내는 경우 ErbB2를 과발현하는 것으로 생각된다].

- [0214] -방사선촬영 수단, 물리적 검사 또는 사진에 의해 이차원적으로 측정가능한 질환 (용해성 골 손상을 포함함)
- [0215] 측정가능한 질환은 물리적 검사, X-선 (평범한 필름), 전산화 단층촬영술 (CT), 자기 공명 영상술 (MRI), 초음파 또는 사진에 의해 두 가지 수직 직경으로 재현가능하게 측정할 수 있는 임의의 종괴 (mass)로서 정의되었다.
- [0216] 골모세포 전이, 흉막유출 또는 복수증은 측정가능한 것으로 간주되지 않았다. 측정가능한 병소는 최대 치수가 1 cm 이상이어야 한다. 전이성 질환의 평가가능한 부위의 수 및 평가가능한 부위 (예컨대, 폐)에서의 병소 수를 적합한 케이스 보고 형식 (CRF, Case Report Form)으로 기록해야 했다. 다수의 폐 및 간 병소가 존재하면, 부위 당 6개의 가장 큰 병소가 존재하였다.
- [0217] -공식 서면 동의서에 서명하는 것을 이해하고 서명할 의지를 갖는 능력
- [0218] -18세 이상의 여성
- [0219] -혈액, 신장, 간 및 대사 기능의 실험실 평가를 스크리닝함에 의해 입증된 부수적인 세포독성 화학요법을 수용하기에 적합한 후보.
- [0220] 제외 기준:
- [0221] 하기 임의의 자격을 갖는 환자는 본 연구에서 제외하였다:
- [0222] -전이성 유방암에 대한 선행 세포독성 화학요법
- [0223] -보조 셋팅에서 전이성 질환 또는 세포독성 치료법에 대해 선행 호르몬 치료법 (예컨대, 타목시펜)을 받을 수 있는 환자
- [0224] -치료받지 않은 부수적인 악성종양
- [0225] -카르노프스키 (Karnofsky) 기준 상 60% 미만의 수행 상태
- [0226] -임신 또는 간호 여성; 연구자에 의해 확인된 효과적인 피임법을 이용하지 않는 한 임신할 가능성이 있는 여성
- [0227] -양측성 유방암 (두 가지 주요 종양이 2+ 내지 3+의 HER2 과발현을 갖어야 하거나, 전이성 부위가 2+ 내지 3+의 HER2 과발현을 갖어야 함)
- [0228] -본 연구에 들어가기 30일 전에 연구중이거나 허가되지 않은 약제의 사용
- [0229] -뇌로의 임상적으로 불안정하거나 치료받지 않은 전이 (예를 들어, 방사선 요법을 필요로 함)
- [0230] 상기 기준을 기초로 하여, 469명의 환자를 선택하여 본 연구에 등록시켰다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 절반수의 환자 (화학요법에 의해 나누어짐)에게 무작위로 투여하였다 (하기 참조).
- [0231] <투여 및 용량>
- [0232] 항-ErbB2 항체
- [0233] 0일, 4 mg/kg 용량의 인간화 항-ErbB2 항체 ((HERCEPTIN (등록상표), H)를 90분에 걸쳐 정맥내 투여하였다. 연구를 시작한 지 7일째에, 2 mg/kg의 항체를 환자에게 90분에 걸쳐 매주 정맥내 투여하였다.
- [0234] 화학요법
- [0235] 환자들은 최소 6 주기 동안 두 가지 화학요법 중 하나를 받았고, 단, 그들의 질환은 진행되지 않았다: a) 환자들이 보조 치료법으로서 안트라사이클린 요법을 받지 않은 경우, 시클로포스프아미드 및 독소루비신 또는 에피루비신 (AC), 또는 b) 환자들이 보조 치료법으로서 임의의 안트라사이클린 요법을 받는 경우, 파클리탁셀 (T, TAXOL (등록상표)). HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 초기 투여를 24시간 내에 화학요법의 제1 주기에 앞서 수행하였다. 초기 투여량의 상기 항체에 대한 내성이 좋으면, 화학요법을 투여하기 바로 전에 상기 항체의 후속 투여량을 투여하였다. 초기 투여량의 항체에 대한 내성이 좋지 않으면, 화학요법 투여에 앞서 24시간 내에 후속 관주를 계속 수행하였다. 환자가 치료 효과를 계속 받고 있다는 치료 의사의 의견이 있으면 환자는

6 주기를 초과하는 화학요법을 계속 받았다.

- [0236] 시클로포스프아미드 (600 mg/m<sup>2</sup>)를 최소 3분에 걸쳐 정맥내로 주입하거나 최대 2시간에 걸쳐 관주하였다.
- [0237] 연구소 프로토콜에 따라 독소루비신 (60 mg/m<sup>2</sup>) 또는 에피루비신 (75 mg/m<sup>2</sup>)을 최소 3 내지 5분에 걸쳐 정맥내로 서서히 주입하거나 최대 2시간에 걸쳐 관주하였다.
- [0238] 175 mg/m<sup>2</sup>의 투여량의 파클리탁셀 (TAXOL (등록상표))을 3시간에 걸쳐 정맥내 투여하였다. 파클리탁셀이 투여된 모든 환자에게 파클리탁셀을 투여하기 12시간 및 6시간 전에 텍사메타손 (또는 그의 등가물)을 미리 경구 투여하고, 파클리탁셀을 투여하기 30분 전에 디펜히드라민 (또는 그의 등가물) 50 mg을 정맥내 투여하고, 파클리탁셀을 투여하기 30분 전에 디메티딘 (또는 다른 H<sub>2</sub> 차단제) 300 mg을 정맥내 투여하였다.
- [0239] <반응 기준>
- [0240] 진행성 질환: 임의의 측정가능한 병소에서 25% 이상의 증가가 있다는 객관적 증거.
- [0241] 진행성 질환은 새로운 병소가 나타나는 경우도 포함한다. 골 병소의 경우, 진행성은 평범한 필름, CT, MRI에 의한 객관적인 측정시 25% 증가; 골절에 의한 것이 아닌, 증상을 나타내는 신규 병소; 또는 경감성 방사선요법에 대한 필수요건으로서 정의된다.
- [0242] 완전 반응: 최소 4주 동안 방사선촬영 및(또는) 육안 모두에 의해 관찰되는 종양이 사라짐. 피부 및 흉벽의 완전 반응은 부검에 의해 확인해야 했다.
- [0243] 부분 반응: 최소 4주 동안 모든 측정가능한 병소의 수직 직경의 합이 50% 이상 감소. 새로운 병소가 나타나지 않을 수 있고 임의의 병소의 크기가 커지지 않을 수도 있다.
- [0244] 작은 반응: 모든 측정가능한 병소의 수직 직경의 합이 25% 내지 49% 감소.
- [0245] 새로운 병소가 나타나지 않을 수 있고, 임의의 병소의 크기가 커지지 않을 수도 있다.
- [0246] 안정한 질환: 측정가능한 병소의 크기에서 25%를 초과하는 변화가 없음.
- [0247] 병소가 나타나지 않을 수 있다.
- [0248] 시간 대 질환 진행 (TTP)를 치료의 초기부터 치료를 진행하는 동안 계산하였다. 반응률에 대한 신뢰 한계는 단일 비율에 정확한 방법을 이용하여 계산하였다 (Fleiss, JL, Statistical Methods for Rates and Proportions (ed2), New York, NY, Wiley, 1981, pp 13-17).

[0249] 결과

[0250] 10.5개월의 중간 조사에서, 시간 대 질환 진행 (TTP) 및 반응률 (RR)의 측정은 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체에 의한 화학요법 효과의 상당한 증가를 보였지만 전체적으로 심각한 부작용(AE)을 증가시키지는 않았다.

**표 1**

[0251]

	HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 효능			
	등록	TTP (월)	RR (%)	AE (%)
CRx	234	5.5	36.2	66
CRx + H	235	8.6*	62.00**	69
AC	145	6.5	42.1	71
AC + H	146	9.0	64.9	68
T	89	4.2	25.0	59
T + H	89	7.1	57.3	70

[0252] \* 로그-랭크 시험에 의한 p < 0.001; \*\* X<sup>2</sup> 시험에 의한 p < 0.01; CRx: 화학요법; AC: 안트라사이클린/시클로포스프아미드 치료; H: HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체; T: TAXOL (등록상표)

[0253] AC+H (18% 등급 3/4)의 병용 치료법을 이용한 경우, 안트라사이클린을 사용한 경우 관찰된 것과 유사한 심근 기능부전 증후군이 AC 단독 (3%), T (0%) 또는 T+H (2%)를 사용하는 경우보다 더 많이 보고되었다.

[0254] 이들 데이터는 항-ErbB2 항체 치료와 화학요법을 병행하면 반응률 및 질환 진행의 평가에 의해 측정된 임상적인 효과가 매우 증가된다는 것을 의미한다. 그러나, 독소루비신 또는 에피루비신의 증가된 심 부작용으로 인해, 안트라사이클린과 항-ErbB2 항체 요법의 병용은 허용되지 않는다. 위험 및 효과를 고려할 때, 병용 치료법이 필요한 경우 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체와 파클리탁셀 (TAXOL (등록상표))로의 치료법이 좋다.

[0255] 실시예 2: 항-ErbB2 항체 (HERCEPTIN (등록상표))의 약역학 및 약동학적 성질

[0256] HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 실시예 1에 기재된 기준에 따라 선별된 인간 환자에게 정맥내 관주에 의해 투여하였다. 4 mg/kg HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 초기 투여량을 정맥내 관주에 의해 전달한 후, 여러 주 동안 매주 2 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 정맥내 관주하였다. 2백 13명의 환자가 이 치료법을 시작하였고 신속히 진행되는 질환을 갖는 환자의 선별적인 탈락이 일어날 때 90명의 환자보다 더 적은 환자에 대해 8주를 초과하는 기간 동안 혈청 약물 농도를 얻었다. 치료를 개시한 213명의 환자 중, 12주에 80명, 16주에 77명, 20주에 44명, 24주에 51명, 28주에 25명, 32주에 23명, 그리고 36주에 37명 에 대한 혈청 최소 농도 데이터를 얻을 수 있었다.

[0257] 0 내지 36주 동안의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 최소 혈청 농도

[0258] 2 내지 36주 동안 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 최소 혈청 농도 ( $\mu\text{l/ml}$ , 평균  $\pm$ SE)를 도 3 (어두운 원)에 작도하였다. 환자의 수는 매우 일정하였는데, 이는 신속히 진행되는 질환으로 인해 프로그램으로부터 탈락되는 환자의 데이터가 이 분석으로부터 제외되었기 때문이다. 최소 혈청 농도는 12주에 걸쳐 증가하는 경향이 있고 12주 후에는 변동이 거의 없는 경향이 있었다.

[0259] 1 내지 8주 동안의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 최소 및 피크 혈청 농도

[0260] 초기 환자 213명에 대한 몇몇 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 혈청 농도 데이터를 이용가능하였다. 첫번째 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 관주를 반영하는 최소 및 피크 혈청 농도 데이터는 212명의 환자 중 195명에 대해 이용가능하였다. 7번째 관주 동안, 212명의 환자 중 137명의 환자에 대한 최소 혈청 농도 데이터가 이용가능하였고, 212명의 환자 중 114명의 환자에 대한 피크 혈청 농도 데이터가 이용가능하였다. 표 2에는 초기 8주 치료 동안의 최소 및 피크 혈청 농도로부터 얻은 통계학적 요약이 기재되어 있다. 피크 샘플은 마지막 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 투여 후 즉시 얻었고; 최소 샘플은 후속 투여 (즉, 1주 후) 전에 얻었다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 혈청 농도는 본원에 개시된 바와 같이 측정하였다.

**표 2**

[0261] 치료 후 첫 8주 동안의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 최소 및 피크 혈청 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )

	주	n	평균	SD	최소	최대
피크	1	195	100.3	35.2	30.7	274.6
최소		195	25.0	12.7	0.16	60.7
피크	2	190	74.3	31.3	20.8	307.9
최소		167	30.4	16.0	0.2	74.4
피크	3	167	75.3	26.8	16.1	194.8
최소		179	33.7	17.9	0.2	98.2
피크	4	175	80.2	26.9	22.2	167
최소		132	38.6	20.1	0.2	89.4
피크	5	128	58.9	29.2	27.8	185.8
최소		141	42.1	24.8	0.2	148.7
피크	6	137	87.2	32.2	28.9	218.1
최소		115	43.2	24.0	0.2	109.9
피크	7	114	89.7	32.5	16.3	187.8
최소		137	48.8	24.9	0.2	105.2
피크	8	133	95.6	35.9	11.4	295.6

[0262] 표 2의 데이터는 시간에 따라 최소 혈청 농도가 증가함을 보여준다. 연구된 다수의 환자 중, 2 내지 8주 동안 최소 혈청 농도가 20  $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하지 않은 18명의 환자가 있었다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 최소

혈청 농도 20 µg/ml가 동물에서의 선행 약물학 연구 및 임상 시험에서의 실험 분석을 기초로 한 이들 연구를 위한 명목상의 목표이었다.

[0263] 환자 반응 상태를 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 혈청 농도에 대해 상대적으로 평가하였다. 이를 위해, 평균 혈청 농도 (최소 및 피크의 평균)를 다양한 시간 동안 다양한 환자 반응 상태에 대해 계산하였다 (여기서, 환자 반응 상태는 독립적인 반응 평가 위원회에 의해 결정되었음). 2주 내지 8주의 혈청 농도에서의 증가는 비반응자에서보다 반응자에서 더 높은 것으로 보였는데, 이는 반응 상태와 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 혈청 농도 사이에 관계가 있음을 암시한다. 반응 상태와 관련하여 2주에서의 최소 혈청 농도 값 및 7주와 8주의 평균치의 통계적 분석 (편차 분석)은 반응 상태와 7주 및 8주의 평균 최소 사이에 매우 유의한 관련성이 있음을 나타낸다 ( $p < 0.001$ ). 결과는 반응자의 최소 혈청 농도 (7주 및 8주의 평균 최소)와 비반응자 (7주 및 8주의 평균 최소)의 최소 혈청 농도 사이에 상당한 차이가 있음을 나타낸다: 반응자의 최소 농도는  $60 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ 인 반면, 비반응자의 최소 농도는  $44 \pm 25 \mu\text{g/ml}$ 이었다 (평균  $\pm$ SD). HER2 과발현 수준 및 전이 부위의 유형은 최소 혈청 농도에서의 상당한 차이와 관련되어 있었다. 2주째, 2+ HER2 과발현을 나타내는 환자는 3+ HER2 과발현 ( $n=155$ , 평균 = 24.1, µg/ml, SD = 13.1)을 나타내는 환자와 비교할 때 훨씬 더 높은 최소 혈청 농도 ( $n=40$ , 평균 = 28.8, µg/ml, SD = 10.4)를 보였다. 7주 및 8주 동안의 평균 최소 혈청 농도의 차이는 더 이상 통계학적으로 유의하지 못하였다. 또한, 2주째, 표재성 질환을 앓는 환자는 내장 질환을 앓는 환자의 최소 혈청 농도 ( $n=183$ , 평균 = 24.4, µg/ml, SD = 12.6)와 비교할 때 훨씬 더 높은 최소 혈청 농도 ( $n=12$ , 평균 = 34.1, µg/ml, SD = 12.0)를 나타내었다. 7주 및 8주 동안의 평균 최소 혈청 농도에서의 이러한 차이는 상당하였다. 이들 데이터는 2주와 7/8주 사이에 최소 혈청 농도의 상승이 다양한 질환 프로필을 갖는 인간 환자에서 일어남을 의미한다.

[0264] 유사하게 고안된 후속 연구에서, 인간 유방암 환자는 8 mg/kg의 로딩 투여량으로 치료받은 후 4 mg/kg의 유지량으로 매주 치료받았다. 이러한 예비 인간 연구의 결과는 8 mg/kg 로드:4 mg/kg 매주 유지 투여가 환자의 종양 부피를 감소시키는 데 효과적임을 의미한다.

[0265] 이 실시예에 개시된 데이터는 목표 혈청 농도에 더 빨리 도달되도록 하는 항체의 프론트 (front) 로딩이 개선된 결과와 관련되어 있을 수 있음을 의미한다.

[0266] 실시예 3: HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 환제 전달 및 피하 관주가 마우스에서 종양 부피를 효과적으로 감소시킨다.

[0267] 정맥내 주사 또는 피하 주사에 의한 인간화 항-ErbB2 항체 (HERCEPTIN (등록상표), 제조를 위해서는 실시예 1을 참조)의 관주 또는 환제 전달의 효능을 조사하였다. 연구 목적은 피하 전달이 실행될 수 있는지, 그리고 편리한 피하 환제 전달이 HER2 유전자를 과발현하는 세포주로 접종된 동물에서 전이성 유방암을 치료하는 데 유용한지를 알아보기 위함이었다. 하기에 상세히 기재된 바와 같이, 결과는 정맥내 관주, 피하 관주 및 환제 전달이 실행가능한 치료 방법이라는 것을 보여준다.

[0268] 종양 부피를 정맥내 환제 대 피하 관주의 함수로서 비교하는, 누드 마우스 이종이식 모델 [HER2 유전자를 자연적으로 과발현하는 인간 유방암 세포주 (BT-474 세포로부터 유래된 BT-474M1, ATCC 접근번호 HTB-20)가 도입된 것]에서의 연구를 다음과 같이 수행하였다. 첫번째 연구에서, 흉선이 제거된 7 내지 9주 된 누드 암컷 마우스를 타코닉 인크 (Germantown, NY)로부터 얻었다. 종양 발달을 개시하기 위해, 각 마우스를 매트리지겔 (Matrigel (상표명))에 현탁된  $3 \times 10^6$ 의 BT474M1 세포로 피하 접종하였다. 종양 결절의 부피가 대략  $100 \text{ mm}^3$ 에 도달할 때, 동물을 4개의 처리군으로 무작위로 나누었다. 군들을 표 3에 따라 처리하였다.

**표 3**

정맥내 환제와 피하 관주의 비교를 위한 동물 군 및 투여량

[0269]

군, 투여량, 항체	목표 혈청 농도 µg/ml	투여 경로	로딩 투여량 (mg/kg)	유지 투여량
1-대조군, rhuMAb E25	20	IV LD 및 SC 관주	2.20	0.250 mg/ml (관주물)
2-저투여량 SC rhuMAb HER2	1	IV LD 및 SC 관주	0.313	0.050 mg/ml (관주물)

3-고투여량 SC rhuMab HER2	20	IV LD 및 SC 관주	6.25	1.00 mg/ml (관주물)
4-IV 수회 투여량 rhuMab HER2	20 (최소)	IV LD 및 MD	4.00	2 mg/kg/주 (IV 환제)

[0270] 혈청 농도 = 혈청 중의 농도, LD = 로딩 투여량, MD = 유지 투여량

[0271] 관주물 농도는 Alzet (등록상표) 삼투압 미니펌프 (Alza Corp., Palo Alto, CA)를 이용하여 목표 혈청 농도에 도달하도록 계산하였음.

[0272] 이식된 종양 세포의 성장을 촉진하는 투여를 시작하기 9일 전, 피하 서방출형 에스트로겐 펠릿에 의해 동물을 에스트로겐에 노출시켰다. 처리를 시작하기 8일 전에 BT474M1 세포로 동물을 접종시키고 종양을 성장시켰다. 그 다음으로, 관련없는 항체 E25 (HER2 수용체에 특이적이지 않지만 모노클로날 IgG 클래스의 구성원임) 또는 표 3에 기재된 시험 항체 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체로 동물을 처리하였다. 피하 펌프 관주 또는 정맥내 환제 전달에 의해 HERCEPTIN (등록상표)의 목표 혈청 농도가 1 µg/ml 또는 20 µg/ml이 되도록 투여 수준을 선택하였다. 연구 군을 35일까지 치료하였다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 혈청 농도는 3 마리 마우스/군/시점을 이용하여 (군 4에 투여하기 바로 전에) 매주 측정하였다. 항-ErbB2 항체의 농도를 표준 기술을 포함하는 본원에 개시된 방법에 따라 측정하였다. 종양 부피는 투여를 시작하기 2일 전에 측정하고, 본 연구에서 6일 내지 35일 동안 주 당 2회 측정하고, 그의 데이터는 하기 표에 기재하였다. 종양을 3차원에서 측정하고 부피를 mm<sup>3</sup>으로 나타내었다. 효능은 비처리된 대조군 동물에 대한 시험 동물의 종양 부피의 통계학적 비교 (ANOVA)에 의해 측정하였다.

[0273] 표 4에 나타난 바와 같이, BT474M1 종양을 갖는 마우스를 기재된 투여법에 의해 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체로 처리한 결과 종양의 생장이 상당히 억제되었다. HERCEPTIN (등록상표)으로 처리된 모든 군은 대조군과 유사한 종양 성장 억제를 보였다.

**표 4**

피하 관주와 정맥내 환제 전달의 비교

[0274]

처리군	종양 부피 (mm <sup>3</sup> ), 35일, (n = 14)	종양 부피 (곡선 아래 면적) 6일 - 35일 (n = 13)	HERCEPTIN (등록상표) 혈청 농도 (µg/ml), 27일 (n=3)
대조군 피하 관주	764 ± 700	5650 ± 4700	4.16 ± 1.94
피하 관주 (저투여량)	80.6 ± 158	1610 ± 1250	2.11 ± 1.74
피하 관주 (고투여량)	31 ± 75.6	1440 ± 1140	22.1 ± 5.43
정맥내 환제 투여*	49.7 ± 95.7	2150 ± 1480	21.7 ± 17.1**

[0275] 피하 = 피하 전달; 정맥내 = 정맥내 전달.

[0276] \* 4.0 mg/kg의 로딩 투여량 및 2.0 mg/kg/주의 유지 투여량

[0277] \*\* 투여전 (유지 투여량 직전의 최소 혈청 농도)

[0278] 상기 표에 기재된 결과는 대략 2 µg/ml의 혈청 농도의 유지가 본 연구에서 20 µg/ml의 농도만큼 효과적임을 의미한다. 상기 결과는 피하 관주에 의한 투여가 정맥내 환제 투여만큼 효과적이고 유사한 최소 혈청 농도를 달성한다는 것을 의미한다. 또한, 상기 결과는 연구된 투여 수준이 이 모델에서 투여량-반응 곡선의 상부에 있고 피하 투여가 유방암 종양의 치료에 효과적이라는 것을 의미한다. 따라서, 유지 투여량의 피하 투여는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 치료법의 일부로서 실행가능하다.

[0279] 실시예 4: HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 정맥내 환제 및 피하 환제 전달이 마우스의 종양 부피를 효과적으로 감소시킨다.

[0280] 피하 환제 전달은 환자, 및 건강을 돌보는 전문가에게 편리하고 비용면에서 경쟁적이다. 본 실시예에 개시된 연구의 결과는 피하 환제 전달이 마우스에서 유방암 종양의 크기를 감소시키는 데 있어서 정맥내 환제 전달만큼 효과적임을 의미한다.

[0281] 본 연구는 정맥내 환제 전달과 피하 관주 전달의 비교를 위한 실시예 3에서 본원에 개시된 바와 같이 설정하였다. 서방출 에스트로젠 이식체를 실시예 3에 기재된 바와 같이 종양 세포 접종 하루 전에 피하 삽입하였다. 종양 세포 접종 6일 후, 초기 종양 측정을 수행하였다. 종양 세포 접종 7일 후, 제1 투여량의 대조구 항체 또는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 전달하였다. 동물군, 전달 타입, 로딩 투여량 및 유지 투여량은 표 4에 기재되어 있다. 4주 동안 매주 1회씩 동물에게 투여하였다.

**표 5**

[0282] 정맥내 환제 전달과 피하 환제 전달의 비교를 위한 동물군 및 투여량

군	투여 경로	로딩 투여량 (mg/kg)	유지 투여량 (mg/kg/주)	n
1-대조군 rhuMab E25	IV	8	4	10
2-rhuMab HER2	IV	2	1	10
3-rhuMab HER2	IV	4	2	10
4-rhuMab HER2	IV	8	4	10
5-rhuMab HER2	SC	4	2	10

[0283] IV = 정맥내; SC = 피하; n = 군 당 동물의 수

[0284] 표 4에 기재된 정보에 따라 실시예 3에 기재된 기술을 이용하여 마우스를 처리하였다. HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 혈청 농도는 표준 기술을 이용하여 본원에 기재된 방법에 따라 매주마다 정맥내 유지 투여량을 투여하기 전에 매주 측정하였다. 대조구 E25 항체 혈청 농도를 표준 면역분석 기술에 따라 측정하였다. 표 6은 시간에 따른 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 혈청 농도의 증가를 보여준다.

**표 6**

[0285] 정맥내 환제 전달 대 피하 환제 전달: 혈청 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체 농도 (혈청 농도, µg/ml)

처리군 (전달, MD)	0일 평균 (SD)	7일 평균 (SD)	14일 평균 (SD)	21일 평균 (SD)
1-대조군 rhu MAb E35 (IV, 4 mg/kg)	0 (0)	25.9 (8.29)	34.6 (11.2)	38.5 (14.4)
2-rhu MAb HER2 (IV, 1 mg/kg)	0 (0)	4.96 (3.79)	8.55 (5.83)	8.05 (4.67)
3-rhu MAb HER2 (IV, 2 mg/kg)	0 (0)	13.4 (9.24)	18.9 (12.0)	22.6 (9.21)
4-rhu MAb HER2 (IV, 4 mg/kg)	0 (0)	29.6 (13.5)	37.7 (14.4)	46.2 (13.8)
5-rhu MAb HER2 (SC, 2 mg/kg)	0 (0)	12.5 (7.33)	16.9 (10.2)	17.6 (10.7)

[0286] 0, 7 및 14일의 시점에 대해서는 n=10; 21일에 대해서는 N=9.

[0287] 표 7은 표 6에 기재된 혈청 항체 농도를 갖는 군 1-5에 대한 정맥내 환제 전달 및 피하 환제 전달의 상대적인 효능을 보여 준다. 본 연구의 경우, 종양 부피의 감소로서 효능을 측정하였다. 종양 부피를 매주 2회 측정하였다.



표 7

[0288] 정맥내 환제 전달과 피하 환제 전달을 비교하는 종양 부피에서의 변화로서 측정되는 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 효능, 평균 (SD)

처리군 (전달, MD)	종양 부피 6일, mm <sup>3</sup>	종양 부피 28일, mm <sup>3</sup>	종양 부피 31일, mm <sup>3</sup>	6-31일* 곡선 아래의 면적 종양 부피, mm <sup>3</sup>	로그 (TM + 1) 상 의 종양 성장률
1-IV 대조군	321 (190)	1530 (1040)	1630 (1170)	13600 (7230)	0.0660 (0.0200)
2-IV HERCEPTIN 1 mg/kg	297 (130)	175 (215)	151 (188)	4690 (1400)	-0.0505 (0.142)
3-IV HERCEPTIN 2 mg/kg	269 (129)	75.7 (92.4)	73.6 (84.5)	3510 (1220)	-0.0608 (0.110)
4-IV HERCEPTIN 4 mg/kg	272 (117)	25.3 (75.9)	25.8 (72.9)	2880 (1230)	-0.0810 (0.0859)
5-SC HERCEPTIN 2 mg/kg	268 (117)	76.2 (98.8)	90.4 (105)	3230 (1440)	-0.0304 (0.104)

[0289] 각 데이터점에 대해 N = 10. TM = 종양 측정. IV = 정맥내. SC = 피하. MD = 유지 투여량. 종양 부피 = 종양 부피, mm<sup>3</sup>. \*측정 오차로 인해 제외된 17일.

[0290] 21일 내지 31일 로그 (TM + 1) 상에서 계산된 종양 성장률. 곡선 아래의 면적은 종양 부피 대 시간의 곡선 아래 면적임.

[0291] 도 4a 및 4b는 시간에 따른 종양의 변화를 나타내는 그래프 도면이고, 그 데이터 중 일부는 표 7에 기재되어 있다. 도 4a는 종양 부피 대 시간의 직선형 도면이다. 도 4b는 시험 점을 더욱 분명히 보이게 하는, 상기와 동일한 데이터의 반대수 도면이다. 표 7 및 도 4a와 4b에 기재된 데이터는 투여량-관련 반응이 HERCEPTIN-처리군 사이에 관찰되지 않는다고 하더라도 피하 환제에 의한 투여가 정맥내 투여만큼 효과적이고 유사한 최소 혈청 농도를 달성함을 나타낸다.

[0292] 실시예 5: 항-ErbB2 항체의 정맥내 및 피하 전달 투여법

[0293] 본 발명에 따라, 항-ErbB2 항체 (예컨대, HERCEPTIN (등록상표)) 전달 방법은 대략 4주 이하, 바람직하게는 3주 이하, 보다 바람직하게는 2주 이하, 가장 바람직하게는 1주 이하 (1일 이하를 포함함) 내에 목표 혈청 농도에 도달하도록 약물의 보다 많은 프론트 로딩을 포함한다. 본 발명에 따라, 이러한 초기 투여 후에 초기 투여량과 동일하거나 보다 적은 양의 후속 투여량에 의해 목표 혈청 농도를 유지하는 투여를 수행한다. 본 발명의 방법의 장점은 유지 투여의 빈도가 보다 적을 수 있고 유지 투여가 피하 주사에 의해 전달될 수 있으므로, 본 발명의 치료법은 환자, 및 항체를 투여하는 의학 전문가에게 편리하고 경제적인 방법이다. 또한, 피하 유지 투여법은 환자의 화학요법이 정맥내 주사에 의한 다른 약물의 전달을 필요로 하는 경우 정맥내 투여 (예컨대, 관주)에 의해 중단될 수 있다.

[0294] 하기 투여법을 시험하기 위해, 인간 환자를 상기 실시예 1에 개시된 기준에 따라 선별하였다. 초기 투여 횟수는 대략 4주 이하, 바람직하게는 3주 이하, 보다 바람직하게는 2주 이하, 가장 바람직하게는 1주 이하 (1일 이하를 포함함) 내에 효능이 있는 목표 혈청 농도에 도달하기에 충분한 1회 이상이다. 유지 투여 횟수는 질환이 증상의 억제, 예컨대, 종양 부피의 감소를 달성하기에 충분한 1회 이상일 수 있다. 유지 투여량은 보다 많은 프론트 로딩을 제공하는 투여법에 의해 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 투여하는 본 발명의 목적과 일치하는 초기 투여량과 동일하거나 초기 투여량보다 적다. 본원에 개시된 특정한 약물 전달법은 본 발명을 대표하는 것이지만 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0295] 한 시험에서, 6 mg/kg, 8 mg/kg 또는 12 mg/kg의 초기 투여량의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 정맥내 또는 피하 주사에 의해 인간 환자에게 전달한다. 초기 투여량 (로딩 투여량)은 정맥내 관주, 환제 주사 또는 바람직하게는 피하 환제 주사에 의해 전달한다. 바람직하게는, 대략 10-20 µg/ml의 HERCEPTIN (등록상표) 항-

ErbB2 항체의 목표 최소 혈청 농도는 (치리군에서 모든 환자에 대하여 평균을 낸 것) 달성되고 초기 투여량과 같거나 보다 적은 항-ErbB2 항체의 후속 투여량에 의해 유지된다. 한 방법에서, 목표 최소 혈청 농도는 2 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 8주 이상 동안 정맥내 또는 피하 주사에 의해 주 당 1회씩 전달함으로써 달성하고 유지된다. 별법으로, 이러한 방법 또는 본원에 개시된 임의의 투여법의 경우, 피하 펌프에 의한 피하 연속 관주는 후속 유지 투여량을 전달하는 데 사용된다.

- [0296] 또 다른 방법에서, 초기 (프론트 로딩) 투여량 8 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체는 정맥내 주사 (관주 또는 환제 주사) 또는 피하 환제 주사에 의해 전달한다. 이러한 전달 후 3주 간격으로 6 mg/kg을 정맥내 환제 주사, 정맥내 관주, 피하 관주 또는 피하 환제 주사하여 전체 치리군의 평균 최소 혈청 농도를 대략 10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유지한다.
- [0297] 또 다른 방법에서, 초기 (프론트 로딩) 투여량 12 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체는 정맥내 주사 (관주 또는 환제 주사) 또는 피하 환제 주사에 의해 전달한다. 이를 수행한 후 3주 간격으로 6 mg/kg을 정맥내 환제 주사, 정맥내 관주, 피하 관주 또는 피하 환제 주사하여 전체 치리군의 평균 최소 혈청 농도를 대략 10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유지한다.
- [0298] 또 다른 방법에서, 초기 (프론트 로딩) 투여량 8 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체는 정맥내 관주 또는 환제 주사, 또는 바람직하게는 피하 환제 주사 또는 관주에 의해 전달한다. 이를 수행한 후 주 당 8 mg/kg 또는 2-3주 당 8 mg/kg을 투여하여 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 평균 최소 혈청 농도를 대략 10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유지한다. 유지 투여량은 정맥내 관주 또는 환제 주사, 바람직하게는 피하 관주 또는 환제 주사에 의해 전달한다.
- [0299] 또 다른 방법에서, 프론트 로딩 초기 투여량은 예를 들어, 1일, 2일 및 3일 각각에 각 주사 당 1 mg/kg 이상의 정맥내 또는 피하 연속 주사이고 (여기서, 총 초기 주사에 의해 전달되는 항-ErbB2 항체의 양은 4 mg/kg를 초과함), 이어서 3주 마다 1회씩 6 mg/kg의 유지 투여량을 주사하여 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 목표 최소 혈청 농도 (예를 들어, 대략 10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 유지한다. 유지 투여량은 정맥내 관주 또는 환제 주사에 의해, 또는 피하 관주 또는 피하 환제 주사에 의해 전달한다.
- [0300] 또 다른 방법에서, 프론트 로딩은 5일 연속 매일 1 mg/kg 이상, 바람직하게는 4 mg/kg을 정맥내 관주한 후 질환의 증상을 억제하기에 충분한 빈도로 이러한 주기를 반복함으로써 달성된다. 환자의 내성이 있는 경우, 초기 투여량에 이은 후속 투여량은 피하 주사 또는 환제 주사에 의해 전달할 수 있다. 이러한 피하 전달은 환자, 및 건강을 돌보는 전문가에게 편리하고 경제적이다.
- [0301] 또 다른 방법에서, HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체는 3주 동안 주 당 2회 이상의 정맥내 관주에 의해 먼저 전달한 후, 효능이 있는, HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 최소 혈청 농도를 유지하기 위해 이러한 주기를 반복한다. 투여량은 4 mg/kg 이상, 바람직하게는 5 mg/kg 이상의 항-ErbB2 항체이다. 유지 약물 전달은 정맥내 또는 피하 전달일 수 있다.
- [0302] 동물 또는 환자가 초기 투여 동안 또는 초기 투여 후 상기 항체에 내성을 보이는 경우, 후속 투여량의 전달은 피하 전달일 수 있으므로, 환자 또는 건강을 돌보는 전문가에게 보다 더 편리하고 경제적이다.
- [0303] 동물 연구에서, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 전달되는 4 mg/kg를 초과한, 바람직하게는 5 mg/kg을 초과한 초기 투여량에 이어 주 당 2회씩 (3일 간격으로) 2 mg/kg의 피하 환제 주사를 투여하여 대략 10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최소 혈청 농도를 유지한다. 또한, 동물 또는 환자가 상기 항체에 대해 내성을 보이는 것으로 알려져 있는 경우, HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 초기 투여량은 임의로 그리고 바람직하게는 피하 환제 주사 후 피하 유지 주사에 의해 전달할 수 있다.
- [0304] 목표 혈청 농도가 동물 연구와 인간 임상 시험을 비교하기 위한 목적으로 본원에 개시되어 있지만, 임상 시험에 사용되는 목표 혈청 농도는 다를 수 있다. 본원에 제공된 개시내용은 사용자가 효능이 있는 목표 최소 혈청 농도를 제공하는 프론트 로딩 약물 전달 방법을 선별할 수 있게 한다.
- [0305] 본원에 개시된 본 발명의 방법은 임의로 화학요법제 (안트로시클린 유도체 이외의 것)와 함께 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체를 전달하여 질환의 증상을 억제하는 것을 포함한다. 화학요법제는 다양한 투여 스케줄에 따라 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체와 함께 또는 따로 전달할 수 있다. 예를 들어, TAXOL (등록상표)과 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 피하 전달은 본 발명에 포함된다. 또한, 3주마다 8 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의 정맥내 또는 피하 주사에 이은 6 mg/kg의 HERCEPTIN (등록상표) 항-ErbB2 항체의

정맥내 또는 피하 주사를 화학요법제, 예컨대, 탁소이드 (예를 들어, 3주마다 175 mg/m<sup>2</sup>의 파클리탁셀) 또는 안트라사이클린 유도체 (예를 들어, 3주마다 독소루비신 60 mg/m<sup>2</sup> 또는 에피루비신 75 mg/m<sup>2</sup>)와 함께 투여한다. 임의로, 안트라사이클린 유도체가 투여되는 경우, 심장보호제 (예컨대, 3주마다 600 mg/m<sup>2</sup>의 시클로포스프아미드)도 투여한다. 또 다른 병용요법에서, 항-ErbB2 항체는 4 mg/kg을 초과한, 보다 바람직하게는 5 mg/kg을 초과한, 가장 바람직하게는 8 mg/kg 이상의 로딩 투여량으로 투여한다. 로딩 투여량에 이어 매주 2 mg/kg 이상, 바람직하게는 3주마다 6 mg/kg의 유지 투여량을 투여한다. 병용요법은 항-ErbB2 항체로 치료하는 동안 탁소이드를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에 따라, 탁소이드는 파클리탁셀이고 주 당 70-100 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 투여된다. 본 발명의 다른 실시양태에 따라, 탁소이드는 도세탁셀이고 주 당 30-70 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 투여된다.

[0306] 실시예 6: 파클리탁셀과 함께 3주마다 정맥내로 투여된 HERCEPTIN (등록상표)

[0307] 현재, HERCEPTIN (등록상표)의 권장 투여량은 주 당 1회씩 2 mg/kg이다. 환자는 파클리탁셀 (3주마다 175 mg/m<sup>2</sup>)과 함께 매주 대신 3주마다 HERCEPTIN (등록상표)을 투여받을 것이다. 제안된 치료 방법의 시뮬레이션은 최소 혈청 농도가 이전의 HERCEPTIN (등록상표) IV 임상 시험으로부터 얻은 목표 최소 혈청 농도의 범위 (10-20 mcg/ml) 내에 있는 17 mcg/ml일 것이다. 첫 12명 환자의 PK 파라미터를 조사한 후, 노출이 부적당하다고 느껴지면, 남은 12명의 환자에 대하여 3주마다 8 mg/kg까지 투여량을 증가시킬 것이다.

[0308] 포함 기준

- [0309] 1) 18세 이상의 여성
- [0310] 2) 조직학적으로 확인된 ErbB2 과발현 전이성 유방암
- [0311] 3) 전이성 질환으로 새로 진단받은 환자
- [0312] 4) 70%를 넘는 카르노프스키 수행 상태를 갖는 것
- [0313] 5) 임의의 연구 특정 스크리닝 방법에 앞서 환자가 손해를 받지 않으면서 언제든지 연구에서 빠질 수 있는 권리를 갖는 것을 이해하는 공식 서면 동의서.

[0314] 제외 기준

- [0315] 1) 임신 또는 수유 여성.
- [0316] 2) (1) 외과수술로 불임 상태가 되거나 (2) 경구 피임, 자궁내 장치, 또는 살정자성 젤리와 함께 사용되는 차단 피임법을 이용하지 않는 한 임신할 가능성이 있는 여성.
- [0317] 3) CNS 전이의 임상적 또는 방사선적 증거.
- [0318] 4) 임의의 심장 질환의 병력
- [0319] 5) LVEF ≤50%
- [0320] 6) 임의의 치료 세팅에서 선행 탁산 요법이 없음.
- [0321] 7) 하기 비정상적인 기준 혈액값 중 임의의 것:

[0322] - 9 g/dl 미만의 Hb

[0323] -  $3.0 \times 10^9/l$  미만의 WBC

[0324] -  $1.5 \times 10^9/l$  미만의 과립구

[0325] -  $100 \times 10^9/l$  미만의 혈소판

[0326] 8) 하기 비정상적인 기준 간 기능 시험 중 임의의 것:

[0327] - 1.5 x ULN (정상적인 상한선)을 초과하는 혈청 빌리루빈

[0328] - 2.5 x ULN (간 또는 골 전이의 경우 4.0 x ULN을 초과함)보다 더 높은 ALT 및(또는) AST

- [0329] - 2.5 x ULN (간 또는 골 전이의 경우 4.0 x ULN을 초과함)보다 더 높은 알칼리성 포스페타제
- [0330] 9) 하기 비정상적인 기준 신장 기능 시험:
- [0331] - 1.5 x ULN보다 더 높은 혈청 크레아티닌
- [0332] 10) 연구에 참여한 환자에게 방해가 되는 다른 심각한 의학적 증상의 병력.
- [0333] HERCEPTIN (등록상표) 로딩 투여량 및 스케줄: 첫번째 투여의 경우 8 mg/kg. 유지 투여량 및 스케줄: 3주마다 6 mg/kg.
- [0334] 파클리탁셀 - 3시간 관주로 3주마다 175 mg/m<sup>2</sup>
- [0335] 주의: 첫번째 치료 주기에서, 파클리탁셀을 HERCEPTIN (등록상표) 투여 8시간 전에 투여하여 파클리탁셀 단독의 PK를 측정한다. HERCEPTIN (등록상표)은 첫번째 주기의 경우에만 파클리탁셀 투여 8시간 후에 투여한다. 후속 치료 주기에서, HERCEPTIN (등록상표)는 파클리탁셀 투여 전에 투여한다.
- [0336] 본 연구의 총 기간은 18주이다. 연구 대상자는 총 6회 이하의 HERCEPTIN (등록상표) 투여를 받는다. 마지막 대상자가 마지막 주기의 파클리탁셀을 투여받은 후, 안정성 및 약물동력학적 분석에 대한 데이터 수집을 멈추고, 본 연구를 프로토콜로 구체화된 치료법으로 완성한다. 연구 대상자는 연구원의 판단에 따라 HERCEPTIN (등록상표) +/- 파클리탁셀을 계속 투여받을 수 있다.
- [0337] HERCEPTIN (등록상표)이 드문 빈도로 환자에게 투여된다 하더라도 상기 치료 방법은 전이성 유방암을 치료하는데 효과적일 것이라고 생각된다.
- [0338] 본원에 상세히 개시된 본 발명의 특정한 측면 및 실시양태는 본원에서 상기한 바와 같은 목적을 충분히 얻을 수 있고 상술한 장점을 제공할 수 있지만, 이러한 특정 측면 및 실시양태가 본 발명의 바람직한 실시양태 중 일부를 단지 설명하는 것이지 첨부된 청구항에 기재된 것 이외의 방법 및 제품의 상세한 것을 제한하는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 명세서에서 모든 참조문헌의 개시내용은 명백히 본원에 포함되는 것으로 한다.

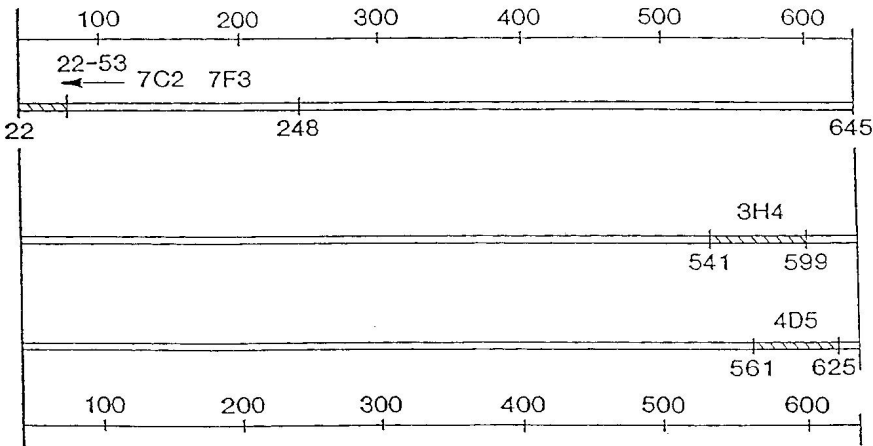
**수탁번호**

- [0339] 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)
- 수탁번호 : HB12215
- 수탁일자 : 19961017
  
- 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)
- 수탁번호 : HB12216
- 수탁일자 : 19961017
  
- 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)
- 수탁번호 : CRL10463
- 수탁일자 : 19900524
  
- 기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)
- 수탁번호 : HB12697
- 수탁일자 : 19990408

도면

도면1

3H4 aa 541-599  
 4D5 aa 529-625  
 7C2 aa 22-53  
 7F3 aa 22-53



3H4 에피토프 (서열:8) 58 잔기

VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVAR  
 | |  
 541 599

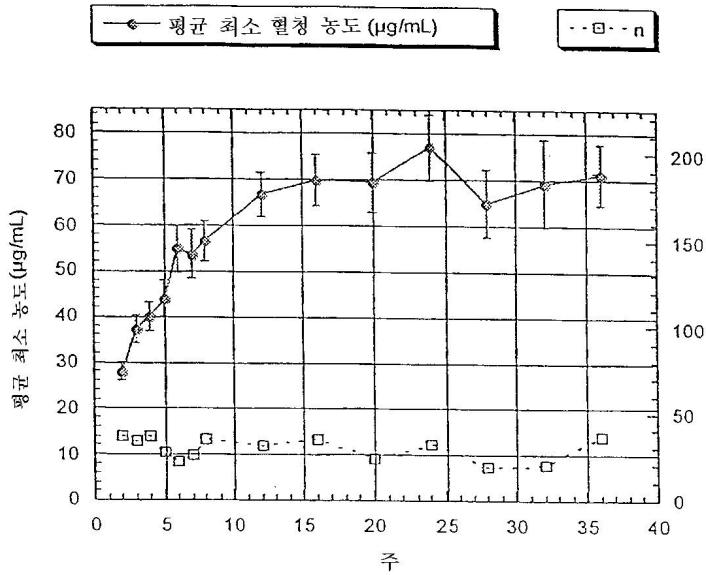
4D5 에피토프 (서열:9) 64 잔기

LPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQP  
 | |  
 561 625

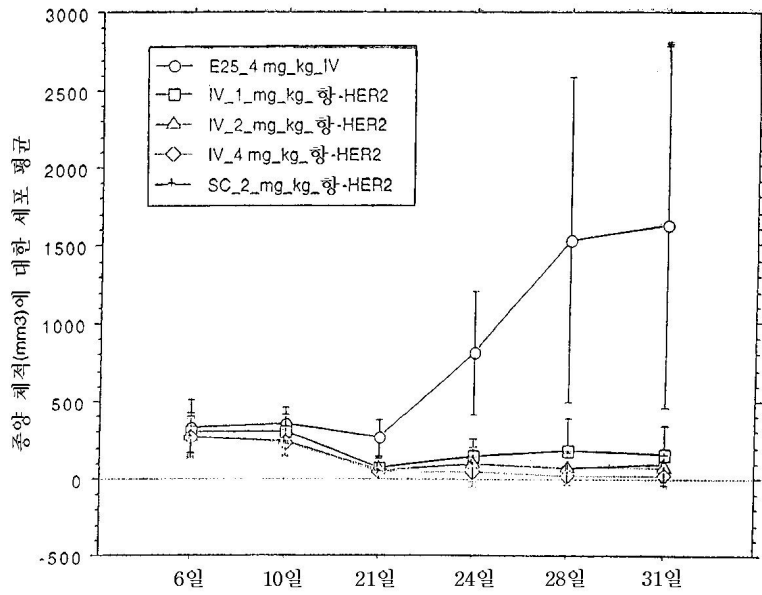
도면2

1 MELAALCRWGLLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPA  
 38 SPETHLDMLRHLYOGCOVVOGNLELTYLPTNASLSFL  
 75 ODIOEVOGYVLIAHNOVROVPLORLRIVRGTOLFEDN  
 112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEI  
 149 LKGGVLIORNPOLCYODTILWKDIFHKNNOLALTLID  
 186 TNRSRA

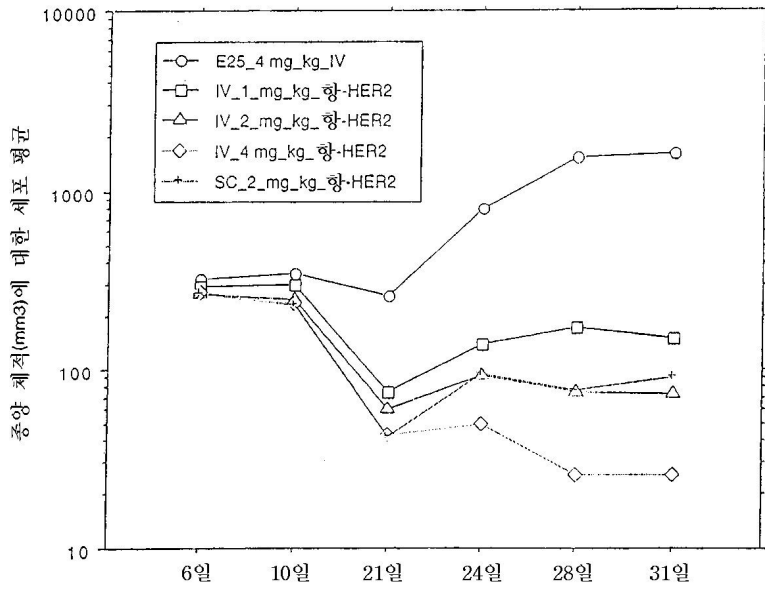
도면3



도면4a



도면4b



도면5a

Fig. 5A: 가변 경쇄

```

                10      20      30      40
2C4  DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
      **   **** *          *
574  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQRK
      *   ****          *   ** ***
hum κI DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISNYLA] WYQQRK

                50      60      70      80
2C4  GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQA
      **   * * * * * * * * * * * * * * * *
574  GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFLTITISSLQP
      *   **** * * * * *
hum κI GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFLTITISSLQP

                90      100
2C4  EDLAVYYC [QYYIYPYT] FGGGKLEIK (서열:10)
      * * * * * * * * * * * * * *
574  EDFATYYC [QYYIYPYT] FGQGTKVEIK (서열:12)
      * * * * * * * * * *
hum κI EDFATYYC [QYNSLPWT] FGQGTKVEIK (서열:14)
    
```

도면5b

Fig. 5B: 가변 중쇄

```

                10      20      30      40
2C4      EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS
          ** ** * * ** *
574      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA
          ** * *
hum III  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA

                50 a      60      70      80
2C4      HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM
          * * ** * ** * *
574      PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL
          ***** ** *
hum III  PGKGLEWVA [VISGDDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLYL

          abc      90      100ab      110
2C4      ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (서열:11)
          *** ** *
574      QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTILVTVSS (서열:13)
          *****
hum III  QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTILVTVSS (서열:15)
    
```