



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월26일

(11) 등록번호 10-1598229

(24) 등록일자 2016년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7019335

(22) 출원일자(국제) 2008년02월15일

심사청구일자 2013년02월15일

(85) 번역문제출일자 2009년09월16일

(65) 공개번호 10-2010-0014426

(43) 공개일자 2010년02월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/002119

(87) 국제공개번호 WO 2008/100624

국제공개일자 2008년08월21일

(30) 우선권주장

60/901,904 2007년02월16일 미국(US)

61/009,796 2008년01월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006017538 A1

WO2006020706 A1

US20030040605 A1

WO2007077028 A1

(73) 특허권자

메리맥 파마슈티컬즈, 인크.

미국 02139-1670 메사추세츠 캠프리지 원 켄달 스
퀘어 스위트 비7201

(72) 발명자

쇠베를 비르기트

미국 매사추세츠주 02141 캠프리지 원저 스트리트
324

닐슨 올릭

미국 매사추세츠주 02169 퀸시 토마스 스트리트
18

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희

전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **E R B B3에 대한 항체 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 ErbB3 수용체와 결합하여 다양한 ErbB3 기능을 억제하는 새로운 부류의 단일클론 항체를 제공한다. 예를 들어, 본원에 기술된 항체는 ErbB3에 결합하여 그 수용체의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제할 수 있다.

(72) 발명자

펠드하우스 마이클

미국 뉴햄프셔주 03753 그랜섬 피 오 박스 1888

무루가난담 아루무감

인도 방갈로-560035 도닥아나할리 사르자푸르 로드
오폴지트 투 와이프로 코포레이트 오피스 레인보우
드라이브 364

버클러 데이비드

미국 뉴저지주 07930 체스터 에릭 코트 6

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 9를 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 10을 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 11을 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 및 서열번호 12를 포함하는 경쇄 가변부 CDR3을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 중쇄 가변부가 서열번호 1을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 5

제1항에 있어서, 경쇄 가변부가 서열번호 2를 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 6

서열번호 1을 포함하는 중쇄 가변부 및 서열번호 2를 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 7

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, ErbB3에 결합하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간 항체, 인간화 항체, 이중 특이적 항체 및 키메라 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 11

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, Fab'2, ScFv, 및 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 12

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 아이소타입이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 13

제12항에 있어서, 항체가 IgG2 아이소타입 항체인 것인 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 14

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합부를 수성 담체 내에 포함하는 암을 치료하기 위한 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물이 멸균 수성 조성물인 조성물.

청구항 16

약학적으로 허용가능한 담체 내에 항체 또는 항원 결합부를 포함하는 수용액의 멸균 미세여과를 포함하는, 제15항의 조성물의 제조 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, EGFR을 표적으로 하는 분자를 더 포함하는 조성물.

청구항 18

제4항의 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 가변부를 코딩하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 25를 포함하는 단리된 핵산.

청구항 19

제5항의 항체 또는 이의 항원 결합부의 경쇄 가변부를 코딩하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 26을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제18항 또는 제19항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 23

제22항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합부와 동일한 에피토프에 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 발현하는, 비인간 트랜스제닉 포유류.

청구항 25

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합부와 동일한 에피토프에 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 발현하는 트랜스제닉 식물.

청구항 26

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합부를 생성하는 숙주 세포.

청구항 27

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 하나 이상 포함하고, ErbB3 의존성 신호전달과 연관된 질병을 치료 또는 진단하는 데 사용하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 질병이 암인 키트.

청구항 29

삭제

청구항 30

제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 암을 치료하기에 충분한 치료적 유효량으로 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

제30항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 유방암, 난소암, 신장암, 위/결장암, 폐암, 투명세포 육종 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 36

제30항에 있어서, 상기 대상은 인간인 약학 조성물.

청구항 37

제30항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 정맥내, 근육내, 또는 피하로 대상에게 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 38

제30항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 치료제와 함께 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 제2 치료제는 제2 항체 또는 이의 항원 결합부인 약학 조성물.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 제2 치료제는 항암제인 약학 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 항암제는 항체, 소형 분자, 항대사물질, 알킬화제, 토포아이소머라아제 억제제, 미세소관 표적제, 키나아제 억제제, 단백질 합성 억제제, 면역요법제, 호르몬 또는 이의 유사체, 소마토스타틴 유사체, 글루코코르티코이드, 아로마타제 억제제 및 mTOR 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 항암제는 항체로서, 항-IGF1R 항체, 항-EGFR 항체, 또는 항-cMET 항체인 약학 조성물.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 소형 분자는 IGF1R, EGFR, 또는 cMET를 표적으로 하는 것인 약학 조성물.

청구항 44

대상에서 ErbB3과 연관된 암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, (a) 상기 대상 유래의 세포를 체외에서 제1항, 제4항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부와 접촉시키는 단계; 및 (b) 세포 상의 ErbB3에 대한 결합 수준을 측정하는 단계를 포함하며, ErbB3에 대한 비정상적으로 높은 결합 수준은 상기 대상이 ErbB3과 연관된 암을 갖고 있음을 나타내는 것인 암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 45

제38항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 치료제의 투여와 동시에 또는 그 이전에 또는 그 이후에 투여될 수 있는 것인 약학 조성물.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

배경 기술

- [0001] 폴리펩타이드 성장 인자 수용체의 ErbB/HER 아과(亞科)는 상피세포 성장 인자 (EGF) 수용체 (EGFR, ErbB1/HER1), *neu* 발암유전자 산물 (ErbB2/HER2) 및 보다 최근에 동정된 ErbB3/HER3과 ErbB4/HER4 수용체 단백질 (예를 들어, 문헌[Hynes et al., (1994) *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1198, 165-184] 참고)을 포함한다. 이러한 각 수용체들은 세포의 리간드 결합 도메인, 막관통 도메인, 세포질 단백질 티로신 키나아제 (PTK) 도메인 및 C-말단 인산화 도메인 (예를 들어, 문헌[Kim et al., (1998) *Biochem. J.* 334, 189-195] 참조)으로 이루어진다고 알려졌다.
- [0002] 시험관 내 실험으로부터, ErbB3 단백질의 단백질 티로신 키나아제 활성은 ErbB/HER 과의 다른 일원들에 비해서 현저히 약독화되며, 이러한 약독화 특성은 부분적으로는 ErbB3의 알려진 촉매 도메인 내의 비보존적 아미노산 치환의 발생으로부터 연유한다는 사실을 시사 받을 수 있었다(예를 들어, 문헌[Guy et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8132-8136]; [Sierke et al., (1997) *Biochem. J.* 322, 757-763] 참조). 그러나, ErbB3 단백질은 다양한 세포 내용물에서 인산화되는 것으로 알려졌다. 예를 들어, ErbB3은 이 단백질을 과발현하는 인간 유방암 세포주의 하위군 내의 티로신 잔기 상에서 구조적으로 인산화된다(예를 들어, 문헌[Kraus et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2900-2904]; 및 [Kim et al. 상기와 동일]를 참조하며; [Schaefer et al., (2006) *Neoplasia* 8(7):613-22] 및 [Schaefer et al., *Cancer Res* (2004) 64(10):3395-405]도 참조한다).
- [0003] 암에서 ErbB3의 역할이 밝혀졌으나(예를 들어, 문헌[Horst et al. (2005) 115, 519-527]; [Xue et al. (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426] 참조), ErbB3은 임상적 개입을 위한 표적으로서는 아직 널리 인식되지는 못하고 있는 실정이다. 현재의 면역요법은 ErbB2의 작용, 특히 ErbB2/ErbB3 복합체의 이종이합체화를 억제하는데에 일차적으로 초점을 맞추고 있다(예를 들어, 문헌[Slivkowski et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994)] 참조). 따라서, 본 발명의 목적은 ErbB3 신호 전달을 효과적으로 억제하여 다양한 암의 치료 및 진단에 사용될 수 있는 개선된 면역요법을 제공하고자 하는 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0004] 발명의 개요
- [0005] 본 발명은 ErbB3 수용체에 결합하여 다양한 ErbB3 기능을 억제하는 새로운 부류의 단일클론 항체를 제공한다. 예를 들어, 본원에 기술된 항체는 ErbB3에 결합하여 수용체의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, EGF-유사 리간드는 EGF, TGF- α , 베타셀룰린, 헤파린 결합 상피세포 성장 인자, 비레굴린 및 암피레굴린을 포함하며, 이들은 EGFR에 결합하여 EGFR과 ErbB3의 이합체화를 유도한다. 이러한 이합체화는, 결과적으로 ErbB3의 인산화를 야기하여, 수용체를 통한 신호 전달을 활성화시킨다. 따라서, 본 발명의 단일클론 항체는 ErbB3 매개성 세포 신호 전달과 관련된 다양한 암의 치료 및 진단에 유용하다. 따라서, 한 실시 양태에서, 본 발명은 ErbB3에 결합하여 ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제하는 단일클론 항체(및 이의 항원 결합부)를 제공한다.
- [0006] 또다른 실시 양태에서, 항체는 추가로 하나 이상의 하기 특성을 가진다: (i) 예컨대 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 및 BIR과 같은 ErbB3 리간드의 ErbB3에의 결합에 의해 매개되는 신호 전달을 포함하는 ErbB3 리간드 매개성 신호 전달의 억제; (ii) ErbB3을 발현하는 세포의 증식 억제; (iii) 세포 표면에서 ErbB3의 수준을 감소시키는 능력 (예를 들어, ErbB3의 세포 내 함입을 유도함으로써); (iv) ErbB3을 발현하는 세포의 VEGF 분비 억제; (v) ErbB3을 발현하는 세포의 이동 억제; (vi) ErbB3을 발현하는 세포의 구상(spheroid) 성장 억제; 및/또는 (vii) ErbB3의 도메인 I (잔기 20-209) 상에 위치한 에피토프, 예를 들어, ErbB3의 아미노산 서열의 잔기 20-202를 포함하거나 이에 걸쳐있는 에피토프에의 결합.
- [0007] 본 발명의 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 표면 플라즈몬 공명 분석법 또는 세포 결합 분석법에 의해 측정했을 때, 50 nM 이하의 K_D 를 나타낸다.
- [0008] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 35, 또는 서열번호 37에 기재된 중쇄 가변부 아미노산 서열과 80% 이상 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산을 포함하는 중쇄 가변부를 포함한다. 본 발명의 다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 36, 또는 서열번호 38에 기재된 경쇄 가변부 아미노산 서열과 80% 이상 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산을 포함한다.

노산을 포함하는 경쇄 가변부를 포함한다. 또한, 항체는 상기 언급한 중쇄 및 경쇄 가변부 양자 모두를 포함할 수도 있다.

[0009] 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 및 경쇄 가변부는 보통 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 이들은 CDR1, CDR2, 또는 CDR3 영역을 하나 이상 포함된다. 따라서, 본 발명의 다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 9를 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 10을 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 11을 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 서열번호 12를 포함하는 경쇄 가변부 CDR3; 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다.

[0010] 본 발명의 또다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 13을 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 14를 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 15를 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 16을 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 17을 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 서열번호 18을 포함하는 경쇄 가변부 CDR3; 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다.

[0011] 본 발명의 또다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 서열번호 24를 포함하는 경쇄 가변부 CDR3; 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다.

[0012] 본 발명의 또다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 39를 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 40을 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 41을 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 42를 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 43을 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변부 CDR3; 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다.

[0013] 본 발명의 또다른 특정 단일클론 항체 및 이의 항원 결합부는 서열번호 45를 포함하는 중쇄 가변부 CDR1; 서열번호 46을 포함하는 중쇄 가변부 CDR2; 서열번호 47을 포함하는 중쇄 가변부 CDR3; 서열번호 48을 포함하는 경쇄 가변부 CDR1; 서열번호 49를 포함하는 경쇄 가변부 CDR2; 서열번호 50을 포함하는 경쇄 가변부 CDR3; 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다.

[0014] 또한, 항체 및 이의 항원 결합부는 상기 언급한 임의의 CDR, 또는 이들 CDR의 조합물과 80% 이상 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 CDR을 하나 이상 포함할 수도 있다.

[0015] 한 실시 양태에서, 항체 및 이의 항체 부분은 전부 인간의 것이다(즉, 인간 CDR 및 골격 서열을 포함한다). 본 발명의 특정 인간 항체는 인간 VH3 생식세포 유전자 유래의 중쇄 가변부 및/또는 인간 VL2 생식세포 유전자 유래의 경쇄 가변부를 가지는 것들을 포함한다.

[0016] 또한, 본원에 기술된 임의의 항체 또는 이의 부분(예를 들어, ErbB3의 도메인 I 상에 위치한 에피토프, 예컨대 ErbB3의 아미노산 서열의 잔기 20-202를 포함하거나 이에 걸쳐있는 에피토프)에 의해 결합된 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합되는 단일클론 항체 및 이의 부분도 본 발명에 포함된다. 본원에 기술된 항체와 동일한 활성을 갖는 항체, 예를 들어, Ab #6과 동일한 서열을 갖는 항체도 본 발명에 포함된다.

[0017] 본 발명의 항체는 공지된 모든 형태의 항체 및 항체 유사 특성을 갖는 기타의 단백질 골격(scaffold)을 포함한다. 예를 들어, 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 이중 특이적 항체, 키메라 항체, 또는 피브로넥틴 또는 엔키린 반복과 같은 항체 유사 특성을 갖는 단백질 골격일 수 있다. 또한, 항체는 Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, 어피바디(affibody), 나노바디(nanobody), 또는 도메인 항체일 수 있다. 또한, 항체는 하기 아이소타입 중에서 임의로 하나 이상을 가질 수 있다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE.

[0018] 또다른 실시 양태에서, 본 발명은 허용가능한 담체 및/또는 아주반트와 함께 제형화된, 본원에 기술된 항체 또는 항원 결합부의 혼합물을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시 양태에서, 상기 조성물은 ErbB3 상의 서로 다른 에피토프와 결합하는 항체 또는 ErbB3과 결합하지 않는 항암 항체와 조합된 본원에 기술된 항체를 2종 이상 포함한다.

[0019] 또다른 실시 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 및 이의 항원 결합부를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 특정 실시 양태에서, 핵산은 서열번호 25, 서열번호 27, 서열번호 29, 서열번호 35 또는 서열번호 37과 80% 이상 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일하거나, 높은 엄격한 조건 하에 상기 서열들과 하이브리드화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 중쇄 가변부; 또는 서열번호 26, 서열번호 28, 서

열번호 30, 서열번호 36, 또는 서열번호 38과 80% 이상 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일하거나, 고도의 엄격한 조건 하에 상기 서열들과 하이브리드화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경쇄 가변부; 또는 이러한 중쇄 및 경쇄 가변부의 조합물을 코딩한다.

[0020] 본 발명은 추가로 본원에 기술된 항체 및 항원 결합부를 발현 및/또는 생산하는 인간을 제외한 트랜스게닉 포유류, 하이브리도마 및 트랜스게닉 식물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 본원에 기술된 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 하나 이상 포함하며, 임의로는 ErbB3 의존적 신호 전달과 관련된 질병, 예컨대 암을 치료 또는 진단하는데 사용하는 설명서를 포함하는 키트도 제공한다.

[0022] 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합부는 광범위한 치료 및 진단 용도, 특히 종양학적 용도에서 사용될 수 있다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제하기에 충분한 양으로 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합부를 하나 이상 투여함으로써 대상에서 ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 대상에 있어서 다양한 종류의 암, 예컨대, 이에 제한하지는 않지만, 흑색종, 유방암, 난소암, 신장암, 위/결장암, 폐암, 투명세포 육종 및 전립선암을 치료하기에 충분한 양으로 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합부를 하나 이상 투여함으로써 상기 기술된 암을 치료하는 방법을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 치료제, 예컨대 항암제, 예를 들어, 다른 항체, 화학요법제 및/또는 방사선과 병용하여 투여될 수 있다.

[0023] 다른 실시 양태에서, 본 발명은 ErbB3과 관련된 질병(예를 들어, 암)을 진단하여 예측하는 방법을 제공한다. 한 실시 양태에서, 이러한 방법은 대상의 세포와 본 발명의 항체 또는 항원 결합부와 접촉시킨 후(예를 들어, 체외 또는 체내에서), 세포 상에서 ErbB3와의 결합 수준을 측정함으로써 달성되며, 여기서 ErbB3에의 결합 수준이 비정상적으로 높은 경우는 대상이 ErbB3이 관련된 암에 걸렸음을 나타내는 것이다.

[0024] 본 발명의 다른 특징과 장점들은 하기 상세한 설명과 특허청구범위로부터 명백히 알 수 있을 것이다.

실시예

재료 및 방법

[0198] 이하 실시예에서는 달리 언급이 없는 한, 다음과 같은 재료 및 방법을 사용하였다.

[0200] 일반적으로, 본 발명을 실시함에 있어서, 달리 지정하지 않은 한, 통상의 화학 기술, 분자 생물학 기술, 재조합 DNA 기술, 면역학 기술(특히, 예를 들어, 항체 이용 기술), 그리고 표준적인 폴리펩티드 제조 기술을 사용하였다. 예를 들어, 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow와 다수, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); 및 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel와 다수, John Wiley & Sons (1992)]을 참조하시오. HCV의 생물학적 특징을 분석하기 위한 시험관 내 및 생체 내 모델 시스템에 관하여는 예를 들어, 문헌[Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C, Lab. Anim. (NY);34(2):39-47 (2005) 및 The chimpanzee model of hepatitis C virus infections, ILAR J.;42(2): 117-26 (2001)]에 개시되어 있다.

[0201] 세포주

[0202] 이하에 기술된 실험에 사용된 모든 세포주들은, 하기 기재된 바와 같이, 미국 국립 암 협회로부터 입수한 것이거나, 또는 연구원들에 의해 제공된 것들이다.

[0203] 세포주:

[0204] MCF7- ATCC cat. No. HTB-22

[0205] T47D- ATCC cat. No. HTB-133

[0206] Colo357-이들 세포들은 학술 연구원들로부터 입수한 것이다[Koib와 다수(2006), Int. J. Cancer, 120:514-523].

- [0207] Dul45- ATCC cat. No. HTB-81
- [0208] OVCAR8- 이 세포의 공급처에 관하여는 가 명세서 출원에 이미 개시되어 있음
- [0209] H1975 ATCC cat. No. CRL-5908
- [0210] 종양 세포의 미분쇄
- [0211] 냉동 미분쇄기(코바리스 인코포레이티드; Covaris Inc.)를 사용하여 종양을 미분쇄하였다. 종양을 특수 주머니(종양을 넣기 전에 미리 중량을 측정함)에 넣은 후, 이를 사용하는 동안에 액체 질소에 넣어 보관하였다. 소형 종양의 경우, 처음에 200 μ L의 용해 완충액을, 종양이 담겨있는 주머니에 첨가하고, 이를 액체 질소에 넣어 냉동시킨 다음, 미분쇄하여, 주머니로부터의 종양 회수 능을 개선시켰다. 미분쇄된 종양을 2mL들이 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)로 옮긴 다음, 다음 단계가 준비될 때까지 이 튜브를 액체 질소 중에 넣었다.
- [0212] 종양 세포의 용해
- [0213] 종양을, 단백질 분해 효소와 포스파타제의 억제제가 보강된 용해 완충액 중에서 용해하였다. 용해 완충액을 최종 농도 약 62.5mg/mL가 되도록 종양 분취액에 첨가하였다. 종양 시료를 30초 동안 와류시키고, 이를 얼음 상에서 약 30분 동안 항온 처리함으로써 상기 시료를 균질화하였다. 용해물을 키아젠 키아슈레더(Qiagen QiaShredder) 컬럼 내에서 약 10분 동안 회전시켜 이 시료를 추가로 균질화하였다. 투명한 용해물을 추가의 처리를 위해 새 튜브에 분액화하여 넣었다.
- [0214] BCA 분석법
- [0215] 다음과 같은 제조자의 프로토콜에 따라서, 모든 종양 시료를 대상으로 BCA 분석법(피어스(Pierce))을 수행하였다. 각 종양 시료의 총 단백질 농도(mg/mL)는 이후 ELISA 결과를 정규화하는데 사용하였다.
- [0216] ELISA 분석법
- [0217] 전체 및 인산화 ErbB3의 ELISA에 사용되는 모든 ELISA 시약은 R&D 시스템즈로부터 구입하였다(듀오셋 키트(Duoset kit)). 96-웰 닌 맥시소르브 평판(96-well Nunc Maxisorb plate)을 50 μ L의 항체로 코팅한 다음, 이를 실온에서 밤새도록 항온 처리하였다. 다음날 아침, 평판을 바이오텍(BioTek) 평판 세척기 중에서 1000 μ L/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 이후, 평판을 실온에서 PBS중 2% BSA를 사용하여 약 1시간 동안 차단시켰다. 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ L/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 50 μ L의 세포 용해물과 50% 용해 완충액 및 1% BSA 중 희석된 표준 물질을 추후의 과정을 수행하기 위해 2개씩 준비하였다. 시료들을 평판 진탕기(4 $^{\circ}$ C) 상에서 2시간 동안 항온 처리하고, 이를 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ L/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 약 50 μ L의 검출 항체를 2%의 BSA 중에 희석시키고, 여기에 PBST를 첨가한 다음, 이를 실온에서 약 1시간 동안 항온 처리하였다. 인광체-ErbB3용으로서, 검출 항체를 양 고추 내기 퍼옥시다제(HRP)에 직접 접합한 다음, 이를 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ L/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 약 50 μ L의 스트렙타비딘-HRP를 첨가한 다음, 이를 실온에서 30분 동안 항온 처리하였다(pErbB3 제외). 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ L/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 약 50 μ L의 수퍼시그널 피코 ELISA(Supersignal Pico ELISA) 기질을 첨가하고, 퓨전 평판 판독기(Fusion plate reader)를 사용하여 평판을 판독하였다. EXCEL을 이용하여 상기 데이터를 분석하였다. 2개씩 준비된 시료들에 관한 측정치들을 평균 내고, 에러 바(error bar)를 사용하여 2개씩의 시료들에 관한 측정치 사이의 표준 편차를 구하였다.
- [0218] 실시예 1: 파지 디스플레이법을 이용한 항체의 생산
- [0219] 인간 항-ErbB3 항체(본원에서는 Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 및 Ab #19라고 칭함)를 얻기 위해서, 인간 공여자로부터 얻어진 면역글로불린 서열의 독특한 조합을 포함하는 인간 Fab-파지 라이브러리[Hoet의 다수, 상동, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용됨]를 처음에 ErbB3 결합제에 대해 스크리닝하였다.
- [0220] 정제된 ErbB3과 표면 ErbB3을 발현하는 중국 햄스터 난소 세포주를 사용하여, 라이브러리로부터 73개의 독특한 Fab 서열을 동정하였다. 이후 상기 73개의 클론들을, 파지만을 제외한 Fab로서 재구성하였다. 고 처리량 방법을 이용하여, 상기 Fab을 소규모로 발현시키고, ELISA 및 플렉스칩(Flexchip) 방법(즉, 고 처리량 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술)을 이용하여, 결합 여부에 대해 테스트하였다. 파지가 제거된 73개의 Fab을 칩 표면에 찍은 다음, 결합 동력학 및 ErbB3-his 융합 표적 단백질 또는 ErbB3-Fc 단백질(R & D 시스템즈)에 대한 에피토프 차단율을 측정하였다. 얻어진 데이터로부터 Fab에 대한 평형 결합 상수 및 온/오프 비율을 계산하였다.

- [0221] 그 다음, 약 500nM의 Fab와 염소 항-인간 알렉사 647 2차 항체의 1:750배 희석액을 사용하여, MALME-3M 세포에 다양한 Fab가 결합하는지 여부를 관찰하였다. 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, 몇몇 후보 Fab는 감지할 수 있을 정도로 MALME-3M 세포를 염색시켰다.
- [0222] **실시예 2: 항-ErbB3 Fab의 최적화**
- [0223] ErbB3 리간드, 헤레굴린과 ErbB3의 결합을 차단한 Fab을 동정한 다음, Fab의 VH 및 VL 서열을 다음과 같이 코돈-최적화하였다.
- [0224] 특히, IgG1 또는 IgG2 아형으로 발현되도록 하는 발현 구조물을 이용하여 VH 및 VL 부위를 재구성하였다. 이 구조물은 적당한 중쇄 서열 및 경쇄 서열 치환용으로 디자인된 카세트를 보유하는 셀렉시스(Selexis) 골격을 포함하였다. 셀렉시스 벡터는 CMV 프로모터와 매칭 폴리-A 신호를 포함하였다.
- [0225] Ab #6의 코돈-최적화 VH 및 VL에 대한 핵산 서열을 각각 서열 번호 25 및 서열 번호 26에 제시하였으며, Ab #3에 대한 핵산 서열은 각각 서열 번호 27 및 서열 번호 28에 제시하였다(도 22 참조).
- [0226] **실시예 3: ErbB3에 대한 결합 친화도**
- [0227] 2개의 독립된 기술 즉, MALME-3M 세포를 이용하는 세포 결합 분석법 및 표면 플라스몬 공명 분석법(Surface Plasmon Resonance Assay)을 사용하여, 항-ErbB3 항체의 해리 상수를 측정하였다.
- [0228] **표면 플라스몬 공명 분석법**
- [0229] 문헌[Wassaf의 다수 (2006) Analytical Biochem., 351:241-253]에 개시된 바와 같이, 표면 플라스몬 공명 분석법(플렉스칩 분석법이라고도 칭함)을 수행하였다. 공식 $K_D = K_d/K_a$ 를 바탕으로 하여 K_D 값을 계산하였다.
- [0230] 표면 플라스몬 공명 분석법을 이용하여 측정된 Ab #6 및 Ab #3에 대한 각각의 K_D 값을 도 2a 및 도 2b에 도시하였다. Ab #6의 K_D 값은 약 4nM이었으며, Ab #3의 K_D 값은 약 8nM이었다(도 2a 및 2b 각각 참조).
- [0231] **세포 결합 분석법**
- [0232] Ab #6 및 Ab #3에 대한 K_D 값을 측정하기 위한 세포 결합 분석법을 다음과 같이 수행하였다.
- [0233] 실온에서 5분 동안, 2ml의 트립신-EDTA + 2ml의 RPMI + 5mM의 EDTA를 이용하여 MALME-3M 세포를 탈착시켰다. 완전한 RPMI(10ml)를 트립신 처리된 세포에 즉시 첨가하고, 이를 서서히 재현탁시켜, 탁상용 벡맨(Beckman) 원심 분리기에서 원심 분리시켰다(1100rpm, 5분). 세포를 BD 염색 완충액(PBS + 2% 소 태아 혈청 + 0.1% 아지드화 나트륨, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에, 2×10^6 개 세포/ml의 농도로 재현탁하고, 50 μ l의 분취액(1×10^5 개 세포)을 96-웰 적정 평판에 도말하였다.
- [0234] BD 염색 완충액 중 200nM 항-ErbB3 항체(Ab #6 또는 Ab #3) 용액 150 μ l를 에펜도르프 튜브 내에 준비하고, 이를 연속적으로 2배 희석하여 75 μ l의 BD 염색 완충액을 만들었다. 희석된 항체의 농도는 200~0.4nM였다. 이후, 상이한 단백질 희석 분취액 50 μ l를 50 μ l의 세포 현탁액에 직접 첨가하여, 최종 항체 농도를 100nM, 50nM, 25nM, 12nM, 6nM, 3nM, 1.5nM, 0.8nM, 0.4nM 및 0.2nM로 만들었다.
- [0235] 96-웰 평판 중 분취 세포를 단백질 희석액과 함께 30분 동안 실온에서 항을 처리하고(플랫폼 진탕기), 이를 300 μ l의 BD 염색 완충액으로 3회 세척하였다. 이후, 세포를 BD 염색 완충액 중 알렉사 647-표지화 염소 항-인간 IgG의 1:750배 희석액 100 μ l와 함께 항을 처리하였다(45분, 플랫폼 진탕기, 냉장실). 마지막으로, 세포를 2회 세척하고, 펠릿화한 다음, 250 μ l BD 염색 완충액 + 0.5 μ g/ml의 요드화 프로피듐 중에 재현탁하였다. FL4 채널을 이용하는, FACS칼리버 유동성 혈구 계측기 내에서 10,000개의 세포를 분석하였다. MFI 값과 이와 상응하는 항-ErbB3-항체의 농도를 각각 y-축과 x-축에 표시하여 그래프를 작성하였다. 상기 분자의 K_D 값은 비선형 회귀 곡선에 대한 1-위치 결합 모델을 이용하는, 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)으로 측정하였다.
- [0236] 공식 $Y = B_{max} * X / K_D + X(B_{max} = \text{포화성 형광도}; X = \text{항체 농도}; Y = \text{결합도})$ 을 바탕으로 하여 K_D 값을 계산하였다. 도 2c 및 2d에 나타낸 바와 같이, Ab #6 또는 Ab #3의 K_D 값은 각각 약 4nM 및 1.3nM이었다(MALME-3M 세포를 이용하는 세포 결합 분석법 이용).
- [0237] **실시예 4: ErbB3에 대한 결합 특이성/에피토프 결합**

- [0238] 다음과 같이 ELISA를 이용하여, Ab #6의 IgG2 아형과 ErbB3의 결합 특이성을 분석하였다. Ab #6이 결합된 에피토프의 동정 결과도 분석하였다.
- [0239] 특이적으로, 96-웰 넌 맥시소브 평판을 50 μ l의 단백질(5 μ g/ml; 재조합 인간 ErbB3, 재조합 인간 EGFR 또는 관련성이 없는 단백질(BSA))로 코팅한 후, 이를 실온에서 밤새도록 항온 처리하였다. 다음날 아침, 평판을 1000 μ l/웰의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다(바이오텍 평판 세척기 사용). PBS중 2% BSA를 이용하여 상기 웰을 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 상기 평판을 1000 μ l/웰의 PBST(0.05% Tween-20)으로 3회 세척하였다(바이오텍 평판 세척기 사용). 약 50 μ l의 Ab #6을 2%의 BSA 중에 수 회 희석시킨(1 μ M 및 2배 연속 희석) 희석액인 PBST를 첨가하였다. 모든 시료는 2개씩 준비하여 평판 상에 전개시켰으며, 이후 평판 진탕기 상에서 2시간 동안 항온 처리(4 $^{\circ}$ C)하였다. 상기 평판을 1000 μ l/웰의 PBST(0.05% Tween-20)으로 3회 세척하였다(바이오텍 평판 세척기 사용). 50 μ l의 인간 IgG 검출 항체(HRP 접합형 항체(Bethyl Inc; 2% BSA 중 1:75000배 희석, PBST))를 첨가한 다음, 평판을 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. 이 평판을 1000 μ l/웰의 PBST(0.05% Tween-20)으로 3회 세척하였다(바이오텍 평판 세척기 사용). 50 μ l의 수퍼시그널 피코 ELISA 기질을 첨가한 다음, 상기 평판을 퓨전 평판 판독기로 판독하였다. EXCEL 프로그램을 이용하여 데이터를 분석하였다. 2개씩 준비한 시료들의 측정값들을 평균내었으며, 이때의 에러 바는 2개의 시료들 간 표준 편차를 나타내는 것이다.
- [0240] 도 3에 나타난 바와 같이, ELISA에서 Ab #6은 재조합 ErbB3과 결합하였으나, EGFR, BSA 또는 TNF- α 와는 결합 가능할 정도로 결합하지 않았다.
- [0241] ErbB3의 20~202번 아미노산 잔기에 해당하는 단편(절단 돌연 변이체)을, 효모 디스플레이 벡터인 pYD2(His 태그의 앞 부분에 종결 코돈이 조작되어 도입된 pYD1의 변형된 벡터; 인비트로젠(Invitrogen))의 Nhe 및 BsiWI 제한 위치 사이에 클로닝하였다. 이 플라스미드를 효모 균주 EBY100(인비트로젠)과, Trp- 선택 배지 상에서 선택된 플라스미드를 포함하는 클론에 형질 전환시켰다. 이 클론을, 글루코스를 함유하는 배지 중에서 밤새도록 생육시키고(30 $^{\circ}$ C), 이를 갈락토스-함유 배지에 옮겨 ErbB3 절단형 돌연 변이체의 발현을 유도하였다(2일, 18 $^{\circ}$ C). ErbB3 절단형 돌연 변이체를 디스플레이하는 효모를 50nM의 Ab #6으로 염색한 다음, 알렉사 염료-647로 표지화한 염소 항-인간 항체로 염색하였다. 별도의 시료를 염소 항-인간 항체만으로 염색하여, 2차 항체와 효모는 특이적으로 결합한다는 사실을 확인하였다. FACS 캘리버 세포 분류기(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 상에서 유동성 형구 측정법을 수행하였다.
- [0242] 도 30에 나타난 바와 같이, Ab #6은, 절단형 돌연 변이체 즉, ErbB3의 20~202번 아미노산 잔기와 결합하였다.
- [0243] **실시예 5: 종양 세포 상의 총 ErbB3의 하향 조절**
- [0244] Ab #6이 시험관 내 및 생체 내(종양 세포 내)에서 ErbB3의 발현을 하향 조절하는 능력을 다음과 같이 테스트하였다.
- [0245] MALME-3M 세포를 96웰 조직 배양 평판에 접종한 다음, 항생제, 2mM L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청(FBS)이 보강된 RPMI-1640 배지에서 생육하였다(24시간, 37 $^{\circ}$ C 및 5% 이산화탄소). 이후, 배지를 항생제와 2mM의 L-글루타민을 포함하는 RPMI-1640 배지에 대해 스위칭(switching)시켰는데, 이때, 항체를 첨가하기도 하고(첨가하였을 경우에는, 항체 농도를 1 μ M, 250nM, 63nM, 16nM, 4.0nM, 1.0nM, 240pM, 61pM 및 15pM) 첨가하지 않기도 하였다. 세포를 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 생육시키고(5% 이산화탄소), 이를 냉각 PBS로 세척한 다음, 150mM NaCl, 5mM 피로인산나트륨, 10uM bpV(phen), 50uM 페날라진, 1mM 오소바나데이트 나트륨, 그리고 단백질 분해효소 억제제의 혼합물(cocktail)(시그마(Sigma), P714)을 함유하는 포유동물 단백질 추출물(MPER) 용해 완충액(피어스, 78505)을 이용하여 수집하였다. 0.1%의 Tween-20을 포함하는 인산염 완충 염수 중 4% 소 혈청 알부민으로 세포 용해물을 2배 희석한 다음, 마우스 항-인간 ErbB3 포획 항체(capture antibody)와 바이오틴화된 마우스 항-인간 ErbB3 2차 검출용 항체를 이용하여 이 세포 용해물을 ELISA 분석하였다. 화학 발광 기질(피어스, 37070)과 반응시킨 양고추냉이-퍼옥시다제에 접합한 스트렙타비딘으로 신호를 발생시켰다. 루미노미터(luminometer)를 이용하여 ELISA를 통해 가시화하였다.
- [0246] 도 4에 나타난 바와 같이, Ab #6은 MALME-3M 세포 내(시험관 내) 총 ErbB3 수준을 약 46.9%까지 감소시켰다(ELISA로 측정함). 혈청과 항체를 포함하지 않는 배지를 대조군으로 사용하였다.
- [0247] 추가의 실험에서는, Ab #6의 IgG1 및 IgG2 아형을 이용하여, MALME-3M 세포 상에 존재하는 ErbB3 수용체가 하향 조절되는지 여부를 관찰하였다(FACS 분석법). MALME-3M 세포를 15cm의 접시 상에서 트립신 처리하고, 이를 RPMI + 10% 소 태아 혈청으로 1회 세척하였다. 세포 펠릿은 1ml당 1×10^6 개의 세포의 밀도로 재현탁하였다. 2×10^5 개 세포인 분취액 2 가지를 12-웰 조직 배양 평판에 가하고, 이를 최종 부피 800ul RPMI + 10% 소 태아 혈청이 되

도록 재현탁하였다. 하나의 웰에는 Ab #6의 IgG1 또는 Ab #6의 IgG2 아형을 첨가하여, 최종 농도 100nM이 되도록 하였으며(처리 시료), 다른 웰에는 동 부피의 PBS를 첨가하였다(미처리 시료).

[0248] 다음날, 처리 및 미처리 세포를 트립신으로 처리하고, 세척한 다음, 얼음 상에서 30분 동안 이를 100nM의 Ab #6(BD 염색 완충액 중)과 함께 항온 처리하였다. 세포를 1ml의 BD 염색 완충액으로 2회 세척하고, 이를 알렉사 647-표지화된 염소 항-인간 알렉사 647의 1:500배 희석액 100ul과 함께 얼음 상에서 45분 동안 항온 처리하였다. 이후, 세포를 세척한 다음, 300ul의 BD 염색 완충액 + 0.5ug/ml의 요드화프로피듐 중에 재현탁하였다. 10,000개의 세포들을, FL4 채널을 이용하는 FACS캘리버 유동성 혈구 측정계에서 분석하였다.

[0249] 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, Ab #6의 IgG1 및 IgG2 아형은 둘 다 MALME-3M 세포 상의 ErbB3을 각각 약 62% 및 약 66%까지 하향 조절하였다.

[0250] 이와 같은 감소 현상이 MALME-3M 세포 표면에 존재하는 ErbB3 수용체의 내부화로 인한 것인지 여부를 알아보기 위해서, 항체가 존재할 때의 경시적 ErbB3 발현량을 측정하였다. 구체적으로, MALME-3M 세포를 15cm의 접시 상에서 트립신으로 처리하고, 이를 RPMI + 10% 소 태아 혈청으로 1회 세척하였다. 세포 펠릿을 1ml당 1×10^6 개의 세포의 밀도로 재현탁하였다. 2×10^5 개의 세포의 분취액 2가지를 12-웰 조직 배양 평판에 첨가하고, 이를 재현탁하여, 최종 부피가 800 μ l RPMI + 10% 소 태아 혈청이 되도록 만들었다. 하나의 웰에는 항-ErbB3 항체를 첨가하여 최종 농도 100nM(처리 시료)이 되도록 만들었고, 다른 웰에는 동 부피의 PBS를 첨가하였다(미처리 시료). 다음날, 처리 및 미처리 세포를 트립신으로 처리하고, 세척한 다음, 이를 얼음 상에서 30분 동안 100nM의 항-ErbB3 항체(BD 염색 완충액 중)과 함께 세척한 다음 항온 처리하였다. 세포를 1ml의 BD 염색 완충액으로 2회 세척하고, 알렉사 647-표지화된 염소 항-인간 알렉사 647의 1:500배 희석액 100 μ l과 함께 얼음 상에서 45분 동안 항온 처리하였다. 이후, 세포를 세척하고, 300 μ l의 BD 염색 완충액 + 0.5 μ g/ml의 요드화프로피듐 중에 재현탁하였다. 10,000개의 세포들을, FL4 채널을 이용하는 FACS캘리버 유동성 혈구 측정계에서 분석하였다.

[0251] 도 6에 나타난 바와 같이, Ab #6의 존재 하에서 ErbB6가 하향 조절되는지 여부를 0시간(도 6a), 0.5시간(도 6b), 2시간(도 6c) 및 24시간(도 6d) 경과시에 측정하였다. 도 6a~6d에 나타난 바와 같이, 약 30분 및 약 24시간 경과 후에 약 50%의 세포 표면 ErbB3 수용체가 하향 조절되었으며, 세포 표면 수용체 중 약 93%가 하향 조절되었다.

[0252] Ab #6이 흑색종 세포와 같이 생체 내에서 ErbB3을 하향 조절하는 능력도 다음과 같이 관찰하였다.

[0253] 요약하면, T-세포 결핍 nu/nu 마우스(NIH 입수, 3~4주령 암컷 마우스; 이계 교배; 알비노종 소인)를 찰스 리버(Charles River) 실험실(메사츄세츠주 윌밍톤 소재)로부터 구입하였다. 이식용 MALME-3M 세포를 배양액(RPMI 배지, 10% FBS, L-글루타민 및 항생제, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 중에서 배양하여, 회수 전 합류도가 약 80%가 되도록 하였다. 이식할 때까지 세포를 얼음 상에 보관하였다. 마우스의 오른쪽 옆구리에 100ul의 MALME-3M 세포를 피하 주사하여 이 세포를 마우스에 이식하고, 초기 종양 성장에 대해 모니터링하면서 회수하였다.

[0254] 디지털 방식의 측정 양각기를 이용하여 종양의 크기를 측정하였으며(길이 \times 폭), 이후 마우스에 IgG2a(시그마, M7769-5MG)를 투여하였다(정맥 내 주사). 항체 #6을 마우스에 하루 걸러서 복강 내 투여하였으며(15 μ g 또는 100 μ g), 이때 종양 크기는 1주일에 3회씩 측정한 후, 마이크로소프트 EXCEL 스프레드시트에 기록하였다.

[0255] 종양의 최종 크기(L \times W)를 측정하고, CO₂로 마우스를 질식사시킨 후, 종양을 절개하였으며, 이와 같이 절개한 종양을 액체 질소 중에서 스냅 동결(snap frozen)시킨 후, -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다(생화학적 분석용). 최종 종양 크기를 측정하여 분석한 다음, 그 결과를 예를 들어, 문헌[Burtrum외 다수, (2003) Cancer Res., 63:8912-8921]에 개시한 바와 같이, 종양 표면적과 종양 부피 간의 그래프로 나타내었다. 이 데이터를 또한 종양 부피 및 종양 표면적에 대해 "정규화" 수단과 "비정규화" 수단으로 분석하였다. 이 데이터를 "정규화"하기 위하여, 각각의 측정 시점에서 각 그룹에 속하는 각각의 종양을 초기 종양 크기별로 나누었다(측정 양각기를 이용하여 측정함).

[0256] 도 7에 나타난 바와 같이, 이러한 분석법에서 테스트된 다수의 항체들 중, Ab #6은, Ab #6의 아형인 IgG1 또는 IgG2 중 어느 하나를 종양에 주사한 다음 24시간 경과시 전체 ErbB3을 하향 조절하였다. PBS는 대조군으로 사용하였다.

[0257] 추가의 실험에서, Ab #6이 ADRr 이종 이식편 내 ErbB3을 하향 조절하는 능력을 생체 내 관찰하였다.

[0258] 요약하면, 시료를 냉동 분쇄기(cryopulverizer)(코바리스 인코포레이티드) 내에서 미분쇄하였다. 종양을 특수

주머니에 보관하였는데(종양을 넣기 전에 이 주머니의 중량을 미리 측정함), 사용하는 동안 이를 액체 질소 내에 넣었다. 소형 종양의 경우, 처음에 200 μ l의 용해 완충액을 종양을 넣어둔 주머니에 가하고, 이를 액체 질소에 넣어 냉동시킨 후, 미분쇄하여 주머니로부터의 종양 회수율을 개선시켰다. 미분쇄된 종양을 2ml들이 에펜도르프 튜브로 옮긴 다음, 용해시킬 때까지 액체 질소 중에 넣었다. 종양을 단백질 분해 효소와 포스파타제 억제제로 보강된 용해 완충액 중에서 용해하였다. 용해 완충액을 종양 분취액에 첨가하여 최종 농도 62.5mg/ml가 되도록 하였다. 종양 시료를 30초 동안 와류시킨 후, 30분 동안 얼음 상에 방치하여, 이 시료를 균질화하였다. 용해물을 키아젠 키아슈레더 컬럼 내에서 10분 동안 회전시켜, 이 시료를 추가로 균질화하였다. 투명한 용해물을 새 튜브에 분액화하여 넣었다.

[0259] 상기 재료와 방법 섹션에 제시된 바와 같이 BCA 분석법을 수행하였다.

[0260] ErbB3의 전체 수준을 ELISA로 측정하였다. 상기 ELISA 시약은 R&D 시스템즈로부터 구입하였다(듀오셋 키트). 96-웰 플레이트 맥시소르브 평판을 50 μ l의 각 포획 항체로 코팅한 다음, 이를 실온에서 밤새도록 항온 처리하였다. 다음날 아침, 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ l/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척한 다음, 이 평판을 실온에서 PBS중 2% BSA를 사용하여 1시간 동안 차단시켰다. 이후, 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ l/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 50 μ l의 세포 용해물과 표준 물질을 50% 용해 완충액 및 1% BSA 중 희석하였으며; 이때 모든 시료는 2개씩 준비하였다. 평판들을 평판 진탕기(4℃) 상에서 2시간 동안 항온 처리하고, 이를 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ l/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 50 μ l의 검출 항체를 2%의 BSA 중에 희석시키고, 여기에 PBST를 첨가한 다음, 이를 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ l/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 약 50 μ l의 스트렙타비딘-HRP를 첨가한 다음, 이를 실온에서 30분 동안 항온 처리하였다. 상기 평판을 바이오텍 평판 세척기 중에서 1000 μ l/웰의 농도의 PBST(0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 약 50 μ l의 수퍼시그널 피코 ELISA 기질을 첨가하고, 플레이트 평판 판독기로 판독하였다. EXCEL을 이용하여 상기 데이터를 분석하였다. 2개씩 준비된 시료들의 측정값을 평균 내고, 에러 바를 사용하여 2개씩 준비한 시료들의 측정값 사이의 표준 편차를 구하였다.

[0261] 이 실험 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 도시한 바와 같이, Ab #6은 ADRr 이중 이식편 내에서(생체 내에서) ErbB3을 하향 조절하였다.

[0262] 실시예 6 : 종양 세포 증식의 억제

[0263] Ab #6이, ErbB3을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포)의 세포 내 증식을 억제하는 능력을 다음과 같이 관찰하였다.

[0264] MALME3M, ACHN 및 NCI/ADRr 세포를 96웰 조직 배양 평판에 접종하고, 이를 항생제, 2mM L-글루타민 및 10% 소태아 혈청(FBS)이 보강된 RPMI-1640 배지 중에서 생육시켰다(24시간, 37℃ 및 5% 이산화탄소). 이후, 배지를 항생제와 2mM의 L-글루타민을 포함하는 RPMI-1640 배지에 대해 스위칭시켰는데, 이때, 항체를 첨가하기도 하고(첨가하였을 경우에는, 항체 농도를 1 μ M, 250nM, 63nM, 16nM, 4.0nM, 1.0nM, 240pM, 61pM 및 15pM) 첨가하지 않기도 하였다. 세포를 96시간 동안 37℃에서 생육시키고(5% 이산화탄소), 셀타이타-글로(CellTiter-Glo)® 발광 세포 생존능 분석법(Luminescent Cell Viability Assay; 프로메가(Promega), G7573)으로 수집하여, 이를 루미노미터로 분석하였다. 혈청과 항체를 함유하지 않는 배지를 대조군으로 사용하였다.

[0265] 도 9, 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, Ab #6은, ErbB3을 발현하는, MALME-3M 세포(도 9), ADRr 난소암 세포(도 10) 및 ACHN 세포(도 11)의 증식을 억제하였다. 특히, Ab #6은 MALME-3M 세포의 증식을 약 19.6%까지 억제하였으며[셀 타이타 글로 분석법 이용], ADRr 난소암 세포의 증식은 약 30.5%까지 억제하였다. 또한, 도 11에 나타난 바와 같이, Ab #6은 ACHN 세포의 증식을 약 25.4%까지 억제하였다.

[0266] 실시예 7: 종양 세포 내 ErbB3 인산화의 억제

[0267] Ab #6이, ErbB3의 인산화를 생체 내에서 억제하는 능력을 다음과 같이 관찰하였다.

[0268] 이 시료를 상기 실시예 5(즉, 도 8에 관한 실시예)에 제시된 기술을 이용하여 미분쇄하였다. 상기 재료 및 방법 섹션에 기술된 바와 같이 BCA 분석법을 수행하였으며, ELISA 분석법은 도 8에 관한 실시예인 실시예 5에 제시된 바와 같이 수행하였다.

[0269] 이 실험의 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에 도시한 바와 같이, Ab #6은 생체 내 ADRr 난소 이중 이식편 내 ErbB3의 인산화를 상당 수준 억제하였다[인산화된 ErbB3(pErbB3)의 양에 의해 측정, 총 단백질 양(ng/mg)].

- [0270] Ab #6이, 베타셀룰린(BTC) 또는 헤레굴린(HRG)에 의해 유도되는 ErbB3 인산화 과정을 억제하는 능력도 다음과 같이 관찰하였다.
- [0271] Ab #6과 함께 난소 ADRr 세포를 30분 동안 예비 항온 처리한 다음, 이를 50nM BTC, 10nM HRG 또는 333nM TGF- α 로 자극하였다. 예비 항온 처리 후, 상기 배지를 제거하고, 세포를 50nM BTC 또는 333nM TGF- α 로 자극하였다(5분, 37°C 및 5% CO₂, PE498에 관함). HRG 대조군(5분, 5nM), 10% 혈청 및 0% 혈청 대조군도 사용하였다. 세포를 1×의 냉각 PBS로 세척하고, 또한 이를 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리함으로써, 30 μ l의 냉각 용해 완충액(M-PER 완충액 + 바나듐산나트륨(NaVO₄, 시그마), 2-글리세로포스페이트, 산화페닐아신, BpV 및 단백질 분해 효소 억제제) 중에서 용해시켰다. 용해물은 -80°C에서 밤새도록 보관하여 두었다.
- [0272] 도 13a~13c에 도시한 바와 같이, Ab #6은 ErbB3의 베타셀룰린 및 헤레굴린-매개 인산화 과정을 상당 수준 억제하였다.
- [0273] 추가의 실험에서, Ab #6이, 난소 종양 세포주인 OVCAR5 및 OVCAR8 내 ErbB3의 인산화 과정을 억제하는 능력은 다음과 같이 관찰하였다.
- [0274] OVCAR5 및 OVCAR8 세포주는 미국 국립 암 협회, 암 치료 및 진단과("DCTD")로부터 입수하였다. ELISA는 상기 재료 및 방법에 관한 섹션에 기술된 바와 같이 수행하였다.
- [0275] 본 실험의 결과는 도 14a 및 14b에 나타내었다. 도 14a 및 14b에 도시한 바와 같이, Ab #6은 OVCAR5 및 OVCAR8 난소 암 세포주 둘 다에서 ErbB3의 인산화를 억제하였다.
- [0276] 전술한 바와 같이, Ab #6은 ErbB3의 베타셀룰린-매개 인산화 과정을 억제한다. ErbB3의 베타셀룰린-매개 인산화 과정이 ErbB1 또는 ErbB2를 통해서 진행되는지 여부를 관찰하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [0277] ADRr 세포 또는 MALME-3M 세포(1×10^5)를 25 μ M의 항-ErbB3 Ab #6 또는 25 μ M의 엘비투스(Erbbitux)(대조군)와 함께 50 μ l의 BD 염색 완충액 중에서 예비 항온 처리하였다(30분, 얼음 상). 30분 경과 후, 400nM 바이오틴화 BTC 50 μ l를 세포에 첨가하고, 이것들을 얼음 상에서 30분 더 항온 처리하였다. 이로써 항체의 최종 농도는 12.5 μ M이 되었으며, 이때의 BTC 최종 농도는 200nM였다. 이후, 세포를 500 μ l의 BD 염색 완충액으로 2회 세척한 다음, 이를 BD 염색 완충액 중에서 스트렙타비딘-PE(PE = 피코에리트린)(인비트로젠)의 1:200배 희석액 100 μ l와 함께 45분 동안 항온 처리하였다. 마지막으로, 세포를 2회 세척한 다음, 이를 300 μ l의 BD 염색 완충액 중에 재현탁시키고, FACS캘리버 유동성 혈구 측정계로 분석하였다. 양성 대조군인, 1×10^5 개의 ADRr 또는 MALME-3M 세포를 200nM BTC와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리하고, 세척한 다음, 이를 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액과 함께 45분 동안 항온 처리하였다. 스트렙타비딘-PE 접합체로부터 배경 염색(background staining)을 평가하기 위하여, 세포를 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액 100 μ l와만 항온 처리하였다.
- [0278] 본 실험의 결과를 도 15a~15c에 도시하였다. 도 15a에 도시한 바와 같이, 베타셀룰린(BTC)은 ErbB1 음성 MALME-3M 세포와 거의 결합하지 않는다. 그러나, 도 15b와 15c에 도시한 바와 같이, BTC는 ErbB1 양성 ADRr 세포에 결합함을 알 수 있다.
- [0279] 또한, 도 15b 및 15c에 도시한 바와 같이, 결합은 엘비투스 즉, EGFR에 특이적으로 결합하는 항-EGFR 항체로서, EGF-유사 리간드와 EGFR이 결합함을 입증하는 대조군으로서 포함된 항체에 의해 차단되었다[예를 들어, Adams와 다수(2005), Nature Biotechnology 23, 1147-1157].
- [0280] **실시예 8: 종양 세포 내 헤레굴린-매개 신호 전달 과정의 억제**
- [0281] Ab #6이, 헤레굴린-매개 종양 세포의 신호 전달 과정을 억제하는 능력은 다음과 같이 관찰하였다.
- [0282] MALME-3M 세포를 96웰 조직 배양 평판에 접종하고, 이를 항생제, 2mM L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청(FBS)이 보강된 RPMI-1640 배지 중에서 생육시켰다(24시간, 37°C 및 5% 이산화탄소). 세포를 37°C 및 5% 이산화탄소 하에서 24시간 동안, 항생제와 2mM L-글루타민을 포함하는 RPMI-1640 배지 내에서 혈청 결핍 상태(serum starving)로 두었다. 세포를 항-ErbB3 항체(Ab #6의 IgG2 아형)를 사용하거나 사용하지 않고 30분 동안 예비 처리하였는데, 항체를 사용하였을 경우에는, 항체의 농도를 1 μ M, 250nM, 63nM, 16nM, 4.0nM, 1.0nM, 240pM 및 61pM로 하였고, 이후, 37°C 및 5% 이산화탄소 하에서 HRG1-베타1-ECD로 10분 동안 자극하였다. 세포를 냉각 PBS로 세척한 다음, 이를, 150mM NaCl, 5mM 피로인산나트륨, 10uM bpV(phen), 50 μ M 페닐라신, 1mM 오소바나테이트 나트륨, 그리고 단백질 분해 효소 억제제의 혼합물(시그마, P714)을 함유하는, 포유동물 단백질 추출물(MPER) 용해 완충액(피어스, 78505)으로 수집하였다. 세포 용해물을 인산염 완충 염수 중 4% 소 혈청 알부민과 0.1%

tween-20으로 2배 희석시킨 다음, ELISA를 이용하여 이를 AKT(ErbB3의 하류 효과기) 및 ErbB3 인산화에 대해 분석하였다.

[0283] AKT 인산화에 대해 테스트하기 위하여, 용해물을 ELISA 평판 상에서, AKT에 특이적인 포획 항체 및, AKT의 세린 473 상의 인산화 위치에 특이적인 바이오틴화 검출용 항체와 함께 전개시켰다. 화학 발광 기질(피어스, 37070)과 반응한 양 고추 냉이-퍼옥시다제에 접합된 스트렙타비딘으로 신호를 발생시켰다. ErbB3 인산화에 관해 분석하기 위하여, 용해물을, ErbB3에 특이적인 포획 항체와, 양 고추 냉이-퍼옥시다제에 접합된 항-인산화티로신 검출 항체와 함께 ELISA 평판 상에서 전개시켰다. 이후, 이것들을 화학 발광 기질(피어스, 37070)과 반응시켰다. 루미노미터를 사용하여 ELISA를 가시화하였다.

[0284] 도 16a 및 16b에 나타난 바와 같이, Ab #6은 MALME-3M 세포 내 헤레글린-매개 신호 전달 과정의 잠재적인 억제 인자였다[ErbB3(도 16a) 및 AKT(도 16b)의 인산화가 감소한 것으로 판단함]. 주목할 점은, Ab #6이 AKT의 인산화를 거의 100% 가까이 억제하였다는 점이다.

[0285] 실시예 9: 난소, 전립선 및 췌장 종양의 성장 억제

[0286] 생체 내 Ab #6의 효능을 평가하기 위하여, 인간 암의 몇몇 이종 이식편 모델을 누드 마우스(nude mouse)내에서 확립하였으며, 종양의 성장이 억제되는지 여부는 항체를 다수 회 투여함으로써 평가하였다. 예를 들어, 이종 이식편에 관한 연구를 위해서, T-세포 결핍 nu/nu 마우스(3~4주령 암컷 마우스, NIH 입수; 이계 교배; 알비노증 소인)를 찰스 리버 실험실(메사츄세츠주 윌링톤 소재)로부터 구입하였다. 이식용 ADRr 세포를 배양액(RPMI 배지, 10% FBS, L-글루타민 및 항생제, 37°C, 5% CO₂) 중에서 배양하여, 회수 전 합류도가 약 85%가 되도록 하였다. 이식할 때까지 세포를 얼음 상에 보관하였다. 마우스의 오른쪽 옆구리에 100μl의 ADRr 세포를 피하 주사하여 이 세포를 마우스에 이식하고, 초기 종양 성장에 대해 모니터링하면서 회수하였다.

[0287] 디지털 방식의 측정 양각기를 이용하여 종양의 크기를 측정하였으며(길이 × 폭), 이후 마우스에 IgG2a(시그마, M7769-5MG)를 투여하였다(정맥 내 주사). 항체 #6을 마우스에 하루 걸러서 복강 내 투여하였으며(30μg 또는 300μg), 이때 종양 크기는 1주일에 3회씩 측정된 후, 마이크로소프트 EXCEL 스프레드시트에 기록하였다.

[0288] 종양의 최종 크기(L × W)를 측정하고, CO₂로 마우스를 질식시켜 안락사시킨 다음, 종양을 절개하였으며, 이와 같이 절개한 종양을 액체 질소 중에서 스냅 동결시킨 후, -80°C에 보관하였다(생화학적 분석용). 최종 종양 크기를 측정하여 분석한 다음, 그 결과를 문헌[Burtrum의 다수, 상동]에 개시한 바와 같이, 종양 표면적과 종양 부피의 관계의 그래프로 나타내었다. 이 데이터를 또한 종양 부피 및 종양 표면적에 대해 "정규화" 수단과 "비정규화" 수단으로 분석하였다. 이 데이터를 "정규화"하기 위하여, 각각의 측정 시점에서 각 그룹에 속하는 각각의 종양을 초기 종양 크기별로 나누었다(측정 양각기를 이용하여 측정함).

[0289] 3가지의 인간 종양 세포주 즉, ADRr(난소), Du145(전립선) 및 OvCAR8(난소)의 상이한 모델로부터 얻은 데이터를 도 17a~17c에 도시하였으며, Colo357 이종 이식편에 관한 연구 결과는 도 17d에 도시하였다. 이와 같은 연구를 통해 얻어진 데이터를 통하여, 300ug의 Ab #6을 3일에 한 번씩 투여하면(Q3d), 종양의 성장이 상당 수준 억제됨을 알 수 있다[연구 중 다수의 시점, p < 0.05]. 뿐만 아니라, 투여량을 600ug으로 증가시켰을 때(Q3d), Du145 전립선 암 모델과 신장암 및 췌장암 이종 이식편 모델(ACHN 및 COLO357)에서 Ab #6의 이와 같은 억제 효과는 더욱 상승하였다. 그러나, 투여량을 1500ug으로 더욱 증가시키면(Q3d), 효능은 증가하지 않았는데(OvCAR8 - 도 17; COLO357), 이는 곧, 종양 성장을 억제시키는 포화량이 600ug임을 말해주는 것이다. 이와 같은 연구에 사용된 동물들로부터 얻어진 혈청의 약물 동태학(PK)적 분석 결과를 통하여, Ab #6의 혈청 중 보유율이 투여량에 의존적으로 증가함이 입증되었다. 이와 유사하게, 이와 같이 상이한 연구에 사용된 Ab #6의 종양 내 수준을 생화학적으로 분석한 결과, 총 종양 용해물 1ug당 MM121의 양은 투여량에 따라서 약 0~6pg임을 알 수 있었다(데이터는 제시하지 않음).

[0290] 실시예 10: 종양 세포 상에서의 ErbB3과 ErbB3 리간드의 결합 억제

[0291] 추가의 실험에서, ErbB3 리간드와 ErbB3의 결합을 억제하되, EGFR과 EGF-유사 리간드의 결합은 억제하지 않는 본 발명의 항체의 특이성을 다음과 같이 관찰하였다.

[0292] 하나의 실험에서, ErbB3 리간드(예를 들어, 헤레글린 및 에피레글린)와 ErbB3의 결합을 억제하는, Ab #6 및 Ab #3의 Fab형(Ab/Fab #3)의 특이성을 관찰하였다.

[0293] Ab #6과 Ab/Fab #3이, 헤레글린과 ErbB3의 결합을 억제하는 능력을 관찰하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행

하였다.

- [0294] ADRr 세포(1×10^5)를, $50 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에서 $10 \mu\text{M}$ 의 항-ErbB3 항체(예를 들어, Ab #6 또는 Ab/Fab #3)와 함께 항온 처리하였다(30분, 얼음 상). 30분 경과한 후, $50 \mu\text{L}$ 의 바이오틴화된 헤레글린 EGF(40nM)를 세포에 첨가하고, 이를 얼음 상에서 10분 더 항온 처리하였다. 이로써, 항체의 최종 농도는 $5 \mu\text{M}$ 로, 그리고 헤레글린 EGF의 최종 농도는 20nM 이 되었다. 이후, 세포를 $500 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액으로 2회 세척한 다음, 스트렙타비딘-PE(PE = 피코에리트린)(인비트로젠)의 BD 염색 완충액 중 1:200배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와 함께 항온 처리하였다(45분). 마지막으로, 세포를 2회 세척하고, 이를 $300 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에 재현탁한 후, FACS캘리버 유동성 혈구 계측기 중에서 분석하였다. 양성 대조군으로서, 1×10^5 개의 ADRr 세포를 20nM 의 헤레글린 EGF와 함께 얼음 상에서 항온 처리하고(10분), 2회 세척한 다음, 45분 동안 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액과 함께 항온 처리하였다. 스트렙타비딘-PE 접합체로부터 백 그라운드 염색률을 측정하기 위하여, 1×10^5 개의 ADRr 세포를 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와만 항온 처리하였다(45분).
- [0295] 본 실험의 결과를 도 18a와 18b에 나타내었다. 도 18a와 18b에 도시한 바와 같이, Ab #6과 Ab/Fab #3은 헤레글린과 ErbB3의 결합을 억제할 수 있었다.
- [0296] 이와 유사하게, Ab #6이 기타 ErbB3-리간드인 에피레글린과 ErbB3의 결합을 억제하는 능력은 다음과 같이 관찰하였다.
- [0297] ADRr 세포(1×10^5)를, $50 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에서 $25 \mu\text{M}$ 의 Ab #6 또는 $25 \mu\text{M}$ 의 어비투스(대조군)와 함께 예비 항온 처리하였다(30분, 얼음 상). 30분이 경과한 후, $50 \mu\text{L}$ 의 바이오틴화된 Epi($2 \mu\text{M}$)를 세포에 첨가하고, 이를 얼음 상에서 30분 더 항온 처리하였다. 이로써, 항체의 최종 농도는 $12.5 \mu\text{M}$ 로, 그리고 Epi의 최종 농도는 $1 \mu\text{M}$ 로 만들었다. 이후, 세포를 $500 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액으로 2회 세척한 다음, 스트렙타비딘-PE(PE = 피코에리트린)(인비트로젠)의 BD 염색 완충액 중 1:200배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와 함께 항온 처리하였다(45분). 마지막으로, 세포를 2회 세척하고, 이를 $300 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에 재현탁한 후, FACS캘리버 유동성 혈구 계측기 중에서 분석하였다. 양성 대조군으로서, 1×10^5 개의 ADRr 세포를 $1 \mu\text{M}$ 의 Epi와 함께 얼음 상에서 항온 처리하고(30분), 2회 세척한 다음, 45분 동안 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액과 함께 항온 처리하였다. 스트렙타비딘-PE 접합체로부터 백 그라운드 염색률을 측정하기 위하여, 상기 세포를 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와 항온 처리하였다(45분).
- [0298] 본 실험의 결과를 도 19a 및 19b에 나타내었다. 도 19a에 도시한 바와 같이, 에피레글린은 ErbB3 양성 ADRr 세포에 결합하였다. 뿐만 아니라, 도 19b에 도시한 바와 같이, 이와 같은 결합은 어비투스 및 Ab #6에 의해 억제되었는데, 이는 곧, 에피레글린이 EGFR과 ErbB3 둘 다와 결합할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0299] Ab #6이 EGF-유사 리간드(예를 들어, HB-EGF)와 종양 세포의 결합을 억제할 수 있는지 여부를 관찰하기 위하여 추가의 실험을 수행하였다.
- [0300] ADRr 세포(1×10^5 개)를 $25 \mu\text{M}$ 의 Ab #6 또는 $25 \mu\text{M}$ 의 어비투스(대조군)와 함께 $50 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에서 예비 항온 처리하였다(30분, 얼음 상). 30분 경과 후, 400nM 의 바이오틴화된 HB-EGF $50 \mu\text{L}$ 를 세포에 첨가하고, 이를 얼음 상에서 30분 더 항온 처리하였다. 이로써, 항체의 최종 농도는 $12.5 \mu\text{M}$ 로, 그리고 HB-EGF의 최종 농도는 200nM 이 되었다. 이후, 세포를 $500 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액으로 2회 세척하고, 이를 스트렙타비딘-PE(PE = 피코에리트린)(인비트로젠)의 BD 염색 완충액 중 1:200배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와 함께 항온 처리하였다(45분). 마지막으로, 세포를 2회 세척하고, 이를 $300 \mu\text{L}$ 의 BD 염색 완충액 중에 재현탁한 후, FACS캘리버 유동성 혈구 계측기 중에서 분석하였다. 양성 대조군으로서, 1×10^5 개의 ADRr 세포를 200nM 의 HB-EGF와 함께 얼음 상에서 항온 처리하고(30분), 2회 세척한 다음, 45분 동안 스트렙타비딘-PE의 1:200배 희석액과 함께 항온 처리하였다. 스트렙타비딘-PE 접합체로부터 백 그라운드 염색률을 측정하기 위하여, 상기 세포를 스트렙타비딘-PE의 1:200 배 희석액 $100 \mu\text{L}$ 와만 항온 처리하였다(45분).
- [0301] 도 20a 및 20b에 도시한 바와 같이, HB-EGF는 ADRr 세포상에 존재하는 ErbB와 결합하였으며, Ab #6은 이와 같은 결합을 억제하지 않은 것으로 보아, Ab #6이 ErbB3 리간드(예를 들어, 헤레글린 및 에피레글린)와 ErbB3의 결합을 특이적으로 억제함을 알 수 있다.
- [0302] **실시예 11: 종양 세포 내 VEGF 분비의 억제**

[0303] Ab #6이, ErbB3을 발현하는 세포(예를 들어, 암 세포)의 VEGF 분비를 억제하는 능력을 VEGF 분비 분석법(VEGF ELISA 키트, 미네소타주 미네아폴리스 소재, R&D 시스템즈로부터 구입, Cat.#DY293B)을 이용하여 관찰하였다. 우선, 미처리 세포 및 HRG -베타 1 처리 MCF-7, T47D 및 COLO-357 세포 내에서 Ab #6이 VEGF 분비를 억제하는 능력을 분석하였다. 이와 같이 연구한 결과, COLO-357 세포가 배지에 가장 다량의 VEGF를 분비하였음을 알 수 있었다. 이와 같은 세포들은 또한 HRG 수준이 매우 높았으며(데이터는 제시하지 않음), 배지에 HRG를 첨가하여도 VEGF를 더 이상 분비할 수 없었다(도 24a). 이와는 반대로, HRG는 MCF-7 세포 및 T47D 세포 내에서 VEGF를 분비시킬 수 있었다.

[0304] 3개의 세포주 모두의 경우, Ab #6은 잠재적 억제 효능을 높은 수준으로 나타냈으며, 특히 COLO-357 세포의 경우 가장 높았다(도 24a). Ab #6은 또한 3가지의 상이한 이종 이식편 내 VEGF의 분비를 억제함으로써 생체 내 유사한 효능을 나타냈는데, 이 경우 COLO-357 이종 이식편의 경우가 가장 높았다(도 24b). VEGF의 억제 여부는 ErbB3 인산화의 억제 여부와 상관성이 있다(도 24c). VEGF 분비의 억제 여부는 또한 종양 세포의 신생 혈관 형성의 억제 여부와 상관성이 있다. 특히, 골수종 세포-분비 인자 예를 들어, VEGF 및 bFGF는 신생 혈관 형성을 촉발하는 것으로 확인되었다[예를 들어, Leung와 다수(1989) Science 246(4935): 1306-9; Yen와 다수 (2000) Oncogene 19(31):3460-9 참조].

[0305] 실시예 12: 세포 이동의 억제

[0306] 트랜스-웰 분석법(trans-well assay)을 통하여, Ab #6이, ErbB3을 발현하는 세포(예를 들어, MCF-7 세포)의 이동을 억제하는 능력을 관찰하였다[메사츄세츠주 빌레리카 소재, 밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.), Cat # ECM552]. 우선, MCF-7 세포를 밤새도록 혈청 결핍 조건 하에 두었으며, 이후, 이를 Ab #6(최종 농도 = 8uM)의 존재 또는 부재 하에서 항온 처리하였다(15분, 실온). 이후, 상기 세포를 세포가 이동할 수 있는, 제I형 콜라겐으로 코팅된 막으로 하부 챔버와 분리된 상부 챔버에 옮겼다. 10%의 FBS를 하부 챔버의 배지(즉, Ab #6의 존재 또는 부재 하에 화학적 유인 물질로서 작용을 하는 배지)에 첨가하였다. 상기 챔버를 37°C에서 16시간 동안 항온 처리한 후, 이탈 완충액을 이용함으로써, 이 막을 통과하여 이동한 세포들을 제거하고, 세포-결합 형광 염료와 함께 항온 처리하였다. 형광 평판 판독기를 이용하여 형광도를 정량하였다. 평균 형광도 \pm SEM(n = 2)을 도 25에 나타내었다.

[0307] 도 25에 나타난 바와 같이, 10%의 FBS는 미처리 대조군(라인 1)과 비교하였을 때 세포 이동을 자극하였으며(라인 3), 8uM Ab #6은 FBS 유도 세포 이동을 억제하였다(라인 4).

[0308] 실시예 13: 구상 성장의 억제

[0309] 종양의 성장을 진행시키는 조건과 가까운 조건의 분석법을 통하여, Ab #6이, ErbB3을 발현하는 세포의 구상 성장을 억제하는 능력을 관찰하였다[Herman와 다수 (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication]. AdrR 및 DU145 구상체는, 행잉 드롭법(hanging drop method)을 이용하여 96웰 평판 웰당 1개의 구상체의 빈도수로 개시되었다(Herrman와 다수, 2008). 이후, 도시한 바와 같이, 각각의 회전 타원체를 Ab #6 (최종 농도 = 8uM), 헤레굴린- β 1 EGF 도메인(미네소타주 미네아폴리스 소재, R&D 시스템즈, Cat# 396-HB, 최종 농도 = 3.4nM), 또는 이것들 둘 다를 함께 처리하였다. 제1일과 제13일에, 광학 현미경(10배율)을 사용하여 회전 타원체의 지름을 측정하였다.

[0310] Ab #6은 AdrR 세포 내 회전 타원체 성장을 억제한다(도 26a). 뿐만 아니라, 3.4nM의 HRG는 회전 타원체의 성장을 자극하고, Ab #6은 HRG 효과를 억제한다(도 26b). DU145에서 얻어진 회전 타원체는 실험 13일이 경과한 때에도 크기가 증가하지 않았으나; 성장은 HRG1-베타1에 의해서 상당 수준 자극되었다. 이와 같은 세포 내에서, 8uM의 Ab #6은 HRG 유도성 회전 타원체 성장을 억제하였다(도 26c).

[0311] 실시예 14: 신호 전달의 억제

[0312] Ab #6이, 상이한 리간드에 의해 유도되는 신호 전달 과정을 억제하는 능력에 대해 관찰하였다. 예를 들어, Ab #6이, ErbB3 수용체를 발현하는 AdrR 세포와 HRG 및 BTC의 결합에 미치는 영향력을 테스트하였다. 도 27a 및 27b에 도시한 바와 같이, FACS 분석법을 이용하여, Ab #6이 AdrR 세포와의 결합에 대해 HRG와 경쟁하되, BTC와는 경쟁하지 않음을 확인하였다. 그러므로, HRG와 ErbB3의 결합을 Ab #6이 차단할 경우, HRG에 의해 유도되는 신호 전달 과정이 억제되는 것이다.

[0313] 뿐만 아니라, 다양한 리간드를 대상으로 ErbB3 인산화의 유도에 대해 테스트하였다. 3개의 리간드 즉, HRG, BTC 및 HGF는 AdrR 세포 내에서 ErbB3 유도성 인산화 과정을 자극할 수 있었던 반면에, EGF는 그렇지 못하였다. 도

28에 도시한 바와 같이, Ab #6은 AdR 세포 내에서 HGF 유도성 pErbB3 인산화 과정을 억제하였다(도 28). 뿐만 아니라, 당 업계에 공지된 바와 같이[예를 들어, Wallenius와 다수 (2000) Am J Pathol. 156 (3):821-9 10702398], HGF 신호 전달물은 다양한 상피 종양 및 비-상피 종양에서 상승하였음을 알 수 있었다.

[0314] **ErbB3/cMET 상호 작용 및 이와 같은 상호 작용을 조정함에 있어서 Ab #6의 역할**

[0315] 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 내에서 돌연 변이를 활성화하는 비-소세포 폐암은, MET와 HER3을 재보충하여, PI3K-AKT 세포 생존 경로를 활성화함으로써 티로신 키나제 억제 인자에 대한 내성을 발생시킴을 알 수 있었다 [Engelmann와 다수 (2007) Science 316: 1039-1043; Gou (2007) PNAS: 105(2): 692-697]. EGFR의 돌연 변이가 진행되는 세포주 내 EGFR과 c-MET 사이의 결합 관계는, 복합-면역 침전법(co-immunoprecipitation)에 의해 널리 확립되어 있다[Engelmann와 다수 2007; Gou 2007]. 최근, 구오(Guo)와 다수는, 복합-면역 침전법을 통하여, c-MET와 ErbB3 역시, 증폭된 c-MET에 의존성인 것으로 알려진 위 세포주인 MKN45 내에 복합체의 형태로 존재함을 입증하였다.

[0316] 이와 같은 c-MET-erbB3의 상호 작용은 또한 야생형 EGFR을 보유하는 AdR 세포에서도 일어나며, 이는 증폭된 c-MET와는 독립적이다. 도 28에 도시한 바와 같이, HGF(간세포 성장 인자)는 투여량 의존적 방식으로 AdR 세포 내 ErbB3의 인산화 과정을 유도한다. 뿐만 아니라, Ab #6은 HGF 유도성 erbB3 인산화 과정을 억제한다.

[0317] ErbB1 및 ErbB3 인산화 과정 둘 다에 미치는 HRG 및 BTC의 효과에 관하여도 관찰하였으며, HRG와 BTC는 ErbB1과 ErbB3 둘 다의 인산화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. HRG는 ErbB3 인산화의 보다 강력한 유도 인자인 반면에, BTC는 ErbB1 인산화의 잠재적인 유도 인자였다(도 29). 이와 같은 인산화 과정은 ErbB1 및 ErbB3의 복합체에 의해 유도되는 것으로 판단된다. 간단히 말해서, HRG가 ErbB3에 결합하면, ErbB1과 ErbB3 사이의 복합체 형성을 유도하며, 그 결과, 상기 두 수용체가 활성화되는 것이다. BTC의 경우도 동일한 현상이 관찰되는데, 이 경우, BTC와 ErbB1이 결합하면 ErbB1과 ErbB3 사이의 복합체 형성을 자극하고, 그 결과, ErbB1과 ErbB3 둘 다의 인산화를 유도하는 것이다.

[0318] **리간드(HRG, BTC, EGF 및 HGF) 자극된 ErbB3 인산화의 항체에 의한 억제**

[0319] 다음과 같은 방법에 따라서, Ab #6이, 리간드(HRG, BTC, EGF 및 HGF) 유도성 ErbB3 인산화 과정을 억제하는 능력을 관찰하였다:

- [0320] 1. AdR 세포를, 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지 중 96웰 평판에 30,000 세포/웰/100uL의 밀도로 도말한 후, 이를 밤새도록 생육시키는 단계;
- [0321] 2. 다음날, 상기 배지를 FBS-불포함 배지로 바꾸어 상기 세포를 혈청이 존재하지 않는 조건 하에 두고, 이 세포를 밤새도록 생육시키는 단계;
- [0322] 3. 세포를 상이한 농도의 Ab #6(0.01~100nM) 또는 완충액(대조군)으로 예비 처리하는 단계(2시간);
- [0323] 4. 이후, 상기 세포를 10nM의 HRG 및 HGF로 10분 동안 자극하거나, 또는 10nM의 BTC 또는 EGF로 5분 동안 자극하는 단계;
- [0324] 5. 배양 배지를 제거한 다음, 이 세포를 얼음 냉각 PBS로 1회 세척하여, 상기 반응을 정지시키는 단계;
- [0325] 6. 이후, 상기 세포를, 1× 단백질 분해 효소 억제제 및 1× 포스포타제 억제제와 함께, 25mM Tris(pH +7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 1.0% CHAPS, 10% v/v 글리세롤 중에서 용해하는 단계; 및
- [0326] 7. 제조자의 지침에 따라서, 휴먼 포스포-ErbB3 ELISA 키트(Human Phospho- ErbB3 ELISA kit; 미네소타주 미네아폴리스 소재, R&D Systems, Cat. No. DYC1769)을 사용하여, 세포 용해물 중에서 ErbB3 인산화 여부를 측정하는 단계.

[0327] **항체에 의한 ErbB2-ErbB3 단백질 복합체 형성의 억제**

[0328] AdR 세포를 실온에서 60분 동안 완충액(대조군) 또는 250nM Ab #6과 함께 예비 항온 처리한 후, 이를 10nM HRG 또는 10nM BTC 또는 대조군 완충액으로 10분 동안 처리하였다. 상기 세포를, 0.2mM PMSF, 50mTU/mL 아프로티닌 및 100 uM 루펩틴과 함께, 25 mM Tris, pH+7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 1.0% CHAPS, 10% v/v 글리세롤 중에서 용해한 다음, 미정제 용해물을 간단히 원심 분리하여 불용성 물질을 제거하였다. 상청액을 새로운 에펜도르프 튜브에 옮기고, 항-ErbB3 항체(Santa Cruz sc-285)를 1:500배 희석물로 첨가하였다. 상청액을 4°C에서 가볍게 흔들어주면서 밤새도록 항온 처리하였다. 처음에, 고정화된 단백질 A/G 아가로스 비드(일리

노이주 록포드 소재, 피어스, Cat# 20421) 60ul를 1×PBS로 세척하였다. 세포 용해물-항체 혼합물을 상기 PBS 세척 비드에 첨가한 다음, 이를 4℃에서 가볍게 진탕시키면서 2시간 동안 항온 처리하였다. 이후, 면역 침전물을 얼음 냉각 용해 완충액으로 3회 세척하고, 이를 2×SDS 시료 완충액 30ul 중에 재현탁한 다음, 다시 95℃에서 7분 동안 열 변성시키고 나서, 4~12%의 Bis-Tris 겔 상에서 전개시켰다. SDS-PAGE를 수행한 후, 10% MeOH를 함유하는 Tris-글리신 완충액 중 PVDF 막에 전기 이동시켰다. 상기 막을 10ml의 차단 완충액 중에서 1시간 동안 차단시킨 다음[네브라스카주 링컨 소재, 리-코 바이오사이언시스(Li-Cor Biosciences), Cat# 927-40000], 차단 완충액[리-코 바이오사이언시스, Cat# 927-40000] 10ml 중 1:1000배 희석물의 항-ErbB2 항체[메사쉴레즈주 덴버사 소재, 셀 시그널링 테크놀로지]와 함께 항온 처리하였다. 10ml의 차단 완충액(리-코 바이오사이언시스, Cat# 927-40000) 중 염소 항-토끼 IRDye800(1:5000배(2ul))을 이용하여 신호를 검출하였다.

[0329] Ab #6은 또한 HRG 자극된 ErbB2/3 복합체가 형성되는 것을 완전히 억제하는 것으로 보인다(도 29b).

[0330] 균등 범위

[0331] 당업자는 통상의 실험을 통하여, 본원에 개시된 본 발명의 특정 구체예에 관한 다수의 균등물을 파악하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이와 같은 균등 범위는 이하 청구의 범위에 포함되는 것이다. 종속항에 개시된 구체예를 임의로 조합한 것도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주한다.

[0332] 참고 문헌의 인용

[0333] 본원에 언급된 모든 공보, 특허 및 계류중인 특허 출원들은 그 전문이 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1a과 1b는 염소 항-인간 Alexa 647 이차 항체를 이용하여 MALME-3M 흑색종 세포 상에 발현된 ErbB3에 다양한 항-ErbB3 항체 후보물질(Fab, 여기서 Ab로 나타냄)을 결합시킨 것을 나타낸 막대 그래프이다.

[0026] 도 2a-2d는 다양한 항-ErbB3 항체 후보물질의 K_D 값을 나타낸 그래프이다. 도 2a와 2b는 각각 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법을 이용하여 측정시 항체 #6 (Ab #6으로 나타냄)과 항체 #3 (Ab #3으로 나타냄)의 K_D 값을 나타낸 그래프이다. 도 2c와 2d는 각각 MALME-3M 흑색종 세포를 사용하여 세포 결합 분석법으로 측정했을 때 Ab #6과 Ab #3의 K_D 값을 나타낸 그래프이다.

[0027] 도 3은 ELISA를 이용하여 ErbB3에 대한 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 결합 특이성을 나타낸 그래프이다. EGFR, BSA 및 TGF- α 를 대조군으로 사용하였다.

[0028] 도 4는 ELISA를 이용하여 측정된, 시험관 내 MALME-3M 흑색종 세포에서 총 ErbB3 수준을 감소시키는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타내는 그래프이다.

[0029] 도 5a와 5b는 FACS 분석을 이용하여 측정된, MALME-3M 세포 상에서 ErbB3 수용체를 하향조절시키는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타내는 그래프이다. 도 5a는 항체의 IgG1 아이소타입을 이용한 결과를 나타낸다. 도 5b는 항체의 IgG2 아이소타입을 이용한 결과를 나타낸다.

[0030] 도 6a-6d는 FACS 분석을 이용하여 측정된, 항체 매개성 ErbB3 하향조절의 시간 경과(Ab #6)를 나타낸 그래프이다.

[0031] 도 7은 생체 내 흑색종 세포에서 ErbB3을 하향조절시키는 다양한 항-ErbB3 항체의 역량을 나타낸 막대 그래프이다.

[0032] 도 8은 생체 내 ADRr 이종 이식편에서 ErbB3을 하향조절시키는 항-ErbB3 항체(Ab #6)의 역량을 나타낸 막대 그래프이다.

[0033] 도 9는 세포 적정 발광 분석법(Cell Titer Glow Assay)에서 MALME-3M 세포의 증식을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타낸 그래프이다.

[0034] 도 10은 난소 세포주 ADRr에서 세포 증식을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타낸 그래프이다. .

[0035] 도 11은 ACHN 세포의 증식을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타낸 그래프이다.

[0036] 도 12는 생체 내 ADRr 이종 이식편에서 ErbB3 인산화를 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타낸 그래프이다.

- [0037] 도 13a-13c는 ADRr 세포에서 ErbB3의 베타셀룰린 및 헤레글린 매개성 인산화를 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab # 6)의 역량을 나타낸 그래프이다.
- [0038] 도 14a-14b는 난소 종양 세포주 OVCAR 5와 OVCAR 8에서 ErbB3 인산화를 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6 IgG2 아이소타입)의 역량을 나타낸 그래프이다.
- [0039] 도 15a-15c는 ErbB1 음성 MALME-3M 세포에 대한 결합 부족에 의해 나타난 베타셀룰린 (BTC)의 ErbB1에 대한 결합 역량 (도 17a); 10 nM (도 17b)와 200 nM (도 17b)의 각 농도에서 ErbB1 양성 ADRr 세포에의 결합 역량과, 어비투스(어비투스)에 의한 이러한 결합의 억제를 나타낸 그래프이다.
- [0040] 도 16a-16b는 MALME-3M 세포에서 헤레글린 매개성 신호 전달을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6 IgG2 아이소타입)의 역량을 나타낸 그래프이다. 도 16a는 MALME-3M 세포에서 ErbB3의 헤레글린 매개성 인산화를 억제하는 Ab #6의 역량을 나타낸 그래프이며, 도 16b는 MALME-3M 세포에서 AKT의 인산화를 억제하는 Ab #6의 역량을 나타낸 그래프이다.
- [0041] 도 17a-17d는 동종 이식 연구를 통한 (A) 난소 (ADRr 세포), (B) 전립선 (Du145 세포), (C) 난소 (OvCAR8 세포) 및 (D) 췌장 (Co1o357 세포) 종양 성장을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 역량을 나타내는 그래프이다.
- [0042] 도 18a와 18b는 FACS 분석을 이용하여 측정된, MALME-3M 세포에서 ErbB3에 대한 헤레글린의 결합을 억제하는 Ab #6 (도 18a) 및 Ab #3(Fab) (도 18b)의 역량을 나타낸 그래프이다.
- [0043] 도 19a와 19b는 ADRr 세포에서 ErbB3에 대한 에피레글린의 결합을 억제하는 Ab #6의 역량을 나타낸 그래프이다. 도 19a는 ADRr 세포에 대한 에피레글린의 결합을 나타내며, 도 19b는 ADRr 세포에 대한 에피레글린의 결합을 억제하는 어비투스 및 Ab #6 양자의 역량을 나타낸다.
- [0044] 도 20a와 20b는 ADRr 세포에서 ErbB와 결합하는 헤파린 결합 상피세포 성장 인자 (HB-EGF)의 역량 (도 20a)과 이러한 결합을 억제하는 항-ErbB3 항체 (Ab #6)의 무력화 역량 (도 20b)을 나타낸 그래프이다.
- [0045] 도 21a-21c는 항체 Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 및 Ab #19의 중쇄 및 경쇄 가변부의 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0046] 도 22a-22b는 항체 Ab #6, Ab #3 및 Ab #14의 중쇄 및 경쇄 가변부의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.
- [0047] 도 23은 상응하는 해당 생식세포 아미노산 서열로 복귀된 항체 Ab #6, Ab #17 및 Ab #19의 경쇄 가변부의 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산 잔기 변화는 밑줄로 나타내었다.
- [0048] 도 24a-24c는 종양 세포의 VEGF 분비를 억제하는 Ab #6의 역량을 보여주는 그래프이다.
- [0049] 도 25는 세포 이동에 있어서 Ab #6의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0050] 도 26a-26c는 (A) ADRr 세포에서의 구상 성장의 억제, (B) ADRr 세포에서의 HRG 유발성 구상 성장의 억제 및 (C) Du145 세포에서의 HRG 유발성 구상 성장의 억제를 보여주는 그래프이다.
- [0051] 도 27a와 27b는 ADRr 세포에 대한 (A) HRG 결합 및 (B) BTC 결합에 대한 Ab #6의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0052] 도 28은 HGF 유발성 ErbB3 인산화에 대한 Ab #6의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0053] 도 29a와 29b는 (A) pErbB1과 pErbB3의 인산화 및 (B) HRG 유발성 ErbB2/3 복합체 형성에 대한 Ab #6의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0054] 도 30은 ErbB3의 아미노산 잔기 20-202와 결합하는 Ab #6을 보여주는 그래프이다.

[0055] **발명의 상세한 설명**

[0056] 본 발명의 보다 용이한 이해를 위하여 특정 용어들을 먼저 정의한다. 추가의 정의들은 발명의 상세한 설명을 통해 기재된다.

[0057] **I. 정의**

[0058] 본원에서 호환되어 사용되는 "ErbB3", "HER3", "ErbB3 수용체" 및 "HER3 수용체"라는 용어들은, 미국특허 제 5,480,968호 및 문헌[Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4905-4909 (1990)]에 기술된 바와 같은 인간 ErbB3 단백질을 지칭한다(문헌[Kani et al., *Biochemistry* 44:15842-857 (2005)], [Cho and Leahy,

Science 297:1330-1333 (2002)]도 참조한다).

- [0059] 본원에서 사용된 "EGF-유사 리간드"라는 용어는 상피세포 성장 인자 (EGF)와 이와 밀접하게 관련있는 단백질, 예컨대 변형 성장 인자- α (TGF- α), 베타셀룰린 (BTC), 헤파린 결합 상피세포 성장 인자 (HB-EGF), 비레굴린 (BIR) 및 암피레굴린 (AR)를 포함하는 상피세포 성장 인자 수용체 (EGFR)의 리간드를 지칭하는데, 이들은 세포 표면의 EGFR에 결합하여 수용체 고유의 단백질-티로신 키나아제 활성을 촉진한다. 특히, EGF-유사 리간드는 EGFR (ErbB1로도 지칭함)과 ErbB3 단백질 복합체의 형성을 유도하여(예를 들어, 문헌[Kim et al., (1998) *Biochem J.*, 334:189-195] 참조), 복합체 내의 티로신 잔기의 인산화를 유도한다.
- [0060] 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합부는 ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제하며, 특정 실시 양태에서, 하기의 추가적인 특성을 하나 이상 가진다: (i) 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 및 비레굴린(BIR) 중 하나 이상으로 매개된 ErbB3을 통한 신호전달의 억제; (ii) ErbB3을 발현하는 세포의 증식 억제; (iii) 세포 표면에서 ErbB3의 수준을 감소시키는 역량; (iv) ErbB3을 발현하는 세포의 VEGF 분비 억제; (v) ErbB3을 발현하는 세포의 이동 억제; (vi) ErbB3을 발현하는 세포의 구상 성장 억제; 및/또는 (vii) ErbB3의 도메인 I 상에 위치한 에피토프, 예를 들어, ErbB3의 아미노산 서열의 잔기 20-202를 포함하거나 이에 걸쳐있는 에피토프에 대한 결합.
- [0061] 본원에서 "억제"라는 용어는 활성을 완전히 차단하는 것을 비롯하여, 생물학적 활성에 있어서 통계적으로 유의한 정도로 감소했음을 지칭한다. 예를 들어, "억제"는 생물학적 활성에 있어서 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%가 감소되었음을 가리킨다.
- [0062] 따라서, 본원에서 "ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화의 억제"라는 말은 아무런 처리를 하지 않은 (대조군) 세포에서의 인산화에 비해서, EGF-유사 리간드에 의해 유도된 ErbB3의 인산화를 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 항원 결합부의 역량을 가리킨다. ErbB3을 발현하는 세포는 자연 발생적인 세포 또는 세포주일 수 있거나, 숙주 세포 내로 ErbB3을 코딩하는 핵산을 도입함으로써 재조합 생성될 수 있다. 한 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는, 예를 들어, 문헌[Kim et al., (1998) *Biochem J.*, 334:189-195]과 아래의 실시예들에서 기술된 바와 같이 항-포스포티로신 항체를 이용한 탐침을 수반하는 웨스턴 블롯팅에 의해 측정하였을 때, ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 100%까지 억제한다.
- [0063] 본원에서 "ErbB3을 통한 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린 매개성 신호 전달의 억제"라는 말은 항체의 부재 하(대조군)의 신호 전달과 비교하여, ErbB3을 통한 ErbB3 리간드 (예를 들어, 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 및 비레굴린)로 매개된 신호 전달을 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 이는 ErbB3을 발현하는 세포 내에서 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 및 비레굴린 중 하나 이상에 의해 매개된 신호 전달이, 대조군(항체 없음)과 비교하여, 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 하에서 통계적으로 유의한 정도로 감소된다는 것을 의미한다. ErbB3-리간드 매개성 신호 전달은 ErbB3 기질 및/또는 ErbB3이 관계된 세포의 일련의 단계적인 반응에서 존재하는 단백질의 수준 또는 활성에 대해 분석함으로써 측정될 수 있다. 한 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는, ErbB3 기질 및/또는 ErbB3이 관계된 세포의 일련의 단계적인 반응에서 존재하는 단백질의 수준 또는 활성을, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합부의 부재 하(대조군)에서의 수준 또는 활성에 비하여 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 100%까지 감소시킨다. 이러한 ErbB3-리간드 매개성 신호 전달은 ErbB3 기질(예를 들어, SHC 또는 PI3K)의 수준 또는 활성을 측정하는 당업계에 공지된 기법을 이용하거나, 또는 ErbB3이 관계된 세포의 일련의 단계적인 반응에서 존재하는 단백질(예를 들어, AKT)의 수준 또는 활성을 이러한 단백질에 대한 키나아제 분석법을 이용하여 측정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Horst et al. 상기와 동일], [Sudo et al. (2000) *Methods Enzymol.*, 322:388-92]; 및 [Morgan et al. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191:761-767] 참조).
- [0064] 특정 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3에 대한 ErbB3-리간드 (예를 들어, 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린) 결합을 저해함으로써, ErbB3을 통한 ErbB3-리간드 (예를 들어, 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린) 매개성 신호 전달을 억제한다. 일부 리간드 (예를 들어, 비레굴린 즉 BIR)는 ErbB3 유사 리간드 (즉, ErbB3에 결합) 뿐 아니라 EGF-유사 리간드 (즉, EGFR/ErbB1에 결합)로서도 작용한다.
- [0065] 본원에서 "ErbB3에 대한 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린의 결합의 억제"라는 말은, 항체 부재 하(대조군)에서의 결합에 비하여 ErbB3 리간드 (예를 들어, 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레

굴린)의 ErbB3에 대한 결합을, 통계적으로 유의한 정도까지 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 이는 ErbB3에 결합하는 ErbB3-리간드 (예를 들어, 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)의 양이 대조군(항체 없음)에 비하여 항체 또는 이의 항원 결합부가 존재할 경우에 통계적으로 유의한 정도로 감소된다는 것을 의미한다. ErbB3에 결합하는 ErbB3-리간드의 양은 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 하에서, 그것이 부재(대조군)하는 경우의 양에 비해, 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 100%까지 감소될 수 있다. ErbB3-리간드 결합의 감소는 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 또는 부재(대조군)하에, ErbB3을 발현하는 세포에 대하여 표지된 ErbB3-리간드 (예를 들어, 방사선 표지된 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)의 결합 수준을 측정하는 당업계에 알려진 기법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0066] 본원에서 "ErbB3을 발현하는 세포의 증식 억제"라는 말은 항체의 부재 하의 증식에 비하여 ErbB3을 발현하는 세포의 증식을 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 한 실시 양태에서, ErbB3을 발현하는 세포 (예를 들어, 암세포)의 증식은, 이 세포를 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부와 접촉시킨 경우, 항체 또는 이의 항원 결합부의 부재(대조군) 하에 측정된 증식 정도에 비해 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 100%까지 감소될 수 있다. 세포 증식 정도는 세포 분열 속도, 세포 분열을 진행 중인 세포 군집 내의 세포 분획, 및/또는 말단 분화 또는 세포 사멸로 인한 세포 군집의 세포 손실율을 측정하는 당업계에 알려진 기법(예를 들어, 세포 적정 발광 분석법 또는 티미딘 도입)을 이용하여 분석될 수 있다.

[0067] 본원에서 "세포 표면에서 ErbB3 수준을 감소시키는 역량"이라는 말은 처리되지 않은 (대조군) 세포에 비해 항체에 노출된 세포 표면에서 발견되는 ErbB3의 양을 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 예를 들어, 세포 표면에서의 ErbB3 수준의 감소는 ErbB3의 세포 내 함입의 증가(또는 ErbB3 세포 이물 흡수의 증가)로부터 기인할 수 있다. 한 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는, 그것이 부재(대조군)하는 경우의 세포 표면 발현 또는 세포 내 함입에 비하여, ErbB3의 세포 표면 발현을 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상 또는 100%까지 감소시키고/감소시키거나, ErbB3 수용체의 세포 내 함입을 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상 또는 100%까지 증가시킨다. 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 및 부재 하에서, 세포 표면에서의 ErbB3 세포 및/또는 ErbB3 수용체의 세포 내 함입 수준은 당업계에 알려진 기법, 예컨대 문헌[Horst et al., 상기 동일] 및 본원의 실시예들에 기술된 기법을 사용하여 용이하게 측정될 수 있다.

[0068] 본원에서 "ErbB3을 발현하는 세포의 VEGF 분비 억제"라는 말은 항체의 부재 하에 있어서 VEGF 분비에 비해, ErbB3을 발현하는 세포의 VEGF 분비를 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 한 실시 양태에서, ErbB3을 발현하는 세포(예컨대, 암세포)의 VEGF 분비는, 이 세포를 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부와 접촉시키는 경우, 항체 또는 이의 항원 결합부가 부재(대조군)하는 경우에 측정된 VEGF 분비 정도에 비하여, 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상 또는 100%까지 감소될 수 있다. VEGF 분비는 본원에 기술된 것과 같은 당업계에 알려진 기법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0069] 본원에서 "ErbB3을 발현하는 세포의 이동 억제"라는 말은 항체의 부재 하에 있어서의 세포의 이동에 비해, ErbB3을 발현하는 세포의 이동을 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 한 실시 양태에서, ErbB3을 발현하는 세포(예컨대, 암세포)의 이동은, 이 세포를 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부와 접촉시키는 경우, 항체 또는 이의 항원 결합부가 부재(대조군)하는 경우에 측정된 세포 이동에 비하여, 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상 또는 100%까지 감소될 수 있다. 세포 이동은 본원에 기술된 것과 같은 당업계에 알려진 기법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0070] 본원에서 "ErbB3을 발현하는 세포의 구상 성장 억제"라는 말은 항체의 부재(대조군)하에 있어서의 세포의 이동에 비해, ErbB3을 발현하는 세포의 이동을 통계적으로 유의한 정도로 감소시키는 항체 또는 이의 항원 결합부의 역량을 지칭한다. 한 실시 양태에서, ErbB3을 발현하는 세포(예컨대, 암세포)의 이동은, 이 세포를 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부와 접촉시키는 경우, 항체 또는 이의 항원 결합부가 부재(대조군)하는 경우에 측정된 이동에 비하여, 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상 또는 100%까지 감소될 수 있다. 세포의 이동은 본원에 기술된 것과 같은 당업계에 알려진 기법을 사용하여 측정될 수 있다. 본원에서 호환되어 사용되는 "항체" 또는 "면역글로

불린"이라는 용어는 전항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원 결합부") 또는 이의 단일 사슬을 포함한다. "항체"는 이항화 결합에 의해 내부 결합된 2개 이상의 중쇄(H) 및 경쇄(L)를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변부(본원에서는 V_H 로 약칭함)와 중쇄 불변부로 이루어진다. 중쇄 불변부는 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각 경쇄는 경쇄 가변부(본원에서는 V_L 로 약칭함)와 경쇄 불변부로 이루어진다. 경쇄 불변부는 하나의 도메인 CL로 이루어진다. V_H 와 V_L 영역은 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는 영역과 여기에 산재된 보다 보존된 영역인 골격 영역(FR)이라는 과변이(hypervariability) 영역들로 추가로 세분될 수 있다. V_H 와 V_L 각각은 3개의 CDR과 4개의 FR로 이루어지며, 이는 아미노 말단에서 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 중쇄 및 경쇄 가변부는 항원과 접촉하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변부는 면역 체계를 갖는 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포) 및 고전적인 보체계의 1차 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자들에 대한 면역글로불린의 결합을 조절할 수 있다. 본 발명의 대표적인 항체는 항체 #1, #3 및 #14, 그리고 이의 항원 결합부를 포함한다.

[0071]

본원에서 항체의 "항원 결합부"(또는 간단히 "항체부")라는 용어는 항원(예를 들어, ErbB3)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편들에 의해 수행되는 것으로 밝혀졌다. 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예로서는 (i) V_L , V_H , CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 경첩 부위에서 이항화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 와 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 dAb 단편; (vi) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편(문헌[Ward et al., (1989) *Nature* 341, 544-546]); (vii) V_H 또는 V_L 도메인으로 이루어진 dAb 단편; 및 (viii) 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (ix) 합성 링커에 의해 결합될 수 있는 2종 이상의 단리된 CDR의 조합물을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두 도메인 V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 V_L 및 V_H 영역이 쌍으로 1가의 분자(단쇄 Fv (scFv)로서 알려짐; 예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988) *Science* 242, 423-426]; 및 [Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 5879-5883]을 참조)를 만드는 단일 단백질 사슬로서 형성되도록 해주는 합성 링커를 이용하여 재조합법에 의해 결합될 수 있다. 이러한 단쇄 항체도 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 포함된다. 이러한 항체 단편은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 사용하여 수득되며, 그 단편은 온전한 항체와 동일한 방법으로 사용하기 위해 스크리닝된다. 항원 결합부는 온전한 면역글로불린의 재조합 DNA 기법, 즉 효소적 또는 화학적 분해에 의해 제조될 수 있다.

[0072]

본원에서 "단일클론 항체"라는 용어는 실질적으로 균질한 항체의 군집으로부터 수득된 항체, 즉 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생적인 돌연변이를 제외하고 동일한 군집을 포함하는 개별 항체를 지칭한다. 단일클론 항체는 매우 특이적이어서, 하나의 항원성 부위에 유도된다. 또한, 서로 다른 결정 부위(에피토프)에 대해 유도되는 서로 다른 항체를 포함하는 통상적인(다클론성) 항체 조제물과는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 하나의 결정 부위로 유도된다. 단일클론 항체는 당업계에 알려진 기법 및 본원에 기술된 방법 예컨대, 예를 들어, 하이브리도마 기법(문헌[Kohler et al. (1975) *Nature*, 256:495]에 기술됨), 트랜스게닉 동물(예를 들어, 문헌[Lonberg, et al. (1994) *Nature*, 368(6474): 856-859] 참조), 재조합 DNA 기법(예를 들어, 미국특허 제4,816,567호 참조), 또는 예를 들어, 문헌[Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기술된 방법으로 파지 항체 라이브러리를 이용하는 방법으로 제조될 수 있다. 단일클론 항체는 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체를 포함하며 자연적으로 발생되거나 재조합 생성될 수 있다.

[0073]

"재조합 항체"라는 용어는 재조합 방법, 예컨대 (a) 면역글로불린 유전자(예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자)가 유전자이식 또는 염색체변형(transchromosomal)된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체 또는 이로부터 제조된 하이브리도마, (b) 예를 들어, 이입세포(transfectoma)로부터 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체, (c) 파지 디스플레이를 이용하여 재조합체, 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 항체 서열을 포함하는 라이브러리)로부터 단리된 항체, 및 (d) 다른 DNA 서열에 면역글로불린 유전자 서열(예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자)을 스플라이싱하는 단계를 수반하는 임의의 기타 방법에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같은, 재조합 기법에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 일컫는다. 이러한 재조합 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열에서 유래된 가변부 및 불변부를 가질 수 있다. 그러나, 특정 실시 양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이 과정을 거칠 수 있어, 재조합 항체의 V_H 및 V_L

영역의 아미노산 서열은 비록 그것이 인간 생식세포 V_H 및 V_L 서열로부터 유래하여 연관성이 있다 하더라도, 생체 내 인간 항체 생식세포 레파토리 내에서는 자연적으로 존재할 수 없는 서열일 수 있다.

[0074] "키메라 면역글로불린" 또는 키메라 항체는 가변부가 첫번째 종에서 유래하고 불변부는 두번째 종에서 유래하는 면역글로불린 또는 항체를 지칭한다. 키메라 면역글로불린 또는 항체는 예를 들어 유전 공학 기법에 의해 서로 다른 종에 속하는 면역글로불린 유전자 단편으로부터 구축될 수 있다.

[0075] 본원에서 "인간 항체"라는 용어는 예를 들어, Kabat 등에 의해 기술된 바와 같이, 골격 영역 및 CDR 영역 모두가 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변부를 갖는 항체를 포함한다(문헌[Kabat, et al. (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조). 또한, 항체가 불변부를 포함하는 경우, 이 불변부도 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 인간 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 또는 생체 내 체성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나, 본원에서 "인간 항체"라는 용어는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 생식세포로부터 유래된 CDR 서열이 인간 골격 서열 상에 그래프트된 항체를 포함하지는 않는다.

[0076] 인간 항체는 아미노산 잔기, 예를 들어, 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 활성 증진 아미노산 잔기로 치환된 하나 이상의 아미노산을 가질 수 있다. 보통, 인간 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열의 일부가 아닌 아미노산 잔기로 치환된 20개 이하의 부위를 가질 수 있다. 특정 실시 양태에서, 이러한 치환은 하기 상세히 기술된 것과 같이 CDR 영역 내에서 이루어진다.

[0077] "인간화 면역글로불린" 또는 "인간화 항체"라는 용어는 하나 이상의 인간화 면역글로불린 또는 항체 사슬(즉, 하나 이상의 인간화 경쇄 또는 중쇄)을 포함하는 면역글로불린 또는 항체를 일컫는다. "인간화 면역글로불린 사슬" 또는 "인간화 항체 사슬"(즉, "인간화 면역글로불린 경쇄" 또는 "인간화 면역글로불린 중쇄")이라는 용어는 실질적으로 인간 면역글로불린 또는 항체 유래의 가변 골격 영역과, 실질적으로 인간이 아닌 면역글로불린 또는 항체 유래의 상보성 결정 영역(CDR)(예를 들어, 하나 이상의 CDR, 바람직하게는 2개의 CDR, 보다 바람직하게는 3개의 CDR)을 포함하는 가변부를 가지며, 추가로 불변부(예를 들어, 경쇄의 경우, 하나 이상의 불변부 또는 이의 부분, 그리고 바람직하게는 중쇄의 경우 3개의 불변부)를 포함하는 면역글로불린 또는 항체 사슬(즉, 각각 경쇄 또는 중쇄)을 지칭한다. "인간화 가변부"(예를 들어, "인간화 경쇄 가변부" 또는 "인간화 중쇄 가변부")라는 용어는 실질적으로 인간 면역글로불린 또는 항체 유래의 가변 골격 영역과, 실질적으로 인간이 아닌 면역글로불린 또는 항체 유래의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 가변부를 지칭한다.

[0078] "이중 특이성" 또는 "이기능성 항체"는 2개의 서로 다른 중쇄/경쇄 쌍과 2개의 서로 다른 결합 부위를 갖는 인공적인 하이브리드 항체이다. 이중 특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 결합을 포함하는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Songsivilai & Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79, 315-321]; [Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148, 1547-1553]을 참조한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명에 따른 이중 특이적 항체는 ErbB3 및 IGF1-R(즉, 인슐린 유사 성장 인자 1-수용체) 양자 모두에 대한 결합 부위를 포함한다. 또다른 실시 양태에서, 본 발명에 따른 이중 특이적 항체는 ErbB3 및 C-MET 양자 모두에 대한 결합 부위를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 이중 특이적 항체는 ErbB3에 대한 결합부위와, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFR, 루이스 Y, MUC-1, EpCAM, CA125, 전립선 특이적 막 항원, PDGFR- α PDGFR- β C-KIT, 또는 임의의 FGF 수용체에 대한 결합 부위를 포함한다.

[0079] 본원에서, "이중 항체"는 이러한 항체를 생성하는 인간이 아닌 트랜스게닉 유기체 또는 트랜스게닉 식물과 관련하여 정의된다.

[0080] 본원에서 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 가진 다른 항체가 실질적으로 존재하지 않는 항체를 지칭한다(예를 들어, ErbB3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 ErbB3 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 존재하지 않는다). 또한, 단리된 항체는 통상 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다. 본 발명의 한 실시 양태에서, 상이한 ErbB3 결합 특이성을 갖는 "단리된" 단일클론 항체의 조합물은 매우 특징적인 조성으로 혼합된다.

[0081] 본원에서, "아이소타입"은 중쇄 불변부 유전자에 의해 코딩되는 항체 부류(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 일컫는다. 한 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, 또는 IgE 항체 아이소타입으로부터 선택된 아이소타입이다. 일부 실시 양태에서, 본 발명의 단일클론 항체는 IgG1 아이소타입이다. 다른 실시 양태에서, 본 발명의 단일클론 항체는 IgG2 아이소타입이다.

- [0082] 본원에서, "아이소타입 스위칭(switching)"은 하나의 Ig 부류로부터 다른 하나의 Ig 부류로 항체의 부류 또는 아이소타입이 변화하는 것을 일컫는다.
- [0083] 본원에서, "스위칭되지 않은 아이소타입"은 아이소타입 스위칭이 발생하지 않은 경우에 생성된 중쇄의 아이소타입 부류를 가리킨다. 스위칭되지 않은 아이소타입을 코딩하는 CH 유전자는 통상 기능적으로 재배열된 VDJ 유전자로부터 바로 아래 부분의 첫번째 CH 유전자이다. 아이소타입 스위칭은 고전적 또는 비고전적 아이소타입 스위칭으로 분류된다. 고전적 아이소타입 스위칭은 항체를 코딩하는 유전자에서 하나 이상의 스위치 서열 영역이 관여되는 재조합 이벤트에 의해 발생한다. 비고전적 아이소타입 스위칭은 예를 들어, 인간 σ_{μ} 와 인간 Σ_{μ} 사이의 동종 재조합에 의해 발생할 수 있다(8-연관 결실). 대안적인 비고전적 스위칭 기작, 예컨대 여러 방법들 중에서 도입유전자 내(intertransgene) 및/또는 염색체 내(interchromosomal) 재조합을 일으켜 아이소타입 스위칭을 유효화시킬 수 있다.
- [0084] 본원에서, "스위치 서열"이라는 용어는 스위치 재조합을 담당하는 DNA 서열을 가리킨다. "스위치 도너(donor)" 서열은 통상 μ 스위치 영역으로, 스위치 재조합 도중 결실될 구축물 영역의 5'(즉, 상류부)일 것이다. "스위치 수용체" 영역은 결실될 구축물 영역과 치환 불변 영역(예를 들어, γ , ϵ 등) 사이에 존재할 것이다. 재조합이 항상 일어나는 특정 부위가 없기 때문에, 최종 유전자 서열은 통상 구축물로부터 예측가능하지 않다.
- [0085] "항원"은 항체 또는 이의 항원 결합부가 결합하는 실체(예를 들어, 단백질성 실체 또는 펩타이드)이다. 본 발명의 다양한 실시 양태에서, 항원은 ErbB3 또는 ErbB3 유사 분자이다. 본 발명에 따른 특정 실시 양태에서, 항원은 인간 ErbB3이다.
- [0086] "에피토프" 또는 "항원 결정기"라는 용어는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 말한다. 에피토프는 단백질의 3차 접힘에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 양자 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 보통 변성 용매에 노출시 유지되는 반면에, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 보통 변성 용매로 처리시 손상된다. 에피토프는 통상 하나의 독특한 공간 구조 내에 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 또는 15개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 구조를 결정하는 방법으로서의 당업계에서 공지된 기법 및 본원에 기술된 방법, 예를 들어 x-선 결정학 및 2차원 핵자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌[*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)]을 참조한다.
- [0087] 본 발명의 항체, 즉 ErbB3으로의 결합에 대해 경쟁하는 항체와 동일하거나 중첩하는 에피토프에 결합하거나, 또는 본원에 기술된 항체에 의해 결합된 에피토프와 중첩하는 에피토프, 즉 ErbB3의 도메인 I 상에 위치한 에피토프와 결합하는 항체도 본 발명에 포함된다. 동일한 에피토프를 인식하는 항체는 통상적인 기법, 예컨대, 표적 항원에 다른 항체의 결합을 차단하는 항체의 역량을 보여주는 면역분석법, 즉 경쟁적 결합 분석법을 사용하여 동정될 수 있다. 경쟁적 결합은 시험 중인 면역글로불린이 ErbB3과 같은 혼한 항원에 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 분석에서 측정된다. 다양한 유형의 경쟁적 결합 분석법, 예를 들어, 고체상 직접 또는 간접 방사능 면역분석법 (RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역분석법 (EIA), 샌드위치 경쟁 분석법 (문헌[Stahli et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242] 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA (문헌[Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614] 참조); 고체상 직접 표지 분석법, 고체상 직접 표지 샌드위치 분석법 (문헌[Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press] 참조); I-125 표지를 이용한 고체상 직접 표지 RIA (문헌[Morel et al., (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7] 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA (문헌[Cheung et al., (1990) *Virology* 176:546]); 및 직접 표지 RIA (문헌[Moldenhauer et al., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77])가 공지되어 있다. 통상, 이러한 분석법은 비표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 기준 면역글로불린 중 어느 하나를 갖는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원(예를 들어, ErbB3)의 사용을 수반한다. 경쟁적 억제는 시험 면역글로불린의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 측정함으로써 판단할 수 있다. 보통 시험 면역글로불린은 초과량으로 존재한다. 일반적으로, 경쟁 항체가 초과량으로 존재하는 경우에는 보통의 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합이 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% 또는 그 이상까지 억제될 것이다.
- [0088] 본원에서, "특이적 결합", "특이적으로 결합한다", "선택적 결합" 및 "선택적으로 결합한다"라는 말은 항체 또는 이의 항원 결합부가 특정 항원 또는 에피토프에 대해 뚜렷한 친화도를 나타내며, 일반적으로 다른 항원 및 에피토프와는 유의한 교차 반응성을 나타내지는 않는다는 것을 의미한다. "뚜렷한" 또는 바람직한 결합은 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹ 이상 또는 10^{10} M⁻¹ 이상의 친화도를 갖는 결합을 포함한다. 10^7 M⁻¹ 초과, 바람직하게는 10^8 M⁻¹

조과의 친화도가 보다 바람직하다. 본원에 기재된 친화도의 중간값도 본 발명의 범위 내에 포함되며, 바람직한 결합 친화도는 일정 범위의 친화도, 예를 들어, 10^6 내지 10^{10} M^{-1} , 바람직하게는 10^7 내지 10^{10} M^{-1} , 보다 바람직하게는 10^8 내지 10^{10} M^{-1} 로서 표시될 수도 있다. "유의한 교차 반응성을 나타내지 않는" 항체는 바람직하지 않은 실체(예를 들어, 바람직하지 않은 단백질성 실체)에 뚜렷이 결합하지 않는 항체이다. 예를 들어, 한 실시 양태에서, ErbB3에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합부는 그 ErbB3 분자에는 명백하게 결합하겠지만 다른 ErbB 분자와 비-ErbB 단백질 또는 펩타이드와는 유의하게 반응하지 않을 것이다. 특이적 또는 선택적 결합은 이러한 결합을 측정하는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 스캐차드(Scatchard) 분석법 및/또는 경쟁적 결합 분석법에 따라 측정될 수 있다.

[0089] 본원에서 " K_D "라는 용어는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수 또는 항원에 대한 항체의 친화도를 지칭한다. 한 실시 양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합부는 표면 플라즈몬 공명 분석법 또는 세포 결합 분석법을 이용하여 측정했을 때, 50 nM 또는 더 나은 (즉, 50 nM 이하) (예를 들어, 40 nM 또는 30 nM 또는 20 nM 또는 10 nM 또는 그 이하) 친화도(K_D)를 갖는 항원 (예를 들어, ErbB3)과 결합한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합부는 표면 플라즈몬 공명 분석법 또는 세포 결합 분석법을 이용하여 측정했을 때, 8 nM 또는 더 나은 (예를 들어, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 2 nM, 1.5 nM, 1.4 nM, 1.3 nM, 1nM 이하) 친화도(K_D)를 갖는 ErbB3과 결합한다. 다른 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 분석대상물질로서 재조합 ErbB3을, 리간드로서 항체를 사용하는 BIACORE 3000 기구에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술로 측정시 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M , 10^{-9} M , 또는 10^{-10} M 이하의 친화도(K_D)를 갖는 항원 (예를 들어, ErbB3)과 결합하며, 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합 친화도의 2배 이상의 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다.

[0090] 본원에서 " K_{off} "라는 용어는 항체/항원 복합체로부터의 항체 해리에 대한 손실 상수(off rate constant)를 지칭한다.

[0091] 본원에서 "EC50"이라는 용어는 시험관 내 또는 생체 내 분석법에서 최대 반응의 50%, 즉 최대 반응과 최저 반응의 중간 정도인 반응을 유도해내는, 항체 또는 이의 항원 결합부의 농도를 일컫는다.

[0092] 본원에서, "당화 패턴"이라는 것은 단백질, 보다 구체적으로는 면역글로불린 단백질에 공유결합되는 탄수화물 단위의 패턴으로 정의된다.

[0093] 본원에서 대상물에 적용된 "자연 발생적인"이라는 용어는 대상물이 자연에서 찾을 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 자연상의 공급원으로부터 분리될 수 있는 유기체(바이러스 포함)에 존재하며 실험실에서 인가에 의해 의도적으로 조작되지 않은 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열이 자연 발생적인 것이다.

[0094] 본원에서 "재배열된"이라는 용어는 V 세그먼트가 완전한 V_H 또는 V_L 도메인을 본질적으로 코딩하는 구조의 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하여 위치한 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 자위(locus)의 배치를 일컫는다. 재배열된 면역글로불린 유전자 자위는 생식세포 DNA와의 비교에 의해 확인될 수 있으며; 재배열된 자위는 하나 이상의 재조합된 칠량체/구량체 동종 성분을 가질 것이다.

[0095] 본원에서 V 세그먼트와 관련하여 사용된 "재배열되지 않은" 또는 "배선형(germline) 배치"라는 용어는 V 세그먼트를 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접시키기 위해 재조합하지 않은 배치를 지칭한다.

[0096] 본원에서 "핵산 분자"라는 용어는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.

[0097] 본원에서 ErbB3에 결합하는 항체 또는 항체부(예를 들어, V_H , V_L , CDR3)와 관련하여 사용된 "단리된 핵산 분자"라는 용어는 항체 또는 항체부를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이, ErbB3 이외에 항원에 결합하는 항체를 코딩하는 다른 뉴클레오타이드 서열, 즉 인간 유전체 DNA에서 핵산을 자연적으로 플랭킹할 수 있는 다른 서열이 존재하지 않는 핵산 분자를 지칭한다.

[0098] 본원에서 "조작" 또는 "변형"이라는 용어는 항체 또는 이의 항원 결합부에서 하나 이상의 아미노산을 변화시키는 것을 지칭한다. 이러한 변화는 하나 이상의 자리에 아미노산의 부가, 치환 또는 결실에 의해 야기될 수 있다. 그 변화는 PCR 돌연변이 유발법과 같은 공지된 기법을 사용하여 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 동정된 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3에 대한 항체 또는 이의 항원

결합부의 결합 친화도를 조작하여 변형될 수 있다.

- [0099] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 서열에 있어서 "보존적 아미노산 치환"이라는 개념을 포함하는데, 이는 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되거나 아미노산 서열을 포함하는 항체의 항원, 즉 ErbB3에 대한 결합력에는 영향을 주지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열이다. 보존적 아미노산 치환은 한 부류의 하나의 아미노산을 동일한 부류의 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는데, 여기서 하나의 부류라는 것은 예를 들어, 표준 데이호프 (Dayhoff) 진동수 교환 매트릭스 또는 BLOSUM 매트릭스로 측정했을 때, 자연에서 찾아질 수 있는 동종 단백질에 있어서 공통적인 물리화학적 아미노산 측쇄 특성과 높은 치환 빈도수로 규정된다. 일반적인 아미노산 측쇄는 6 가지의 군으로 나뉘어 있으며, 여기에는 I군 (Cys); II군 (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); III군 (Asn, Asp, Gln, Glu); IV군 (His, Arg, Lys); V군 (Ile, Leu, Val, Met); 및 VI군 (Phe, Tyr, Trp)이 포함된다. 예를 들어, Asn, Gln, 또는 Glu와 같은 다른 III군 잔기에 대한 Asp의 치환은 보존적 치환이다. 따라서, 항-ErbB3 항체에서 알려진 비필수성 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 군의 다른 아미노산 잔기로 치환된다. 항원 결합력에 영향을 주지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993)]; [Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999)]; 및 [Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)] 참조).
- [0100] "비보존적 아미노산 치환"이라는 용어는 한 부류의 아미노산을 다른 부류의 아미노산으로 치환하는 것, 예를 들어, II군의 잔기인 Ala을 III군의 잔기, 예컨대 Asp, Asn, Glu, 또는 Gln으로 치환하는 것을 지칭한다.
- [0101] 대안으로, 또다른 실시 양태에서, 돌연변이(보존적 또는 비보존적)는 예컨대 집중 돌연변이 유발법(saturation mutagenesis)에 의해 항-ErbB3 항체 코딩 서열의 모든 부분 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있으며, 이렇게 변형 생성된 항-ErbB3 항체는 결합 활성에 대하여 스크리닝될 수 있다.
- [0102] "공통 서열(consensus sequence)"이라는 것은 관련 서열의 부류(family)에서 가장 흔하게 나타나는 아미노산(또는 뉴클레오타이드)으로부터 형성된 서열을 말한다(예를 들어, 문헌[Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)] 참조). 한 부류의 단백질에서 각 공통 서열의 위치는 그 부류에 있어서 그 위치에 가장 흔하게 나타나는 아미노산에 의해 점유된다. 2개의 아미노산이 동일한 빈도로 나타나는 경우에는, 그 중 하나가 공통 서열에 포함될 수 있다. 면역글로불린의 "공통 골격(consensus framework)"이라는 것은 공통 면역글로불린 서열의 골격 영역을 지칭한다.
- [0103] 유사하게, CDR에 대한 공통 서열은 본 발명의 ErbB3 항체의 CDR 아미노산 서열의 최적 배열에 의해 유도될 수 있다.
- [0104] 핵산에 있어서, "실질적 상동성"이라는 용어는 2개의 핵산, 또는 이의 지정된 서열을 최적으로 배열하여 이를 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실과 비교하였을 때, 뉴클레오타이드 중 약 80% 이상이, 통상 약 90% 내지 95% 이상, 보다 바람직하게는 약 98% 내지 99.5% 이상의 뉴클레오타이드가 동일하다는 것을 의미한다. 다르게는, 실질적 상동성은 선택적 하이브리드화 조건 하에서 세그먼트들이 가닥의 보체에 하이브리드화하는 경우에 존재한다.
- [0105] 두 서열 간의 백분율 상동성은, 두 서열의 최적 배열을 위해 도입될 필요가 있는 갭수와 각 갭의 길이를 고려하여, 동일한 위치의 수를 총 서열 수로 나눈 함수(즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수/총 위치 수 x 100)로 표현된다. 두 서열 간의 서열 비교 및 % 상동성의 측정은 하기 비제한적인 실시예에 기술된 바와 같은 수학적 알고리즘을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0106] 두 뉴클레오타이드 서열 간의 % 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스와 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 이용한 GCG 소프트웨어의 GAP 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다. 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 % 동일성은 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 벌점 및 4의 갭 벌점을 이용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 포함된 E. Meyers와 W. Miller의 알고리즘 (CABIOS, 4:11-17 (1989))으로 측정될 수도 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 % 동일성은 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 하나를 사용하고, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량과 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 이용한 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 포함된 Needleman과 Wunsch의 알고리즘 (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))을 사용하여 측정될 수도 있다.
- [0107] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 추가로 "질의 서열(query sequence)"로서 사용되어 예를 들어, 관련 서열을 확인하기 위해 공개된 데이터베이스에 대해 검색을 수행할 수 있다. 이러한 검색은 문헌[Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 이용하여 수행될 수 있다.

BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 수득하기 위해 NBLAST 프로그램(스코어 = 100, 단어길이 = 12)을 이용하여 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램(스코어 = 50, 단어길이 = 3)을 이용하여 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭핑된 배열을 수득하기 위해서는, 문헌[Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402]에 기술된 바와 같은 Gapped BLAST가 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 매개변수를 사용할 수 있다.

[0108] 핵산은 전세포, 세포 용해물 내에 존재할 수 있거나, 일부 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 잘 알려진 다른 방법을 포함하는 표준 기법에 의하여 다른 세포 성분들 또는 다른 오염원들, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질이 정제되어 없어졌을 때 "단리되거나" 또는 "실질적으로 순수하게" 된다. 문헌[F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)]을 참조한다.

[0109] cDNA, 유전체 또는 이의 혼합물로부터 흔히 본래의 서열로 존재(조작된 제한 부위 등을 제외하고)하는 본 발명의 핵산 조성물은 표준 기법에 따라 돌연변이를 유발시켜 유전자 서열을 제공할 수 있다. 코딩 서열에 있어서, 이러한 돌연변이로 원하는 대로 아미노산에 영향을 줄 수 있다. 특히, 본원에 기술된 본래의 V, D, J, 불변부, 스위치 및 이러한 기타 다른 서열과 실질적으로 상동성이거나 이로부터 유래한 DNA 서열이 고려된다("유래한"이라는 말은 서열이 다른 서열과 동일하거나 그로부터 변형되었다는 것을 의미함).

[0110] "작동가능하게 연결된"이라는 용어는 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓인 핵산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 사전서열(presequence) 또는 분비성 선도물질(secretory leader)을 위한 DNA가 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 사전단백질(preprotein)로 발현되는 경우, 그것은 폴리펩타이드를 위한 DNA에 작동가능하게 연결되며; 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위가 번역을 촉진시키기 위해 위치하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"이라는 말은 연결된 DNA 서열이 인접한다는 의미이며, 분비성 선도물질의 경우에 관독 단계에 있어서도 인접한다는 것이다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 적절한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 수행된다. 이러한 부위가 없는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 절차에 따라 사용한다. 핵산은 그것이 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓이는 경우 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동가능하게 연결된다는 것은 연결된 DNA 서열이 인접한다는 의미이며, 두 단백질 코딩 영역을 결합시키는 것이 필요한 곳에는 관독 단계에서 인접하고 있다는 것이다. 스위치 서열에 있어서, 작동가능하게 연결된다는 것은 서열이 스위치 재조합을 수행할 수 있다는 것을 가리킨다.

[0111] 본원에서 "벡터"라는 용어는 핵산 분자로서 그것이 연결되어 있는 다른 핵산 분자를 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 또다른 유형은 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 유전체 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터들은 그들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제를 할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 원점을 갖는 박테리아 벡터 및 포유류 유전자 부체 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 포유류 비-유전자 부체 벡터)는 숙주 세포로의 도입시 숙주 세포의 유전체 내로 삽입되어 숙주 유전체와 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터들은 그들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수도 있다. 이러한 벡터들은 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히, "발현 벡터")로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에서 사용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. "플라스미드" 및 "벡터"라는 용어는 호환되어 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동일한 기능을 발휘하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터(예를 들어, 복제불능 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함한다.

[0112] 본원에서 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 일컫는다. 이러한 용어는 특정 개체의 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 지칭하는 것임을 이해해야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 기인하여 다음 세대에서 임의의 변형이 생길 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 그들의 모세포와 동일하지 않을 수 있으나, 여전히 이들도 본원에서 사용한 "숙주 세포"라는 용어의 범위 내에 포함되는 것이다.

[0113] 본원에서 "치료", "치치" 및 "처리"라는 용어는 본원에 기술된 치료적 또는 예방적 조치들을 지칭한다. "치료" 방법은 질병 또는 장애 또는 재발성 질병 또는 장애의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 지연시키고, 그 중증도

를 감소시키거나, 또는 경감시키기 위해, 또는 이러한 치료의 부재 하에 예상되는 손상을 줄 수 없는 대상의 생존을 연장시키기 위해서, 대상, 예컨대 ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병 또는 장애를 갖거나 이러한 질병 또는 장애에 걸리기 쉬운 소인을 지닌 대상에게 본 발명의 항체 또는 항원 결합부를 투여하는 단계를 수반한다.

[0114] 본원에서 "ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병", 또는 "ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 장애"라는 용어는 증가된 수준의 ErbB3 및/또는 ErbB3이 관계된 세포 일련의 단계적 반응의 활성화가 나타나는 질병 상태와 연관된 질병 상태 및/또는 증상을 포함한다. ErbB3은 그 수준이 증가되는 경우 다른 ErbB 단백질, 예컨대, EGFR 및 ErbB2와 이중 이합체화되는 것으로 알려져 있다. 따라서, "ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병"이라는 용어는 EGFR/ErbB3 및/또는 ErbB2/ErbB3 이중이합체의 수준이 증가되는 질병 상태와 연관된 질병 상태 및/또는 증상도 포함한다. 일반적으로, "ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병"이라는 용어는 ErbB3의 관여가 필요한 임의의 장애, 증상의 개시, 진행 또는 지속됨을 지칭한다. 대표적인 ErbB3 매개성 장애로서는, 이에 제한하지는 않지만, 예컨대 암을 포함한다.

[0115] "암" 및 "발암성"이라는 용어는 통상 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유류에서의 생리학적 질환을 지칭하거나 기술하는 말이다. 암의 예로서는, 이에 제한하지는 않지만, 암종, 임파종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함한다. 이러한 암의 보다 구체적인 예로서는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암, 교세포 종양, 예컨대 신경교아세포종 및 신경섬유종증, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 흑색종, 대장암, 자궁내막 암종, 타액선암, 신장암, 신세포암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간세포암 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 치료 또는 진단된 암은 흑색종, 유방암, 난소암, 신장암, 위/결장암, 폐암 및 전립선암으로부터 선택된다.

[0116] 본원에서 "유효량"이라는 용어는 대상에게 투여시, 본원에 기술된 바와 같은 ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병의 치료, 예측 또는 진단을 실시하는데 충분한, ErbB3과 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합부의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료될 대상과 질병 상태, 대상의 체중과 나이, 질병 상태의 중증도, 투여 방식 등에 따라 다를 수 있으며, 이는 당업계의 숙련자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합부의 투여 용량은 예를 들어, 약 1 ng 내지 약 10,000 mg, 약 5 ng 내지 약 9,500 mg, 약 10 ng 내지 약 9,000 mg, 약 20 ng 내지 약 8,500 mg, 약 30 ng 내지 약 7,500 mg, 약 40 ng 내지 약 7,000 mg, 약 50 ng 내지 약 6,500 mg, 약 100 ng 내지 약 6,000 mg, 약 200 ng 내지 약 5,500 mg, 약 300 ng 내지 약 5,000 mg, 약 400 ng 내지 약 4,500 mg, 약 500 ng 내지 약 4,000 mg, 약 1 μ g 내지 약 3,500 mg, 약 5 μ g 내지 약 3,000 mg, 약 10 μ g 내지 약 2,600 mg, 약 20 μ g 내지 약 2,575 mg, 약 30 μ g 내지 약 2,550 mg, 약 40 μ g 내지 약 2,500 mg, 약 50 μ g 내지 약 2,475 mg, 약 100 μ g 내지 약 2,450 mg, 약 200 μ g 내지 약 2,425 mg, 약 300 μ g 내지 약 2,000 mg, 약 400 μ g 내지 약 1,175 mg, 약 500 μ g 내지 약 1,150 mg, 약 0.5 mg 내지 약 1,125 mg, 약 1 mg 내지 약 1,100 mg, 약 1.25 mg 내지 약 1,075 mg, 약 1.5 mg 내지 약 1,050 mg, 약 2.0 mg 내지 약 1,025 mg, 약 2.5 mg 내지 약 1,000 mg, 약 3.0 mg 내지 약 975 mg, 약 3.5 mg 내지 약 950 mg, 약 4.0 mg 내지 약 925 mg, 약 4.5 mg 내지 약 900 mg, 약 5 mg 내지 약 875 mg, 약 10 mg 내지 약 850 mg, 약 20 mg 내지 약 825 mg, 약 30 mg 내지 약 800 mg, 약 40 mg 내지 약 775 mg, 약 50 mg 내지 약 750 mg, 약 100 mg 내지 약 725 mg, 약 200 mg 내지 약 700 mg, 약 300 mg 내지 약 675 mg, 약 400 mg 내지 약 650 mg, 약 500 mg, 또는 약 525 mg 내지 약 625 mg 범위일 수 있다. 투여량 처방은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 또한, 유효량은 항체 또는 이의 항원 결합부의 임의의 독성 또는 불리한 효과(즉, 부작용)가 최소화되고/되거나 유익한 효과가 보다 중요시되는 양이다.

[0117] "환자"라는 용어는 예방학적 또는 치료적 처치를 받는 인간 및 기타 포유류 대상을 포함한다.

[0118] 본원에서, "대상"이라는 용어는 임의의 특정 인간 또는 인간이 아닌(인간을 제외한) 동물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물은 암에 걸린 대상을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 대상은 인간이다. "인간이 아닌(인간을 제외한) 동물"이라는 용어는 모든 척추동물, 예를 들어, 포유류 및 비포유류, 예컨대 인간이 아닌 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0119] "시료"라는 용어는 환자 또는 대상의 조직, 체액, 또는 세포를 지칭한다. 보통, 조직 또는 세포는 환자로부터 제거되나, 생체 내 진단도 고려된다. 고체 종양의 경우, 외과적으로 제거하여 통상적인 기법으로 조직 시료를 시험을 위해 준비할 수 있다. 림프종과 백혈병의 경우, 림프구 세포, 백혈병 세포 또는 림프 조직을 수득하여 적절히 제조할 수 있다. 기타의 환자 시료, 예컨대 오줌, 눈물, 혈청, 뇌척수액, 땀, 물, 침, 세포 추출물 등도 특정 종양을 위해 유용할 수 있다.

[0120] "항암제" 및 "항신생물제"라는 용어는 암 성장과 같은 악성 종양을 치료하는데 사용되는 약물을 지칭한다. 약물

요법은 단독으로, 또는 외과 수술 또는 방사선 요법과 같은 기타의 치료와 병용될 수 있다. 연관된 장기의 성질에 따라 여러 부류의 약물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 유방암은 에스트르겐에 의해 흔히 자극되어, 성호르몬을 불활성화하는 약물로 치료될 수 있다. 유사하게, 전립선암은 남성 호르몬인 안드로젠을 불활성화하는 약물로 치료될 수 있다. 본 발명의 항암제는 특히 하기의 제제들을 포함한다:

[0121]

항암제	설명	예
항체 (a) 항-ErbB3 항체 이외의 항체; 및 (b) 서로 다른 에피토프들에 결합하는 항-ErbB3 항체	필수 인간암의 세포 표면에서 발현되는 IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자 1형 수용체)과 결합하는 항체	A12 (완전 인간화 mAb) 19D12 (완전 인간화 mAb) CP751-871 (완전 인간화 mAb) H7C10 (인간화 mAb) α IR3 (마우스) scFV/FC (마우스/인간 키메라) EM/164 (마우스)
	EGFR (상피세포 성장 인자 수용체)와 결합하는 항체; EGFR 발현 또는 활성화에 영향을 주는 돌연변이는 암을 유발할 수 있음	마투즈맵 (EMD72000) 어비투스®/ 세톡시맵 (Imclone) 벡티빅스®/ 파니투맵 (Amgen) mAb 806 니모투즈맵 (TheraCIM)
	수용체 티로신 키나아제의 MET 과의 일원인 cMET (간접 상피 이행 인자)와 결합하는 항체	AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5D5) (Genentech)
	서로 다른 에피토프들에 결합하는 항-ErbB3 항체	본원에 기술된 Ab #14 (MM 121-14) 허셉틴® (트라추즈맵; Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG)
IGF1R 표적 소형 분자	필수 인간암의 세포 표면에서 발현되는 IGF-1R (인슐린 유사 성장 인자 1형 수용체)	NVP-AEW541-A BMS-536,924 (1H-벤조이미다졸-2-일)-1H-피리딘-2-온) BMS-554,417 시클로리간 TAE226 PQ401
EGFR 표적 소형 분자	EGFR (상피세포 성장 인자 수용체); EGFR 발현 또는 활성화에 영향을 주는 돌연변이는 암을 유발할 수 있음	이레싸®/ 게피티닙 (AstraZeneca) CI-1033 (PD 183805) (Pfizer) 라파티닙(GW-572016) (GlaxoSmithKline) 티커브®/ 라파티닙 디토실레이트 (SmithKline Beecham) 타르세바®/ 어로티닙 HCL (OSI-774) (OSI Pharma) PKI-166 (Novartis) PD-158780 EKB-569 티르포스틴 AG 1478(4-(3-클로로아닐리노)-6,7-디메톡시퀴나졸린)
cMET 표적 소형 분자	cMET (간접 상피 이행 인자); 수용체 티로신 키나아제의 MET 과의 일원	PHA665752 ARQ 197

항대사물질	항대사성 물질은 통상적인 생화학 반응에 요구되는 물질(대사물)과 유사한 구조를 갖는 화합물질이나, 세포 분열을 비롯한 통상적인 세포의 기능을 방해하는데 있어서는 충분히 다름	플루오로우라실 (5-FU) 카페시타빈/XELODA®(HLR Roche) 5-트리플루오로메틸-2'-데옥시우리딘 메토트렉세이트 나트륨 (Trexall) (Barr) 랄티트렉세트/토무렉스® (AstraZaneca) 페메트렉세트/알립타®(Lilly) 테가페 사이토신 아라비노사이드 (사이타라빈, Ara-C)/티오구아닌®(GlaxoSmithKline) 5-아자시티딘 6-머캅토피린 (Mercaptopurine, 6-MP) 아자티오프린 / 아자산®(AAIPHARMA LLC) 6-티오구아닌 (6-TG) / 푸리네톨®(TEVA) 펜토스타틴 / 니펜트®(Hospira Inc.) 플루다라빈 포스페이트/플루다라® (Bayer Health Care) 클라드리빈(2-CdA, 2-클로로데옥시아데노신) / 류스타틴®(Ortho Biotech)
알킬화제	알킬화 항신생물제는 DNA에 알킬기를 부착시키는 알킬화제임. 암세포는 일반적으로 건강한 세포가 증식하는 것 이상으로 무제한적으로 증식하기 때문에, DNA 손상에 대해 더 민감함. 따라서, 다양한 종양을 치료하는데 알킬화제가 임상적으로 사용됨.	리보뉴클레오타이드 리덕타아제 억제제(RNR) 시클로포스파미드 / 사이톡산 (BMS) 네오사르 (TEVA) 이포스파미드 / 미톡사나®(ASTA Medica) 티오테파 (Bedford, Abraxis, Teva) BCNU→1,3-비스(2-클로로에틸)-1-니트로소우레아 CCNU→1,3-(2-클로로에틸)-3-시클로헥실-1-니트로소우레아 (메틸화 CCNU) 헥사메틸멜라민 (알트레타민, HMM)/ 헥살렌®(MGI Pharma Inc.) 부술판 / 밀레란 (GlaxoSmithKline) 프로카바진 HCL / 마톨란 (Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc.) 다카바진 (DTIC) 클로람부실 / 류카란®(SmithKline Beecham) 멜팔란 / 알케란®(GlaxoSmithKline) 시스플라틴 (시스플라티넘, CDDP) / 플라티놀 (Bristol Myers) 카보플라틴 / 과라플라틴 (BMS) 옥살리플라틴/엘록시탄®(Sanofi-Aventis US)
토포아이스머라아제 억제제	토포아이스머라아제 억제제는 통상의 세포 주기 동안에 DNA 가닥의 포스포디에스테르 백본의 분해 및 재결합을 촉진함으로써 DNA 구조 내에서의 변화를 조절하는 효소인 토포아이스머라아제 효소 (토포아이스머라아제 I 및 II)의 작용을 방해하도록 고안된 화학요법제임	독소루비신 HCL / 독실®(Alza) 다우노루비신 / 다우녹숨®(Gilead) 미톡산트론 HCL/노반트론 (EMD Serono) 악티노마이신 D 에토포시드/베페시드®(BMS)/에토포포스® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, Etc.) 토포테칸 HCL/ 히캅틴®(GlaxoSmithKline) 테니포시드 (VM-26) / 부몬®(BMS) 이리노테칸 HCL(CPT-11) / 캄프토사르® (Pharmacia & Upjohn)

미세소관 표적제	미세소관은 세포골격 성분 중의 하나임. 이들은 신경 세포의 액손 내에서 ~24 nm의 직경과 수 μ m에서 가능하게는 mm까지의 다양한 길이를 가짐. 미세소관은 세포 내에서 구조적 성분으로서의 역할을 하며, 유사분열, 세포질 분열 및 세포성 수송을 비롯한 많은 세포 과정에 관여함.	빈크리스틴 / 온코빈® (Lilly) 빈블라스틴 설페이트/벨반®(단종) (Lilly) 비노렐빈 타르트레이트/나벨빈® (PierreFabre) 빈데신 설페이트 / 엘디신®(Lilly) 파클리탁셀 / 탁술®(BMS) 도세탁셀 / 탁소테레®(Sanofi Aventis US) 나노입자 파클리탁셀(ABI-007)/아브락산® (Abraxis BioScience, Inc.) 익사베필론/ IXEMPRA™(BMS)
키나아제 억제제	티로신 키나아제는 세포 내에 존재하여 아미노산 티로신에 인산기를 부착하는 기능을 하는 효소임. 단백질 티로신 키나아제가 기능하지 못하도록 그 역할을 차단함으로써, 이러한 화합물은 암세포 성장을 조절하는 수단을 제공함.	이마티닙 메실레이트 / 글리백 (Novartis) 수니티닙 말레이트 / 수텐트®(Pfizer) 소라페닙 토실레이트 / 넥사바르®(Bayer) 닐로티닙 염산염 일수화물 /타시그나® (Novartis)
단백질 합성 억제제	세포 사멸을 유도함	L-아스파라기나아제 / 엘스파르® (Merck & Co.)
면역요법제	암환자의 면역반응을 유도함	α 인터페론 혈관생성 억제제 / 아바스틴®(Genentech) IL-2→인터루킨 2 (Aldesleukin)/ 프로루킨®(Chiron) IL-12→인터루킨 12
호르몬	폐경기 및 노화와 연관된 호르몬 요법은 체내에서 특정 호르몬의 양을 증가시켜 노화- 또는 질병-관련 호르몬의 감소를 증대시키고자 함. 암치료로서 호르몬 요법은 특정 호르몬의 수준을 감소시키거나 이러한 호르몬들을 이용하여 성장하여 퍼져나가는 암의 역량을 변화시킴.	토레미펜 시트레이트 / 파레스톤® (GTX, Inc.) 폴베스트란트 / 파슬로텍스®(AstraZeneca) 랄록시펜 HCL / 에비스타®(Lilly) 아나스트라졸 / 아리미텍스®(AstraZeneca) 레트로졸 / 페마라®(Novartis) 파드로졸 (CGS 16949A) 엑세메스탄 / 아로마신®(Pharmacia & Upjohn) 류프롤리드 아세테이트 / 엘리가드®(QTL USA) 루프론®(TAP Pharm.) 고세렐린 아세테이트 / 줄라텍스® (AstraZeneca) 트립토렐린 파모에이트/ 트렐스타®(Watson Labs) 부세렐린 / 수프레펙트®(Sanofi Aventis) 나파렐린 세트로렉스 / 세트로티드®(EMD Serono) 비칼루타미드 / 카소텍스®(AstraZeneca) 닐루타미드 / 닐란드론®(Aventis Pharm.) 메게스트롤 아세테이트 / Megace®(BMS) 소마토스타틴 유사체 (옥트레오티드 아세테이트 / 산도스타틴®(Novartis))
글루코코르티코이드	암의 고통을 야기하는 팽윤을 감소시키는데 사용되는 항염증성 약물	프레딘솔론 텍사메타손 / 데카드론®(Wyeth)
아로마타제 억제제	이미다졸을 포함함	케토코나졸

mTOR 억제제	mTOR 신호 전달 경로는 원래 면역억제제인 라파마이신의 연구 중에 발견됨. 이러한 고도의 보존적 경로는 환경적 요인에 반응하여 세포 증식과 물질대사를 조절하여, 포스포이노시티드-3-키나아제(P I-3K)를 통해 세포 성장 인자 수용체 신호 전달을 세포 성장, 증식 및 혈관 생성으로 연결시킴.	시롤리무스 (라파마이신) / 라파문®(Wyeth) 템시롤리무스(CCI-779) / 토리셀®(Wyeth) 데포롤리무스 (AP23573) (Ariad Pharm.) 에베롤리무스(RAD001) / 세르티칸® (Novartis)
화합요법제		아드리아마이신, 5-플루오로우라실, 사이토신, 블레오마이신, 미토마이신 C, 다우노마이신, 카미노마이신, 아미놉테린, 닥티노마이신, 미토마이신, 에스페라마이신

[0122] 하나 이상의 항암제를 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부의 투여와 동시에 또는 투여 전 또는 후에 투여할 수 있다.

[0123] 본 발명의 다양한 양태들을 하기의 섹션에서 추가로 상세히 기술한다.

[0124] II. 본 발명의 항체 제조 방법

[0125] (i) 단일클론 항체

[0126] 본 발명의 단일클론 항체는 여러 공지된 방법, 예컨대 문헌[Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495]에 기술된 표준 체세포 하이브리드화 기법, B 림프구 세포의 바이러스 또는 종양유발성 형질전환, 또는 인간 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 항체는 완전한 인간 단일클론 항체이다.

[0127] 따라서, 한 실시 양태에서, ErbB3와 결합하는 항체를 제조하기 위해 하이브리도마법이 이용된다. 이 방법에서는, 림프구 세포가 면역화에 사용되는 항원에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 또는 생성할 수 있게끔 유도하기 위해, 적절한 항원을 이용하여 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물에게 면역성을 부여할 수 있다. 다르게는, 림프구 세포는 시험관 내에서 면역성이 부여될 수 있다. 이후, 림프구 세포를 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 흑색종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 제조할 수 있다(문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대하여 유발되는 단일클론 항체의 생성에 대해 분석한다. 하이브리도마 세포가 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 것으로 확인된 후에는, 클론들을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하여 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적을 위해 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수(ascites) 종양과 같이 체내 성장할 수 있다. 서브클론에 의해 분비된 단일클론 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 과정 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로오스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리될 수 있다.

[0128] 또다른 실시 양태에서, ErbB3과 결합하는 항체 및 항체부는 예를 들어, 문헌[McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)], [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)], [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)] 및 [Hoet et al., (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348]; 미국특허 제5,223,409호; 제5,403,484호; 및 제5,571,698호(Ladner et al.); 미국특허 제5,427,908호 및 제5,580,717호(Dower et al.); 미국특허 제5,969,108호 및 제6,172,197호(McCafferty et al.); 및 미국특허 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호 및 제6,593,081호(Griffiths et al.)에 기술된 기법을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 추가로, 사슬 치환(shuffling)에 의한 높은 친화도(nM 범위)를 가는 인간 항체의 생산(문헌[Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]) 뿐만 아니라, 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염법 및 생체 내 재조합법(문헌[Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)])도 사용될 수 있다.

[0129] 특정 실시 양태에서, ErbB3과 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부는 문헌[Hoet et al., 상기와 동일]에 기술된 파지 디스플레이 기법을 사용하여 제조된다. 상기 기법은 인간 도너로부터 단리된 독특한 조합

의 면역글로불린 서열을 갖고, 중쇄 CDR에서 합성적 다양성을 보유하는 인간 Fab 라이브러리의 생성을 포함한다. 이후, 이 라이브러리는 ErbB3과 결합하는 Fab에 대해 스크리닝된다.

- [0130] 또다른 실시 양태에서, ErbB3에 대해 유발되는 인간 단일클론 항체는 마우스 계통보다는 오히려 인간 면역 체계의 일부를 수반하는 트랜스게닉 또는 염색체변형된 마우스를 이용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859]; [Lonberg, N. et al. (1994), 상기와 동일]; [Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101]; [Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93], 및 [Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546] 참조). 추가로 미국특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호(모두 [Lonberg and Kay]에 귀속됨); 미국특허 제5,545,807호(Surani et al.); PCT 공보 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962(모두 [Lonberg and Kay]에 귀속됨); 및 PCT 공보 WO 01/14424(Korman et al.)도 참조한다.
- [0131] 또다른 실시 양태에서, 본 발명의 인간 항체는 전이유전자(transgene) 및 전이염색체(transchromosome) 상에 인간 면역글로불린 서열을 수반하는 마우스, 예컨대 인간 중쇄 전이유전자 및 인간 경쇄 전이염색체를 수반하는 마우스를 이용하여 성장시킬 수 있다(예를 들어, PCT 공보 WO 02/43478[Ishida et al.] 참조).
- [0132] 또한 추가로, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 트랜스게닉 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하여, 본 발명의 항-ErbB3 항체를 증식시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, Xenomouse(Abgenix, Inc.)로 지칭되는 대안적인 트랜스게닉 시스템이 사용될 수 있으며; 이러한 마우스들은 예를 들어, 미국특허 제5,939,598호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6,150,584호 및 제6,162,963호(Kucheralapati et al)에 기술되어 있다.
- [0133] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 염색체변형 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하여, 본 발명의 항-ErbB3 항체를 증식시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 전이염색체 및 인간 경쇄 전이염색체 모두를 수반하는 마우스가 사용될 수 있으며; 이는 문헌[Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727]에 기술되어 있다. 추가로, 인간 중쇄 및 경쇄 전이염색체를 수반하는 소도 당업계에 기술되어 있어(문헌[Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894]), 본 발명의 항-ErbB3 항체를 증식시키는데 사용될 수 있다.
- [0134] 또다른 실시 양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 항체를 생성하는 트랜스게닉 식물 및/또는 배양된 식물 세포(예컨대, 예를 들어, 담배, 옥수수 및 개구리밥)를 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합부를 발현하는 트랜스게닉 담배잎은 예를 들어, 유도성 프로모터(예를 들어, 문헌[Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 (1999)] 참조)를 이용하여 이러한 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 또한, 트랜스게닉 옥수수는 이러한 항체 및 이의 항원 결합부를 발현하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999)참조). 또한, 항체는 예를 들어, 담배 종자 및 감자 덩이줄기를 이용하여, 예컨대, 단일 사슬 항체(scFv)와 같은 항체의 부분을 포함하는 트랜스게닉 식물 종자로부터 대량 제조될 수도 있다(예를 들어, 문헌[Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998)] 참조). 또한, 식물에 있어서 항체 또는 항원 결합부를 제조하는 방법은, 예를 들어, 문헌[Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (1999)], [Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995)]; [Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995)]; [Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994)] 및 미국특허 제6,040,498호 및 제6,815,184호에서 찾을 수 있다.
- [0135] 본원에 개시된 방법들을 비롯한 임의의 기법을 이용하여 제조된, ErbB3과 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 부분의 결합 특이성은 면역침전법 또는 시험관 내 결합 분석법, 예컨대 방사면역분석법(RIA) 또는 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)에 의해 측정될 수 있다. 또한, 단일클론 항체 또는 이의 부분의 결합 친화도는 문헌[Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0136] 특정 실시 양태에서, 상기 거론된 임의의 방법으로 제조된 ErbB3 항체 또는 이의 부분은 당업계에 공지된 기법, 예컨대 본원에 기술된 기법들을 이용하여 목적하는 결합 특이성 및/또는 친화도를 달성하기 위해 추가로 변형 또는 최적화될 수 있다.
- [0137] 한 실시 양태에서, ErbB3 항체로부터 유래한 일부 항체 서열은 구조적 및 기능적으로 관련된 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해서 표적 항원과 우세하게 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개별

항체들 간에 있어서 더욱 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 결합을 담당하고 있기 때문에, 상이한 특성을 갖는 서로 다른 항체의 골격 서열 상에 그래프트된 특이적 자연발생 항체의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써, 특이적 자연발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다(예를 들어, 문헌[Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332:323-327]; [Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321:522-525]; 및 [Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033] 참조). 이러한 골격 서열은 생식세포 항체 유전자 서열을 포함하는 공개된 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다.

[0138] 따라서, CDR과 같은 본 발명의 항-ErbB3 항체의 하나 이상의 구조적 특징은, 본 발명의 항체의 기능적 특성, 예를 들어, ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화 억제; ErbB3을 통한 헤레글린, 에피레글린, 베타셀룰린, 에피겐 또는 비레글린 매개성 신호 전달 중 하나 이상의 신호 전달 억제; ErbB3을 발현하는 세포의 증식 억제; 세포 표면에서 ErbB3의 수준 감소시키는 등의 특성을 하나 이상 보유하는 구조적으로 연관된 항-ErbB3 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0139] 특정 실시 양태에서, 서열번호 7-12, 서열번호 13-18, 서열번호 19-24, 서열번호 39-44 및 서열번호 45-50로부터 선택된 하나 이상의 CDR 영역은 공지된 인간 골격 영역 및 CDR과 재조합되어 추가의 재조합 설계된 본 발명의 항-ErbB3 항체를 생성할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 골격 가변부는 동일하거나 상이한 항체 서열로부터 유래할 수 있다.

[0140] 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에 있어서 특히 중요한 역할을 한다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다(문헌[Hall et al., *J. Immunol.*, 149:1605-1612 (1992)]; [Polymenis et al., *J. Immunol.*, 152:5318-5329 (1994)]; [Jahn et al., *Immunobiol.*, 193:400-419 (1995)]; [Klimka et al., *Brit. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)]; [Beiboer et al., *J. Mol. Biol.*, 296:833-849 (2000)]; [Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915 (1998)]; [Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2161-2162 (1994)]; [Ditzel et al., *J. Immunol.*, 157:739-749 (1996)] 참조). 따라서, 특정 실시 양태에서, 항체는 본원에 기술된 특정 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함하여 생성된다(예를 들어, 서열번호 9, 15, 21, 41, 47 및/또는 서열번호 12, 18, 24, 44, 50). 항체는 추가로 본 발명의 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR1 및/또는 CDR2를 포함할 수 있다(예를 들어, 서열번호 7-8 및/또는 서열번호 10-11; 서열번호 13-14 및/또는 서열번호 16-17; 서열번호 20-21 및/또는 서열번호 22-23; 서열번호 39-40 및/또는 서열번호 42-43; 또는 서열번호 45-46 및/또는 서열번호 48-49).

[0141] 상기 기술된 조작 항체의 CDR1, 2, 및/또는 3 영역은 본원에 개시된 것과 정확히 같은 아미노산 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 각각 서열번호 7-12, 13-18, 19-24, 39-44 및 45-50에 기재된 Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17, 또는 Ab #19의 CDR). 그러나, 당업자라면 상기 본래의 것과 같은 CDR 서열이라도 ErbB3과 결합하는 항체의 능력을 보유할 수 있다면(예를 들어, 보존적 아미노산 치환), 일부 변형이 가능할 수도 있다는 사실을 알 것이다. 따라서, 또다른 실시 양태에서, 상기 조작된 항체는 Ab #6, Ab #3 또는 Ab #14의 하나 이상의 CDR과 예를 들어, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 동일한 하나 이상의 CDR로 구성될 수 있다.

[0142] 또다른 실시 양태에서, CDR의 하나 이상의 잔기는 결합력을 변화시키기 위해 변형되어 보다 우수한 결합 등급(on-rate)을 달성할 수 있다. 이러한 전략을 사용하여, 매우 높은 결합 친화도, 예를 들어, 10^{10} M^{-1} 이상의 친화도를 갖는 항체가 얻어질 수 있다. 당업계에 잘 알려져 있으며 본원에도 기술되는 친화도 성숙 기법이 CDR 영역을 변형시키는데 사용될 수 있으며, 이후 결합력에 있어서 원했던 변화를 확인하기 위해 생성된 결합 분자의 스크리닝을 수반한다. 따라서, CDR이 변형되었기 때문에, 결합 친화도 뿐만 아니라 면역원성의 변화를 모니터링하고 점수를 매겨, 최적의 결합력과 낮은 면역원성에 대해 최적화된 항체를 얻도록 할 수 있다.

[0143] CDR 내부에서의 변형 이외에 또는 그러한 변형 대신에, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변부의 골격 영역인, FR1, FR2, FR3 및 FR4 중 하나 이상에 있어서의 변형도 그것이 항체의 결합 친화도를 제거하지 않는 한 행해질 수 있다.

[0144] 또다른 실시 양태에서, 항체는 예를 들어 암의 치료에 있어서 항체의 효능을 증진시키기 위해 효과기 기능과 관련하여 추가로 변형된다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 Fc 영역에 도입되어, 이 영역에서 사슬 내 이황화 결합 형성을 허용할 수 있다. 이렇게 생성된 단일이합성 항체는 향상된 내재화 능력 및/또는 증진된 보체 매개성 세포사 및 항체 의존성 세포독성(ADCC)의 특징들을 가질 수 있다. 문헌[Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 또한, 증진된 항-종양 활성을 갖는 단일이합성 항체는 문헌[Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같은 이중기능성(heterobifunctional) 가교제를 사용하여 제조될 수 있다. 대안으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖도록 조작

되어 향상된 보체 매개성 세포 용해능과 ADCC 능력을 가질 수 있다. 문헌[Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0145] 하기 기술된 이중 특이성 항체 및 면역접합체도 본 발명에 포함된다.

[0146] (ii) 이중 특이적 항체

[0147] 본 발명의 이중 특이적 항체는 ErbB3에 대한 하나 이상의 결합 특이성과, 다른 항원, 예컨대 발암유전자의 생성물에 대한 하나 이상의 결합 특이성을 포함한다. 이중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로 제조될 수 있다(예를 들어 F(ab')₂ 이중 특이적 항체).

[0148] 이중 특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, WO 05117973 및 WO 06091209 참조). 예를 들어, 전장 이중 특이적 항체의 제조는 두 사슬이 서로 다른 특이성을 가지는 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 하여 이루어질 수 있다(예를 들어, 문헌[Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)] 참조). 이중 특이적 항체 제조에 대한 추가의 상세한 설명은 예를 들어, 이중 특이적 항체 제조를 위한 화학 결합 방법을 기술하고 있는 문헌[Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)] 및 [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]에서 찾아볼 수 있다. 재조합 세포 배양물로부터 직접 이중 특이적 항체 단편을 제조하여 분리하는 다양한 기법도 기술되어 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 류신 지퍼를 이용하여 생성되었다(예를 들어, 문헌[Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)] 참조). 단쇄 Fv (sFv) 이합체를 사용하여 이중 특이적 항체 단편을 제조하는 또다른 전략도 보고되었다(예를 들어, 문헌[Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)] 참조).

[0149] 특정 실시 양태에서, 이중 특이적 항체는 ErbB3과 결합하는 일차 항체 또는 이의 결합부 및 ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFR, IGF1-R, C-MET, 루이스 Y, MUC-1, EpCAM, CA125, 전립선 특이적 막 항원, PDGFR- α , PDGFR- β , C-KIT, 또는 임의의 FGF 수용체와 결합하는 이차 항체 또는 이의 결합부를 포함한다.

[0150] (iii) 면역접합체

[0151] 본 발명의 면역접합체는 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합부를 다른 치료제에 접합시켜 형성될 수 있다. 적절한 제제로서는, 예를 들어, 세포독성 치료제 (예를 들어, 화학요법제), 독소 (예를 들어 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성형 독소, 또는 이의 단편), 및/또는 방사성 동위원소 (즉, 방사선접합체)를 포함한다. 이러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기술되어 있다. 사용가능한 효소 활성형 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성형 단편, 외독소 A 사슬(녹농균 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, α -사신, 유동(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 미국자리공(Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 여주(momordica charantia) 억제제, 커신, 크로틴, 비누풀(saponaia officinalis) 억제제, 겔로닌, 마이토겐린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사선접합된 항-ErbB3 항체의 제조를 위해 다양한 방사선택종이 이용된다. 예로서는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다.

[0152] 본 발명의 면역접합체는 다양한 이기능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미달-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미달 수버레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예컨대 1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌[Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987)]에 기술된 것과 같이 제조될 수 있다. ¹⁴C 표지된 1-이소티오시아나토벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사선뉴클레오타이드 접합을 위한 대표적인 킬레이트제이다(예를 들어, WO94/11026 참조).

[0153] III. 본 발명의 항체 스크리닝 방법

[0154] ErbB3과 결합하는 항체 또는 항원 결합부를 제조한 이후에, 이러한 항체 또는 이의 부분은 당업계에 잘 알려진 다양한 분석법을 이용하여 다양한 특성들, 예컨대 본원에 기술된 특성들에 대해 스크리닝 될 수 있다.

[0155] 한 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3의 EGF-유사 리간드 매개성 인산화를 억제하는 능력에 대해 스크리닝 된다. 이는 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 및 부재 하에 ErbB3을 발현하는 세포를 EGF-유사

리간드로 처리함으로써 수행될 수 있다. 이후 세포를 용해시킬 수 있고, 그 미정제 용해물을 원심분리하여 불용성 물질을 제거할 수 있다. ErbB3 인산화는 예를 들어, 문헌[Kim et al., 상기와 동일]과 하기 실시예들에서 기술된 바와 같은 항-포스포티로신 항체를 이용한 탐침을 수반하는 웨스턴 블롯팅에 의해 측정될 수 있다.

[0156] 다른 실시 양태에서, 항체 및 이의 항원 결합부는 추가로 하나 이상의 하기 특성에 대해 스크리닝 된다: (1) ErbB3을 통한 ErbB3 리간드(예컨대 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린) 매개성 신호 전달의 억제; (2) ErbB3을 발현하는 세포의 증식 억제; (3) 세포 표면에서의 ErbB3의 수준을 감소시키는 능력 (예를 들어, ErbB3의 세포 내 함입을 유도함으로써); (4) ErbB3을 발현하는 세포의 VEGF 분비 억제; (5) ErbB3을 발현하는 세포의 이동 억제; (6) ErbB3을 발현하는 세포의 구상 성장 억제; 및/또는 (7) ErbB3의 도메인 I 상에 위치한 에피토프에의 결합. 이들 각각은 당업계에 공지된 기법 및 본원에 거론된 방법을 이용하여 쉽게 측정될 수 있다.

[0157] ErbB3을 통한 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린 매개성 신호 전달의 억제는 예컨대, 문헌[Horst et al. 상기와 동일]에 기술된 바와 같은 통상적인 분석법을 이용하여 쉽게 측정될 수 있다. 예를 들어, ErbB3을 통한 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린 매개성 신호 전달을 억제하는 항체 또는 이의 항원 결합부의 능력은 예를 들어, 문헌[Horst et al. 상기와 동일], [Sudo et al., (2000) *Methods Enzymol.*, 322:388-92]; 및 [Morgan et al. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191:761-767]에 기술된 바와 같은, ErbB3의 공지된 기질, 예를 들어, SHC 및 PI3K에 대한 키나아제 분석을 수행한 후, 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린으로 자극시킴으로써 측정할 수 있다. 따라서, ErbB3을 발현하는 세포는 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린으로 자극되어, 후보 항체 또는 이의 항원 결합부를 이용하여 배양될 수 있다. 이러한 세포로부터 후속 제조된 세포 용해물은, 예를 들어 항-JNK-1 항체와 같은 ErbB3의 기질 (또는 ErbB3이 관여하는 세포 경로 내 단백질)에 대한 항체를 이용하여 면역침전시켜, 당업계에 공지된 기법을 이용해 키나아제 활성(예를 들어, JNK 키나아제 활성 또는 PI3-키나아제 활성)에 대해 분석할 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합부의 부재 하에 비하여, 그들의 존재 하에 있어서 ErbB3 기질 또는 ErbB3이 관여하는 경로 내의 단백질의 수준 또는 활성(예를 들어, 키나아제 활성)의 감소 또는 완전한 소실은, 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린 매개성 신호 전달을 억제하는 항체 또는 항원 결합부가 있음을 나타내는 것이다.

[0158] 특정 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3에 대한 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린의 결합을 감소시킴으로써 ErbB3-리간드 (예를 들어, 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린) 매개성 신호 전달을 억제한다.

[0159] 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린의 ErbB3에 대한 결합을 억제하는 항체 또는 이의 항원 결합부를 선별하기 위해서는, ErbB3을 발현하는 세포 (예를 들어 하기 실시예에서 기술된 것과 같은 MALME-3M 세포)를 항-ErbB3 항체 또는 이의 항원 결합부의 부재(대조군) 또는 존재 하에, 표지된 ErbB3-리간드 (예를 들어, 방사선 표지된 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)에 접촉시킬 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합부가 ErbB3에 대한 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린의 결합을 억제하는 경우에는, 항체 또는 이의 항원 결합부의 부재 하에서의 양과 비교하여 회수된 표지량(예를 들어, 방사선표지된 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)에 있어서 통계적으로 유의한 감소가 관찰될 것이다.

[0160] 항체 또는 이의 항원 결합부는 임의의 기작에 의해 ErbB3-리간드 (예를 들어, 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)의 결합을 억제할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3 리간드가 ErbB3 상의 동일한 부위 또는 중첩하는 부위에 결합하는 것을 억제함으로써 ErbB3에 대한 ErbB3 리간드 (예를 들어, 하나 이상의 헤레굴린, 에피레굴린, 에피겐 또는 비레굴린)의 결합을 억제할 수 있다. 다르게는, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3의 구조를 변형시키거나 뒤틀어놓음으로써, 그것이 ErbB3 리간드에 결합할 수 없도록 하여 ErbB3 리간드의 결합을 억제할 수 있다.

[0161] 세포 표면에서의 ErbB3 수준을 감소시키는 항체 및 이의 항원 결합부는 종양 세포 상에서 ErbB3을 하향조절시키는 이들의 능력에 의해 확인될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3의 세포 내 함입을 유도(또는 세포 이물 흡수 증가)함으로써 ErbB3 세포 표면 발현을 감소시킨다. 이를 시험하기 위해, ErbB3에 비오틴을 부착시켜, 예를 들어, 문헌[Waterman et al., *J. Biol. Chem.* (1998), 273:13819-27]에 기술된 바와 같이, 항체 또는 이의 항원 결합부의 존재 또는 부재 하에 배양물의 세포의 단층 상에서 비오틴의 양을 측정 후, ErbB3의 면역침전과 스트렙타비딘을 이용한 탐침을 사용하면 세포 표면 상의 ErbB3 분자수를 쉽게 측정할 수 있다. 항체 또는 항원 결합부의 존재 하에 시간이 경과함에 따른 비오틴 부착된 ErbB3의 검출이 감소

하는 것은 세포 표면에서 ErbB3 수준을 감소시키는 항체가 있음을 의미하는 것이다.

[0162] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부를 당업계에 공지된 기법, 예컨대 하기 실시예에 기술된 세포 적정 발광 분석법을 이용하여 종양 세포와 같은 ErbB3를 발현하는 세포의 증식을 억제하는 그 능력에 대해 시험할 수도 있다(예를 들어, 문헌[Macallan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998) 20;95(2):708-13]; [Perez et al. (1995) *Cancer Research* 55, 392-398]도 참조한다).

[0163] 또다른 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3를 발현하는 세포의 VEGF 분비를 억제하는 능력에 대해 스크리닝 된다. 이는 잘 알려진 분석법, 예컨대 R&D 시스템즈 (미국 미네소타주 미네아폴리스 소재, Cat. #DY293B)에서 입수가능한 VEGF ELISA 키트를 이용하여 수행될 수 있다. 유사하게, 항체 또는 이의 부분은 본원에 기술된 것과 같이 반투과성막 분석법(trans-well assay) [밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.), 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재, Cat. #ECM552]을 이용하여 ErbB3를 발현하는 세포(예를 들어, MCF-7 세포)의 이동을 억제하는 능력에 대해 스크리닝 된다.

[0164] 또다른 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 ErbB3를 발현하는 세포의 구상 성장을 억제하는 능력에 대해 스크리닝 된다. 이는 종양 성장을 진행시키는 조건을 모방하는 분석법을 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Herman et al. (2007), *Journal of Biomolecular Screening* Electronic publication] 참조).

[0165] 본 발명의 하나 이상의 항체와 동일하거나 중첩하는 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합부도 당업계에 공지된 표준 기법 및 본원에 기술된 방법을 이용하여 동정될 수 있다. 예를 들어, 해당 항체에 의해 결합된 ErbB3 상의 동일하거나 중첩하는 에피토프에 결합하는 항체에 대하여 스크리닝하기 위해, 문헌[*Antibodies*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기술된 바와 같은 교차-차단 분석법(cross-blocking assay)을 수행할 수 있다.

[0166] IV. 약학 조성물

[0167] 다른 양태에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 본 발명의 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 하나 또는 그들의 혼합물로 포함하여, 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화되는 약학 조성물을 제공한다. 한 실시 양태에서, 상기 조성물은 ErbB3 상의 서로 다른 에피토프에 결합하는 복수(예를 들어, 2회 이상) 단리된 본 발명의 항체들의 혼합물을 포함한다.

[0168] 본원에서, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리학적으로 혼화가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 상기 담체는 정맥, 근육, 피하, 비경구, 척수 또는 상피세포 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다. 투여 경로에 따라서, 활성 화합물 즉, 항체, 이중 특이적 및 다중 특이적 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산의 작용 및 기타 자연 상태에서부터 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.

[0169] "약학적으로 허용가능한 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하면서 바람직하지 못한 독소의 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예를 들어, 문헌[Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19] 참조). 이러한 염의 예로서는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등으로부터 유래한 산 부가염, 그리고 비독성 유기산, 예컨대 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알카논산, 히드록시 알카논산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설펜산 등으로부터 유래한 산 부가염을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유래된 염기 부가염, 그리고 비독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유래된 염기 부가염을 포함한다.

[0170] 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 또는 병행 요법으로 즉, 다른 제제와 혼합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 병행 요법은 본 발명의 조성물과 적어도 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 하기 기술된 항암제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 방사선 요법 및/또는 외과 수술과 함께 병행하여 투여될 수도 있다.

[0171] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 당업자라면 투여 경로 및/또는 투여 방식은 원하는 결과에 따라 다를 것이라는 사실을 이해할 것이다. 활성 화합물은 임플란트, 경피성 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 서방형 제제와 같은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가의 무수물, 폴리클릭산, 콜라겐, 폴리오르쏘에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체 친화성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형들을 제조하는 다수의 방법은 특허받거나 또는 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Sustained and Controlled Release Drug*

Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

- [0172] 특정 투여 경로에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는, 화합물의 불활성화를 방지할 물질로 화합물을 코팅하거나, 이를 화합물과 동시에 투여하는 것이 필요하다. 예를 들어, 화합물은 리포솜 또는 희석제와 같은 적절한 담체로 대상에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 희석제는 식염수 및 완충 수용액을 포함한다. 리포솜은 통상적인 리포솜 뿐만 아니라 수중-유중수 CGF 에멀전을 포함한다(문헌[Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27]).
- [0173] 약학적으로 허용가능한 담체는 멸균 수용액 또는 분산액과, 멸균 주사액 또는 분산액의 일시 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질과 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 불상용성인 경우를 제외하면, 본 발명의 약학 조성물에서의 이의 사용은 고려된다. 보충적인 활성 화합물도 조성물 내에 포함될 수 있다.
- [0174] 치료 조성물은 일반적으로 제조 및 저장 상태 하에서는 멸균되고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 기타 높은 약물 농도에 적합한 정돈된 구조로서 제형화될 수 있다. 담체는 용매, 또는 예컨대 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물을 포함하는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에 있어, 조성물 내에 등장화제, 예를 들어, 당, 다가알콜 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사 조성물의 흡수 지연은 조성물 내에 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함시킴으로써 야기시킬 수 있다.
- [0175] 멸균 주사액은 적절한 용매에 필요량의 활성 화합물을 상기 열거된 성분들을 하나 또는 그들의 혼합물과 함께 혼입시키고, 필요하다면 멸균 미세여과를 거쳐 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질과 상기 열거된 필수 기타 성분들을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시켜 제조된다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분에 미리 멸균 여과시킨 그의 용액으로부터 추가로 임의의 원하는 성분을 더한 분말을 제조할 수 있는 진공 건조와 동결 건조(냉동 건조)이다.
- [0176] 투여량 처방 계획은 최적의 목적하는 반응(예를 들어, 치료적 반응)을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 예를 들어, 단위 용량으로 투여할 수 있으며, 수회의 용량을 시간의 경과에 따라 투여할 수 있거나, 치료 상황의 요인에 의해 점차 투여량을 감소하거나 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 인간 항체는 피하 주사로 한 주에 1회 또는 2회 투여되거나, 피하 주사로 한 달에 1회 또는 2회 투여될 수 있다.
- [0177] 투여의 용이성과 용량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제조하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 투여 단위 형태라는 용어는 치료될 대상을 위한 단위 투여량으로 맞춰진 물리적으로 분리된 단위를 가리키며; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 이끌어내도록 미리 계산된 활성 화합물의 양을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태를 위한 상세한 사항은 하기 요인에 의하여 상술되며, 직접적으로 하기에 따라 달라진다: (a) 활성 화합물의 독특한 특성과 달성할 특정 치료 효과 및 (b) 각 개인의 개별 민감성의 치료에 대한 이러한 활성 화합물에 있어서 화합물 당업계의 본래의 한계점.
- [0178] 약학적으로 허용가능한 항산화제의 예로서는 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, α -토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.
- [0179] 치료 조성물에 있어서, 본 발명의 제형은 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여를 위해 적절한 제형을 포함한다. 제형은 단위 투여 형태로 알맞게 제공될 수 있고, 약학업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 혼합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료될 대상 및 특정 투여 방식에 따라 다를 것이다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 혼합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타낼 수 있는 조성물의 양이 될 것이다. 일반적으로, 전체를 100%로 했을 때, 그 양은 약 0.001% 내지 약 90%의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.005% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 0.01% 내지 약 30% 범위가 될 것이다.
- [0180] 질 투여를 위해 적절한 본 발명의 제형은 당업계에 적합한 것으로 공지된 담체를 포함하는 질좌약, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 거품 또는 스프레이 제형들을 포함한다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피성 투여를 위한 투여

형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 멸균 조건 하에서 약학적으로 허용가능한 담체와, 그리고 필요한 경우 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진체와 혼합될 수 있다.

[0181] 본원에서 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된다"라는 말은 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하는데, 통상 주사에 의하며, 이에 제한하지는 않지만 정맥내, 근육내, 동맥내, 뇌척수강내, 관절강내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경피기관내, 피하, 각피하, 관절내, 간피막하, 지주막하, 척수내, 경막의 및 흉골하 주사와 주입에 의한다.

[0182] 본 발명의 약학 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로서는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물, 식물유, 예컨대 올리브유 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0183] 또한, 이러한 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 아주반트를 포함할 수도 있다. 당업계에 잘 알려진 아주반트의 구체적인 예로서는, 예를 들어, 무기질 아주반트 (예컨대 알루미늄 염, 예를 들어, 인산알루미늄 및 수산화알루미늄), 유기질 아주반트 (예를 들어, 스퀴알렌), 유성 아주반트, 바이로솜 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스로부터 유래한 막결합 헤아글루티닌 및 뉴라미니다아제를 포함하는 바이로솜)을 포함한다.

[0184] 미생물 존재의 예방은 멸균 절차(상기 참조)에 의하여, 그리고 다양한 항박테리아제와 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 주입함으로써 수행될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물 내에 포함하는 것도 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약학적 형태의 흡수 지연은 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함시킴으로써 야기할 수 있다.

[0185] 본 발명의 화합물이 인간 및 동물에게 의약으로 투여되는 경우, 이는 단독으로, 또는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께, 예를 들어, 0.001 내지 90% (보다 바람직하게는, 0.005 내지 70%, 예컨대 0.01 내지 30%)의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물로서 투여될 수 있다.

[0186] 선택된 투여 경로와는 관계없이, 적절한 흡수형 및/또는 본 발명의 약학 조성물로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물은, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 투여 형태로 제형화된다.

[0187] 본 발명의 약학 조성물 내의 활성 성분의 실제 투약 수준은, 환자에게 독성을 부여하지 않으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 경로에 대하여 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해서 다양할 수 있다. 선택된 투약 수준은 다양한 약동학적 요인, 예컨대 본 발명에서 사용된 특정 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 방출 속도, 치료의 지속 시간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료할 환자의 나이, 성별, 체중, 질환, 일반적인 건강 상태 및 사전 병력 및 의학 업계에 잘 알려진 기타 요인들에 따라 달라질 것이다. 당업계의 일반 지식을 지닌 의사 또는 수의사라면 필요한 약학 조성물의 유효량을 쉽게 결정하여 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 사용되는 본 발명의 화합물의 투약량을 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 수준보다 낮게 시작하여, 치료 효과를 달성할 때까지 점차적으로 투약량을 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적절한 일일 투약량은 치료 효과를 나타내는데 유효한 가장 낮은 투약량인 화합물의 양이 될 것이다. 이러한 유효한 투약량은 일반적으로 상기 기술한 요인들에 따라 다를 것이다. 투약은 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하, 바람직하게는 표적 부위에 근접하여 투약하는 것이 바람직하다. 필요하다면, 치료 조성물의 유효한 일일 투여량은 하루에 적절한 간격을 두어 2, 3, 4, 5, 6회 이상의 양으로 나누어 투여하며, 임의로는 단위 투여 형태로 투여할 수 있다. 본 발명의 화합물을 단독으로 투여하는 것이 가능하나, 약학적 제형(조성물)로서 화합물을 투여하는 것이 바람직하다.

[0188] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의학 장비를 이용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시 양태에서, 본 발명의 치료 조성물은 예컨대, 미국특허 제5,399,163호, 제5,383,851호, 제5,312,335호, 제5,064,413호, 제4,941,880호, 제4,790,824호, 또는 제4,596,556호에 개시된 장비와 같은 무침 피하 주사 장비를 이용하여 투여될 수 있다. 본 발명에서 유용한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예로서는: 속도를 조절하면서 투약하는 매물식 미세주입 펌프를 개시하는 미국특허 제4,487,603호; 피부를 통해 의약을 투여하는 치료 장비를 개시하는 미국특허 제4,486,194호; 정밀한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프를 개시하는 미국특허 제4,447,233호; 연속적 약물 전달을 위한 가변적 유동 매물식 주입 장치를 개시하는 미국특허 제4,447,224호; 다

중 챔버 구획을 갖는 삼투압을 이용한 약물 전달 시스템을 개시하는 미국특허 제4,439,196호; 및 삼투압을 이용하는 약물 전달 시스템을 개시하는 미국특허 제4,475,196호를 포함한다. 다수의 기타 이러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 당업자에게 공지되어 있다.

[0189] 특정 실시 양태에서, 본 발명의 단일클론 항체는 생체 내 적절한 분배를 확보하기 위하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 뇌혈관장벽 (BBB)은 많은 고친수성 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물을 BBB에 통과시키기 위해서는(필요한 경우), 이들은 예를 들어, 리포솜으로 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들어, 미국특허 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송하여 표적화된 약물 전달을 증진시키는 하나 이상의 부분(moiety)을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌[V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685] 참조). 대표적인 표적화 부분은 엽산 또는 비오틴 (예를 들어, 미국특허 제5,416,016호(Low et al.)); 만노사이드 (문헌[Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]); 항체 (문헌[P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140]; [M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]); 본 발명의 분자 성분 뿐만 아니라 본 발명의 제형물을 포함할 수 있는 상이한 종인, 계면활성제 단백질 A 수용체 (문헌[Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]); p120 (문헌[Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090])을 포함하며, 문헌[K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123]; [J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273]도 참조한다.

[0190] V. 본 발명의 항체를 이용하는 방법

[0191] 또한, 본 발명은 ErbB3과 결합하는 항체 및 이의 항원 결합부를 다양한 체외 및 체내 진단과 치료용으로 이용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 여러가지 암을 비롯하여 ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0192] 한 실시 양태에서, 본 발명은 질병을 치료하기에 효과적인 양으로 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부를 대상에게 투여함으로써 ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 해당 질병으로는 예를 들어, 이에 제한되지는 않지만, 흑색종, 유방암, 난소암, 신장암, 위암, 결장암, 폐암 및 전립선암을 비롯한 다양한 암을 포함한다.

[0193] 항체는 ErbB3 매개된 신호 전달과 연관된 질병을 치료하기 위해, 단독으로 투여되거나, 항체와 함께 작용하거나 또는 항체와 상승적으로 작용하는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 이러한 치료제는, 예를 들어, 하기 기술된 항암제(예를 들어, 세포 독소, 화학요법제, 소형 분자 및 방사선)를 포함한다.

[0194] 또다른 실시 양태에서, 본 발명은 본원의 항체 또는 이의 항원 결합부를 대상의 세포와 (예를 들어, 체외 또는 체내) 접촉시킨 후, 세포 상의 ErbB3에 대한 결합 수준을 측정함으로써, 대상의 ErbB3 상향 조절과 연관된 질병 (예를 들어, 암)을 진단하는 방법을 제공한다. ErbB3에 대한 비정상적으로 높은 결합 수준은 대상이 ErbB3 상향 조절과 연관된 질병에 걸렸음을 나타낸다.

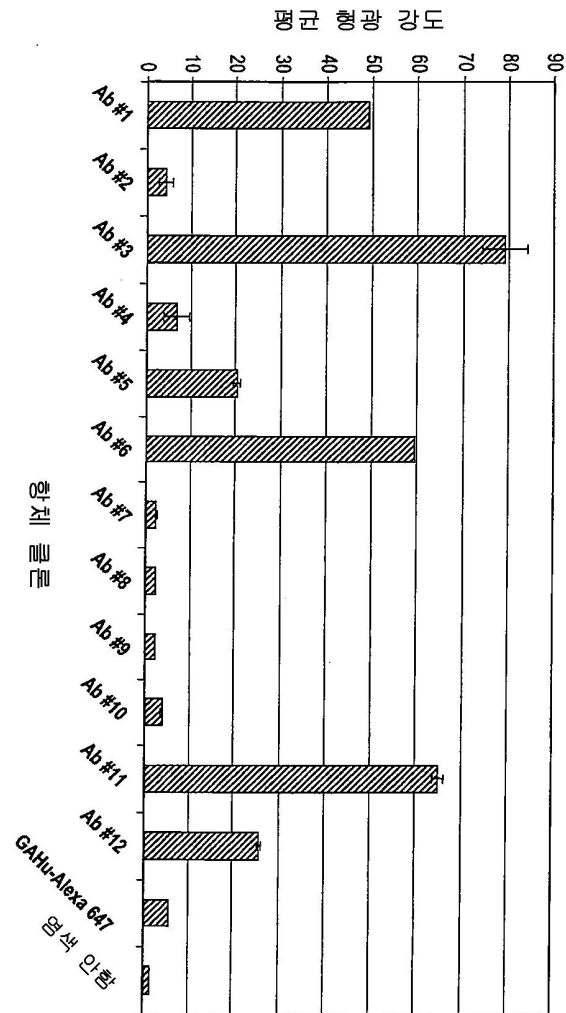
[0195] ErbB3 상향 조절 및/또는 ErbB3 의존성 신호 전달과 연관된 질병을 치료 또는 진단하는데 사용되는 설명서를 포함할 수 있는, 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합부를 포함하는 키트도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 키트는 그 내용물의 사용 취지를 나타내는 라벨을 포함할 수 있다. 라벨이라는 용어는 키트 상 또는 키트와 함께 제공되거나, 다르게는 키트와 함께 수반되는 임의의 기록, 마케팅 자료 또는 기록 자료를 포함한다.

[0196] 본 발명의 다른 실시 양태는 하기 실시예에 기술된다.

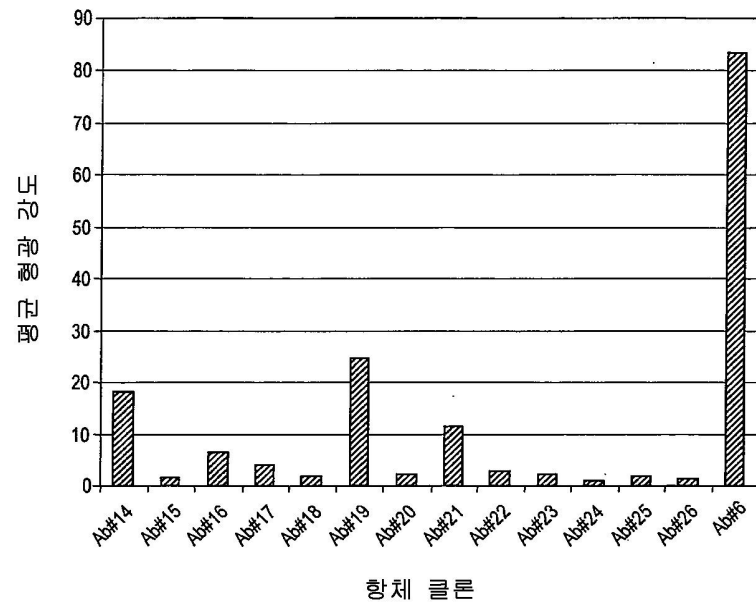
[0197] 본 발명을 하기 실시예로 추가로 예시하나, 이로써 본 발명을 제한하는 것은 아니다. 본 출원에서 언급된 서열 목록, 도면 및 모든 참조 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참조로서 명백하게 포함된다.

도면

도면1a



도면1b

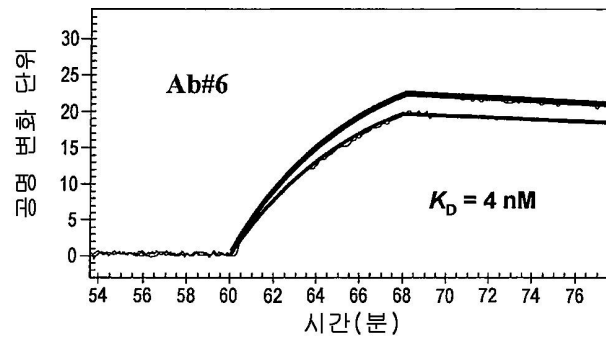


도면2a

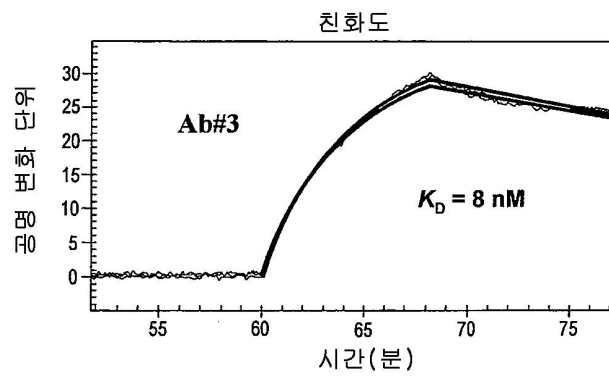
SPR로 측정시 ErbB3에 대한 항체의 결합

$$K_D = k_d / k_a$$

친화도



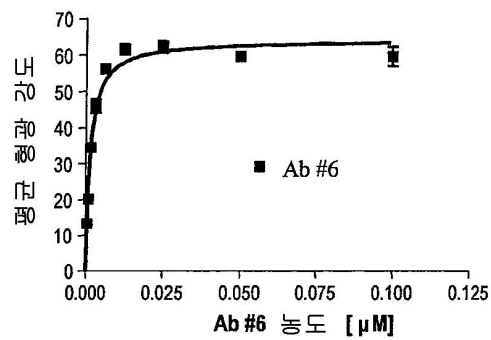
도면2b



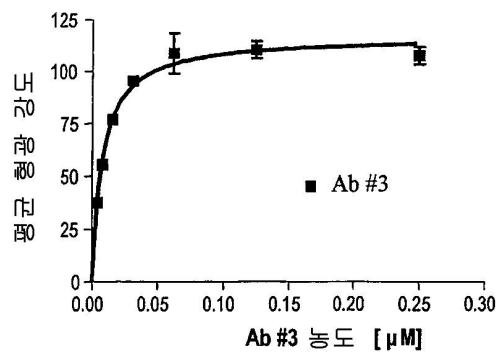
도면2c

MALME-3M 세포에 대한 항체의 세포 결합 분석

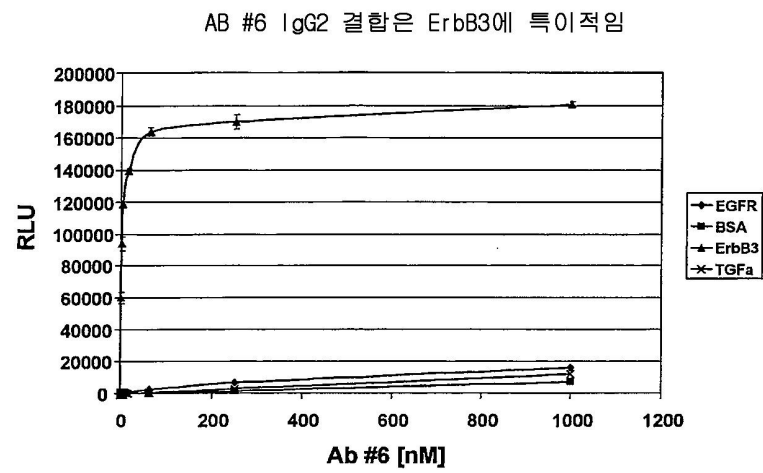
$$Y = B_{\max} * X / K_D + X$$



도면2d

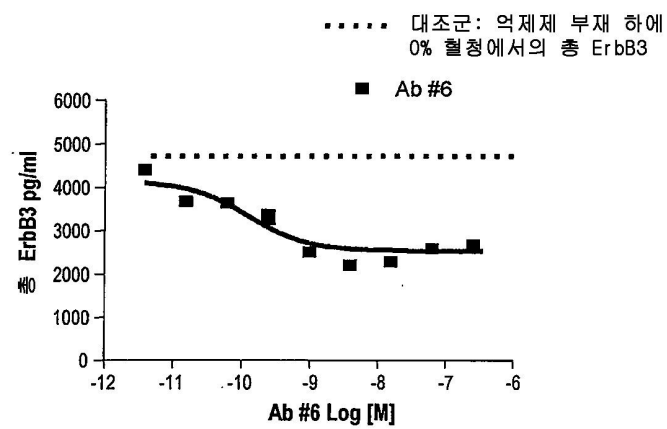


도면3



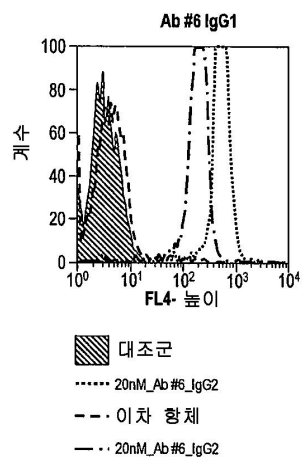
도면4

항체 #6은 ELISA로 측정시 시험관내 MALME-3M 흑색종 세포에서 총 ErbB3 수준을 감소시킴



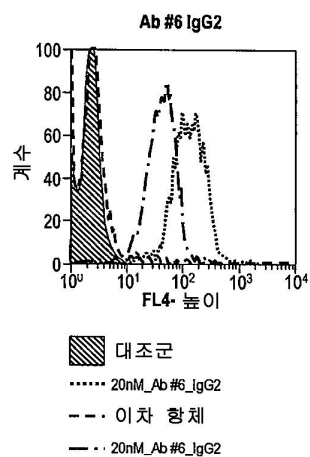
도면5a

FACS로 측정된 Ab #6 IgG1 및
IgG2를 이용한 MALME-3M
(흑색종) 세포에서의
ErbB3 수용체의 하향조절

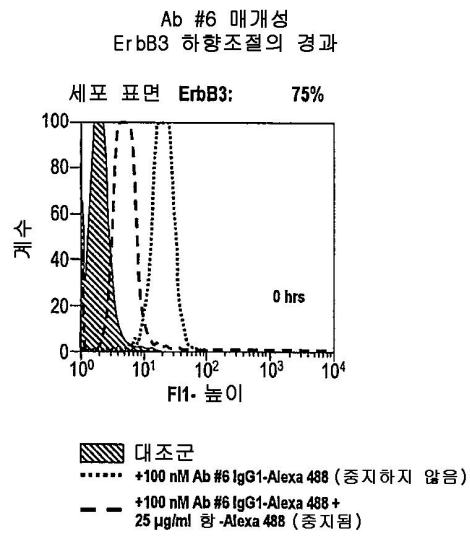


도면5b

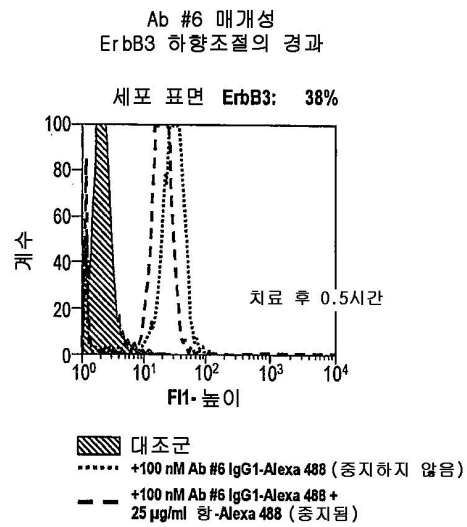
FACS로 측정된 Ab #6 IgG1 및
IgG2를 이용한 MALME-3M
(흑색종) 세포에서의 ErbB3
수용체의 하향조절



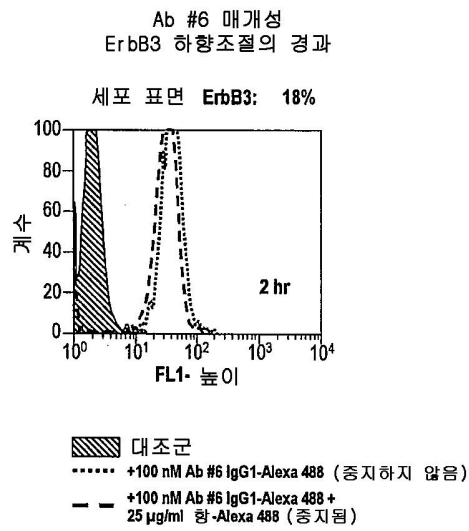
도면6a



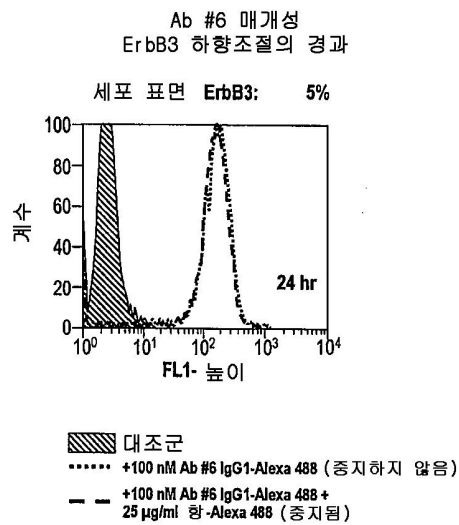
도면6b



도면6c

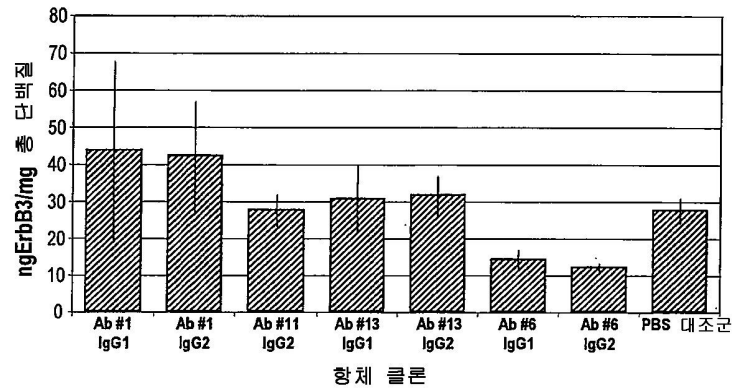


도면6d



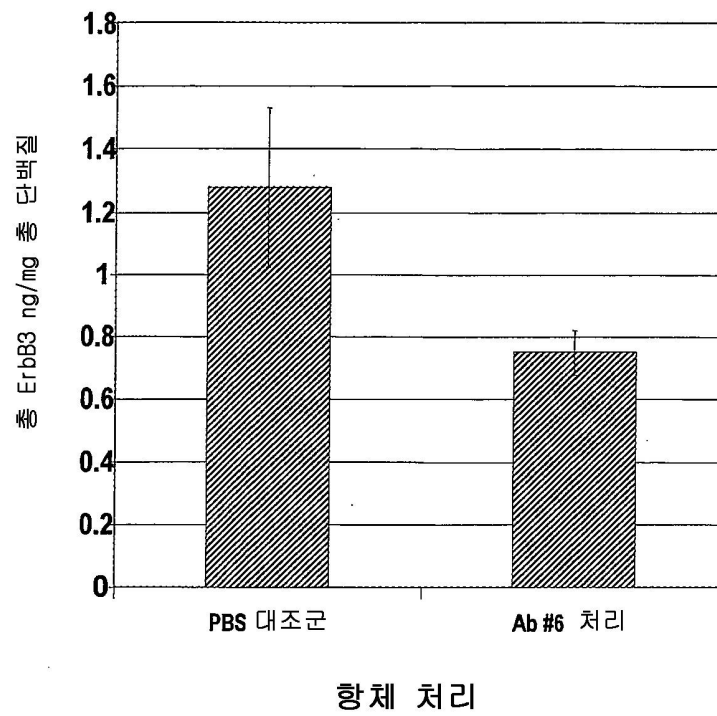
도면7

Ab #6은 생체 내 흑색종 세포에서 ErbB3 하향조절을 유도함
주입 후 24시간에 MALME-3M PD 조사에서 나타난 총 ErbB3 수준



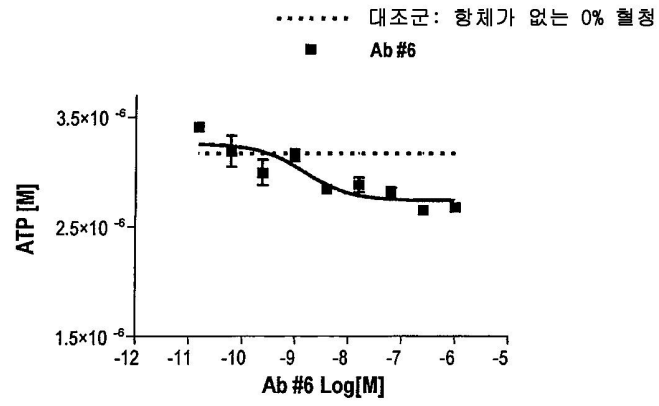
도면8

ADPr 이중 이식편에서의 총 ErbB3 수준



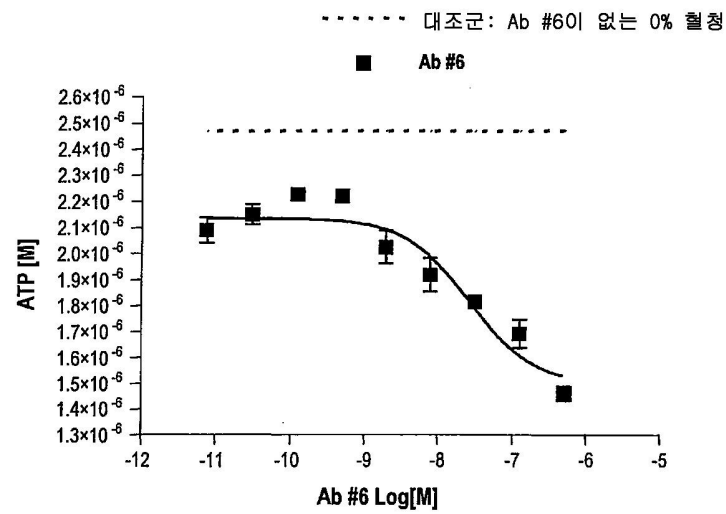
도면9

세포 적정 발광 분석법에 의해 측정시 Ab #6은
MALME-3M 흑색종 세포에서의 증식을 억제함



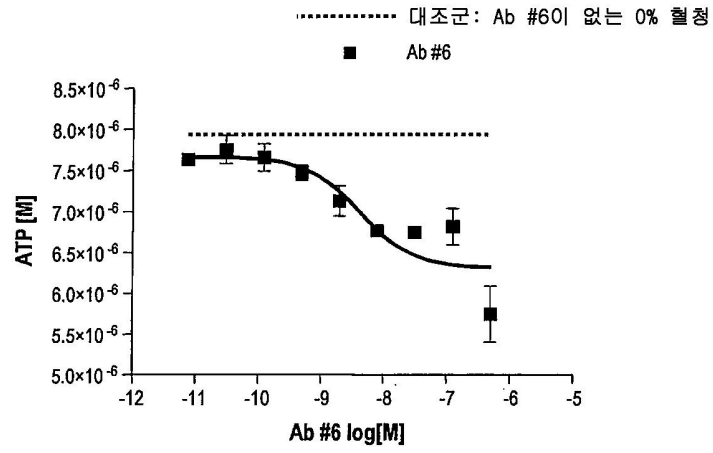
도면10

Ab #6은 ADRr (난소) 세포주에서의 증식을 억제함



도면11

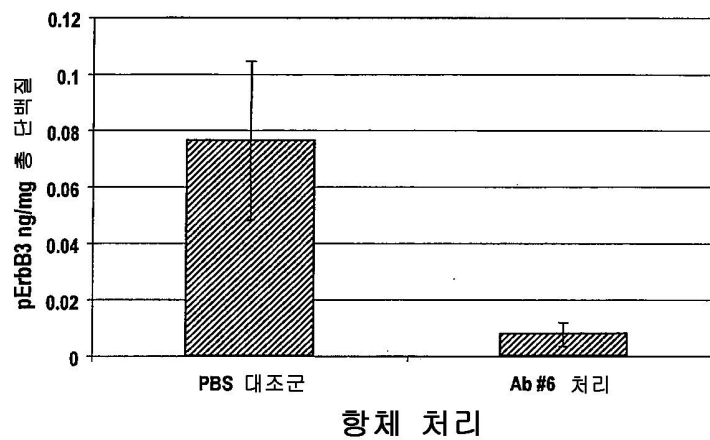
Ab #6은 ACHN 세포주에서의 세포 증식을 억제함



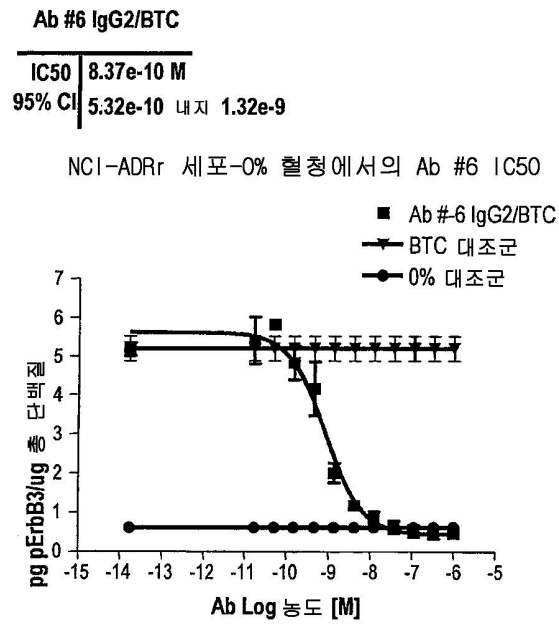
도면12

Ab #6은 생체 내 ADRr 이종 이식편에서 ErbB3 인산화를 억제함

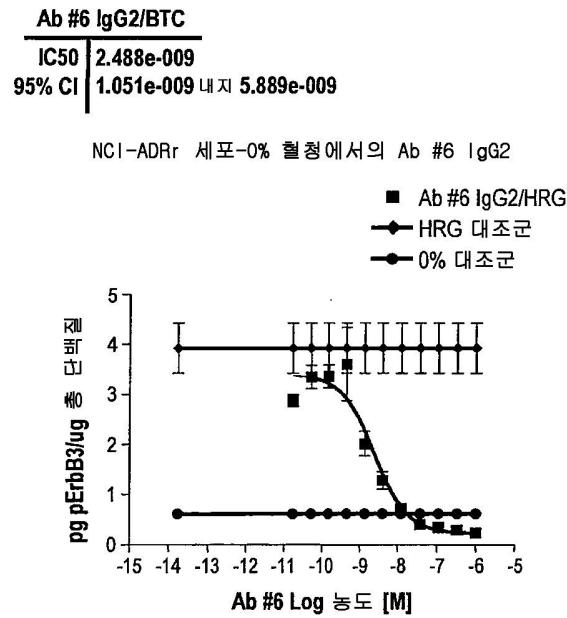
ADRr 이종 이식편에서 pErbB3 수준



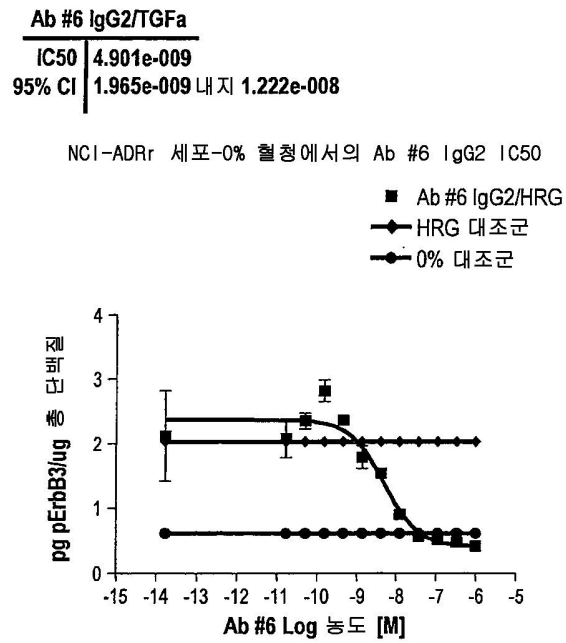
도면13a



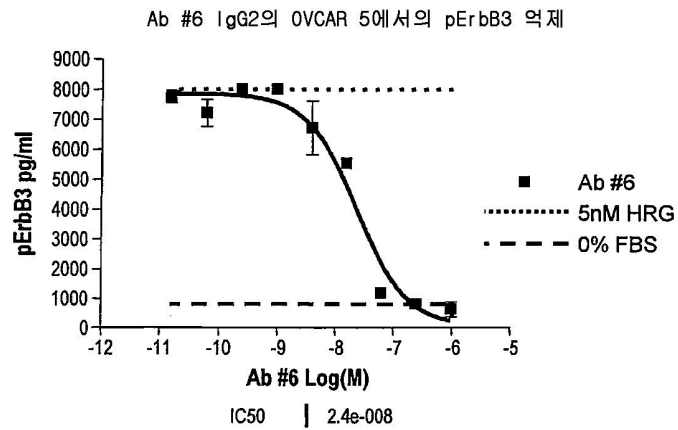
도면13b



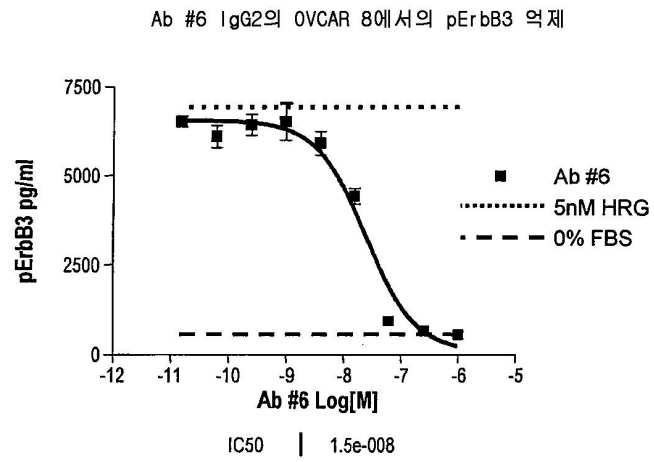
도면13c



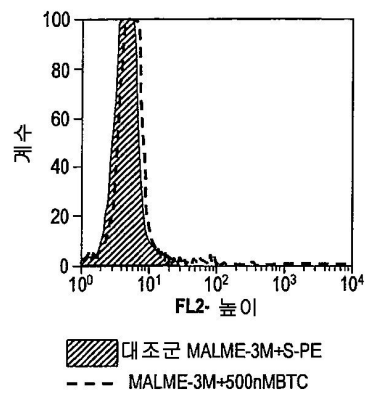
도면14a



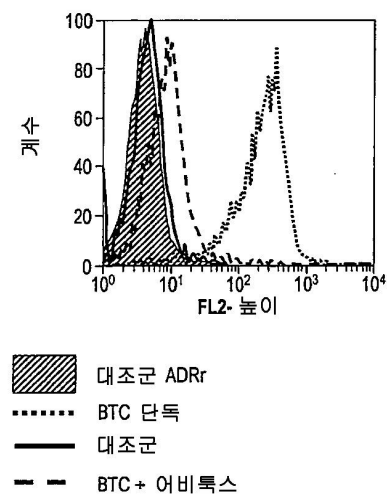
도면14b



도면15a

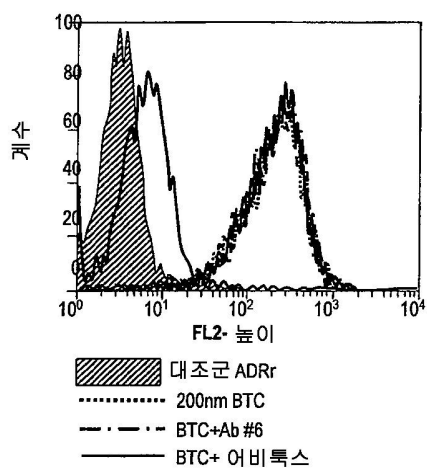


도면15b



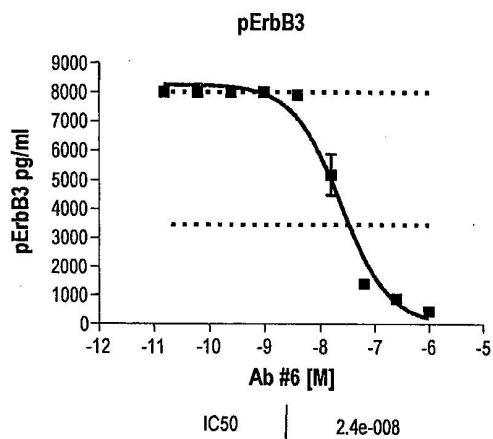
도면15c

Ab #6이 아닌 어비투스에 의한 BTC 결합 차단



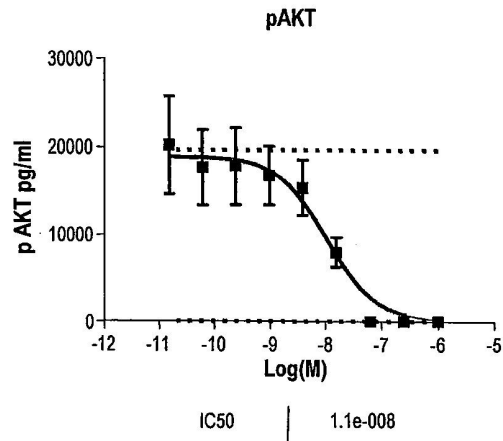
도면16a

MALME-3M에서 Ab #6 IgG2는 유사한 IC50으로 헤레글린 매개성 신호 전달을 억제함

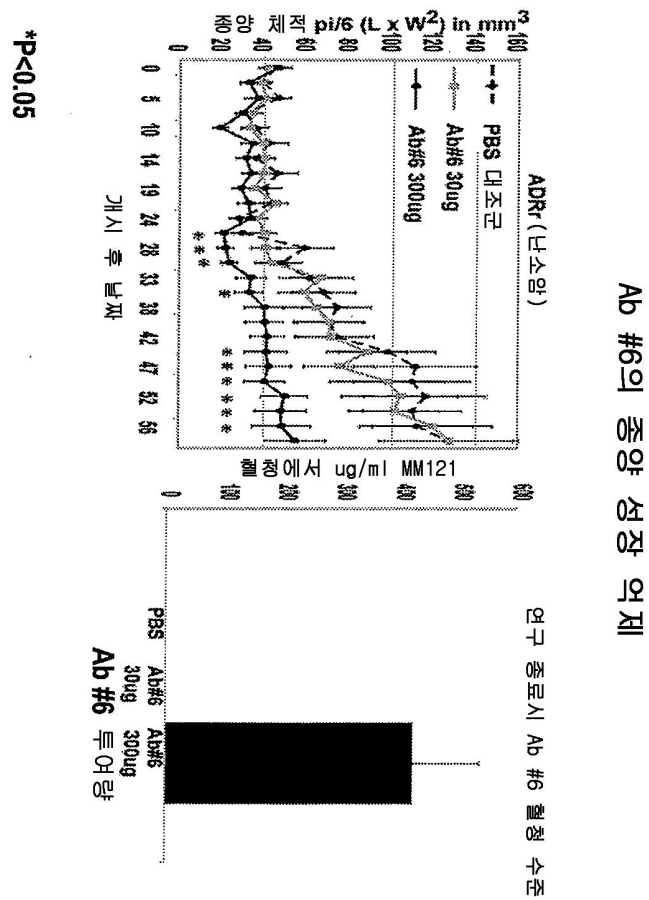


도면16b

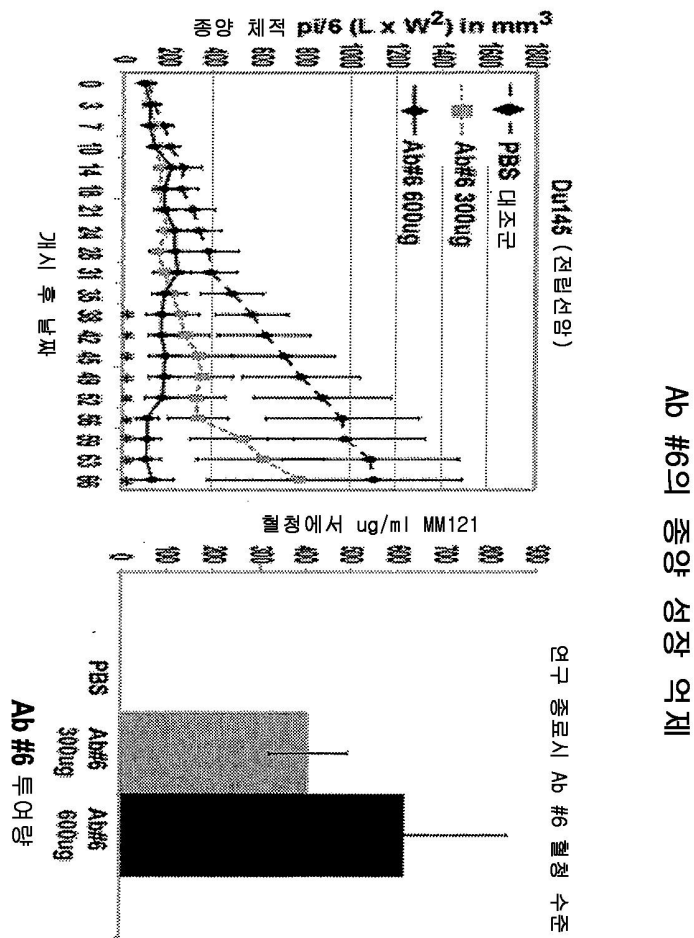
MALME-3M에서 Ab #6 IgG2는 유사한 IC50으로
헤레글린 매개성 신호 전달을 억제함



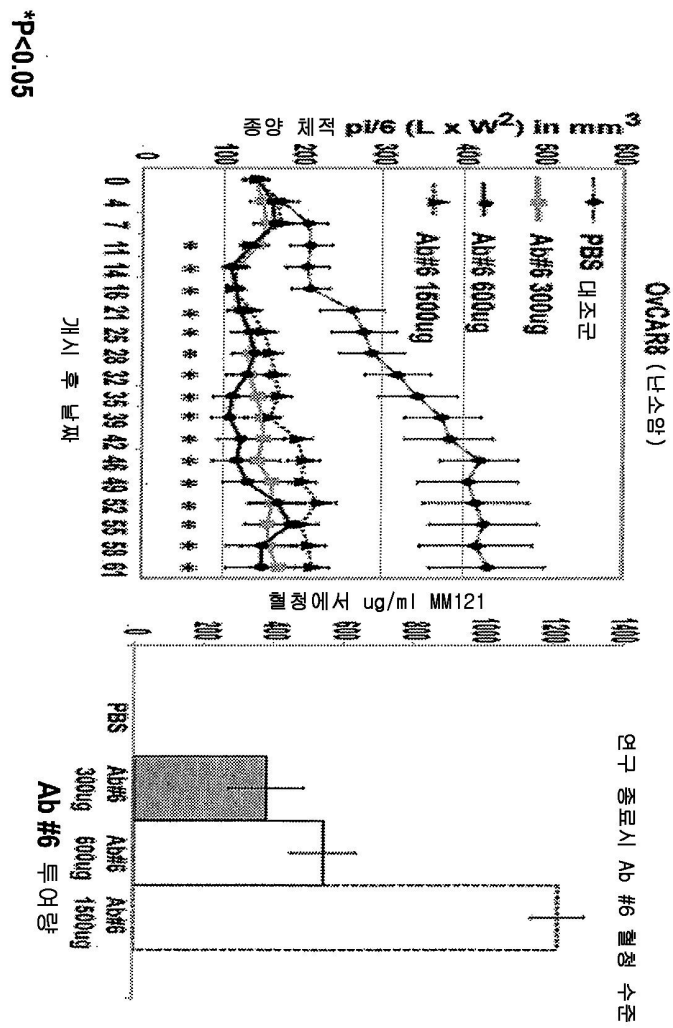
도면17a



도면17b

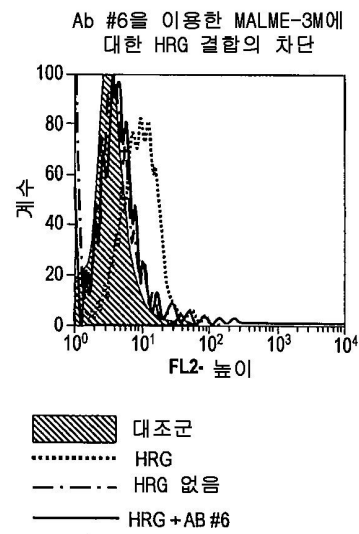


Ab #6의 종양 성장 억제

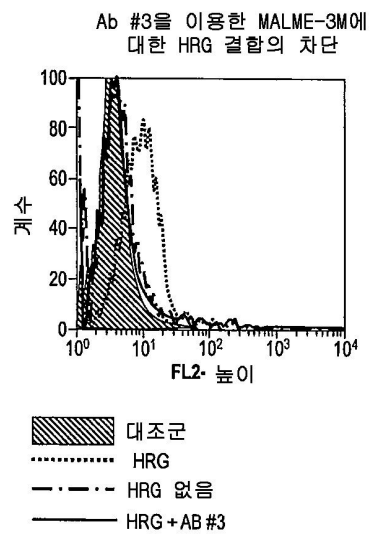


도면17c

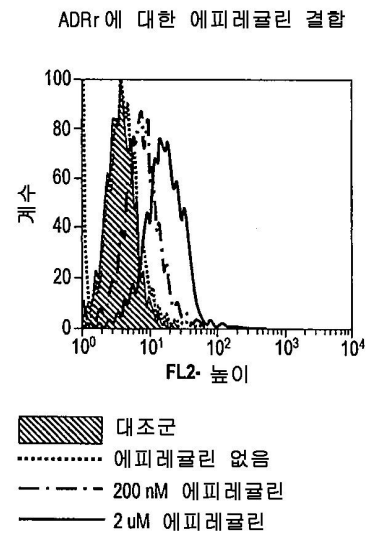
도면18a



도면18b

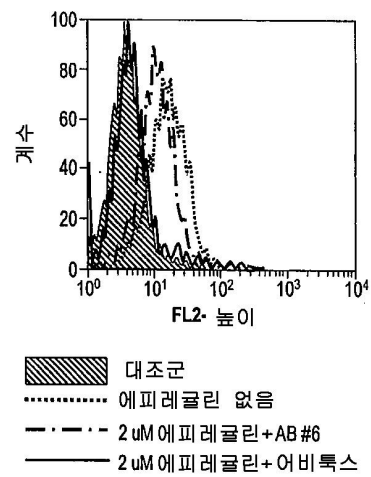


도면19a

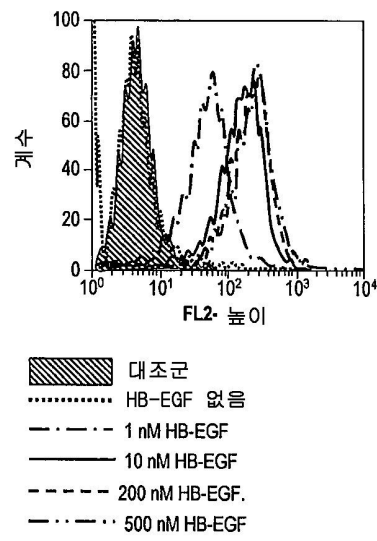


도면19b

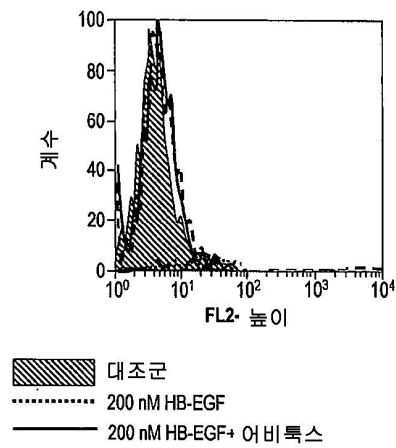
Ab #6과 어비톡스를 이용한 ADRR에 대한 에피레굴린 결합 차단



도면20a



도면20b



도면21a

Ab #6 VH 아미노산 서열 (서열번호 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS
GGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFD
YWGQGT LTVVSS

Ab #6 VL 아미노산 서열 (서열번호 2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSQYQHHPGKAPKLIYEVSQR
PSGVSNRFGSGSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTVL

Ab #3 VH 아미노산 서열 (서열번호 3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVTYP
SGATRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDV
WGQGT LTVVSS

Ab #3 VL 아미노산 서열 (서열번호 4)

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSDSNIGRNYIYWYQQFPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVTPDRISGSGSGTASLSAISGLRSEDAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

Ab #14 VH 아미노산 서열 (서열번호 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYSIS
GGHTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLLETGLLDV
AFDIWGQGTMTVTVSS

Ab #14 VL 아미노산 서열 (서열번호 6)

QYELTQPPSVSVYPGQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLMYKDKRRP
SEIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSTYVFGTGTKVTVL

Ab #17 VH 아미노산 서열 (서열번호 35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYSIS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDV
WGQGT TTVTVSS

Ab #17 VL 아미노산 서열 (서열번호 36)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASQDIGDSLWYQQKPGKAPRLIYDASNLE
TGVPPRFSGSGSGTDFTFTFSLQPEDIATYFCQSANAPFTFGPGTKVDIK

Ab #19 VH 아미노산 서열 (서열번호 37)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWVRQAPGKGLEWVSYYIGSS
GGPTYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDS
WGQGT LTVVSS

Ab #19 VL 아미노산 서열 (서열번호 38)

QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVS
NRFGSGSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSTSSSTWVFGGGTKLTVL

도면21b

Ab # 6 VH CDR1 (서열번호 7)
HYVMA

Ab # 6 VH CDR2 (서열번호 8)
SISSSGGWTLYADSVKG

Ab # 6 VH CDR3 (서열번호 9)
GLKMATIFDY

Ab # 6 VL CDR1 (서열번호 10)
TGTSSDVGSYNVVS

Ab # 6 VL CDR2 (서열번호 11)
EVSQRPS

Ab # 6 VL CDR3 (서열번호 12)
CSYAGSSIFVI

Ab # 3 VH CDR1 (서열번호 13)
AYNMR

Ab # 3 VH CDR2 (서열번호 14)
VIYPSGGATRYADSVKG

Ab # 3 VH CDR3 (서열번호 15)
GYYYYGMDV

Ab # 3 VL CDR1 (서열번호 16)
SGSDSNIGRNYTY

Ab # 3 VL CDR2 (서열번호 17)
RNNQRPS

Ab # 3 VL CDR3 (서열번호 18)
GTWDDSLSGPV

도면21c

<u>Ab # 14 VH CDR1 (서열번호 19)</u> AYGMG	<u>Ab # 19 VH CDR1 (서열번호 45)</u> RYGMW
<u>Ab # 14 VH CDR2 (서열번호 20)</u> YISPSGGHTKYADSVKG	<u>Ab # 19 VH CDR2 (서열번호 46)</u> YIGSSGGPTYVDSVKG
<u>Ab # 14 VH CDR3 (서열번호 21)</u> VLETGLLVDAFDI	<u>Ab # 19 VH CDR3 (서열번호 47)</u> GRGTPYYFDS
<u>Ab # 14 VL CDR1 (서열번호 22)</u> SGDQLGSKFVS	<u>Ab # 19 VL CDR1 (서열번호 48)</u> TGTSSDIGRWNIIVS
<u>Ab # 14 VL CDR2 (서열번호 23)</u> YKDKRRPS	<u>Ab # 19 VL CDR2 (서열번호 49)</u> DVSNRPS
<u>Ab # 14 VL CDR3 (서열번호 24)</u> QAWDSSTYV	<u>Ab # 19 VL CDR3 (서열번호 50)</u> SSYTSSSTWV
<u>Ab # 17 VH CDR1 (서열번호 39)</u> WYGMG	
<u>Ab # 17 VH CDR2 (서열번호 40)</u> YISPSGGITVYADSVKG	
<u>Ab # 17 VH CDR3 (서열번호 41)</u> LNYYYGLDV	
<u>Ab # 17 VL CDR1 (서열번호 42)</u> QASQDIGDSL N	
<u>Ab # 17 VL CDR2 (서열번호 43)</u> DASNLET	
<u>Ab # 17 VL CDR3 (서열번호 44)</u> QQSANAPFT	

도면22a

Ab # 6 VH 코돈 최적화된 핵산 서열 (서열번호 25)

gaggtgcagctgctggagagcggcggagggtgtgtccagccaggcggcagcctgaggtgtctctgcgccagcggcgttcac
cttcagccactacgtgatggcctgggtgctggcaggccccaggcaaggcctggaatgggtgtccagcatcagcagcagcggcg
ctggaccctgtacgccgacagcgtgaaggcagggttcacatcagcagggacaacagcaagaacacccctgtacctgcagatgaa
agcctgaggccgagagacacccgctgtactactgcaccaggggcctgaagatggccacatcttcgactactggggccagggc
accctggtgaccgtgagcagc

Ab # 6 VL 코돈 최적화된 핵산 서열 (서열번호 26)

cagtcggccctgaccagcccgccagcgtgagcggcagccaggccagagcatcacatcagctgcaccggcaccagcagcga
cgtgggcagctacaacgtgtgtctgtgtatcagcagaccccgccaggcaaggcccccagctgatcatctacagggtgtccagagg
cccagcggcgtgagcaacagggttcagcggcagcaagagcggcaacaccccgccagcctgacatcagcggcctgcagaccgagg
acgaggccgactactactgtctgcagctacccggcagcagcatcttcgtgatcttcggcggaggaccaaggtgacctgtcta

Ab # 3 VH 코돈 최적화된 핵산 서열 (서열번호 27)

gaggtgcagctgctgaaagcggcggagggtgtgtgagccaggcggcagcctgaggtgtctctgcgccagcggcgttcac
cttcagcgcctacaacatgagatgggtgctggcaggccccaggcaaggcctggaatgggtgtccgtgatctacccagcggcg
agccaccagataccgacagcgtgaaggcagggttcacatcagcagggacaacagcaagaacacccctgtacctgcagatgaa
cagcctgaggccgagagacacccgctgtactactgcgccaggggctactactactacggcatggagctgtggggccagggcac
cctggtgaccgtgagcagc

Ab # 3 VL 코돈 최적화된 핵산 서열 (서열번호 28)

cagagcgtgctgaccagcccccaggcggcagcccccaggccagagggtgacctcagctgcagcggcagcagcagca
acatcggcaggaaactacatctactgtgtatcagcagttccccggcaccgccccagctgtgatctacaggaaacaccaggcc
agcggcgtgcccagagatcagcggcagcaagagcggcaccagcggcggcctgacatcagcggcctgagaagcagagac
gaggccgagtaccactgcggcacctgggacgacagcctgagcggccaggtgttcggcggagggaccaagctgacctgtcta

도면22b

Ab # 14 VH 핵산 서열 (서열번호 29)

gaagttcaattgttagagctcgtggcggtctgttcagcctgggtgttcttacgtctttcttgcgctgcttcgggattcactttctct
gcttacgggtatgggtgggttcgccaagctcctgtaagggttggagtggtttcttatctctccttcgtgggccatactaaag
tatgctgactccgttaagggtcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctactgagatgaacagcttaagggtc
tgaggacacggcggtatattactgtgcgaaagtactggaactggcttattggtgatgctttgatatctgggccaagggaaca
atggtcaccgtctcaagc

Ab # 14 VL 핵산 서열 (서열번호 30)

cagtacgaattgactcagccaccctcagtgctcgtgtaccaggacagacagccagcatcacctgctctggagatcaattggg
gagtaaatgtttcctgggtatcagcagagccagccagtcctcgtgttggtcatgtataaagataaaaggcgccgtcaga
gatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactcgaccatcagcggggaccaggctatagatgaggct
gactattattgtcaggcgtgggacagcagcacttatgtctcggcactgggaccaaggtcaccgtccta

Ab # 6 VH 미리 최적화된 핵산 서열 (서열번호 31)

gaagttcaattgttagagctcgtggcggtctgttcagcctgggtgttcttacgtctttcttgcgctgcttcgggattcactttctct
cattacgttatgggtgggttcgccaagctcctgtaagggttggagtggtttcttatctctccttcgtgggtgactctttat
gtgactcctgttaagggtcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctactgagatgaacagcttaagggtcgt
aggacacacgggtgtattactgtactagaggtctcaagatgggtcaaatgttactactggtggccaggcaccctgtgcaccg
tctcaagc

Ab # 6 VL 미리 최적화된 핵산 서열 (서열번호 32)

cagagcgcttgactcagccctgcctcgtgtcgtgggtctcctggacagtcgatcaccatctcctgcactggaaccagcagtgat
gttgggagttataatgttctcctgttaccacaacacccaggcaagccccaaactcatattatgaggtcagtcagcgg
cctcaggggtttctaactgcttctcctggctccaagtctggcaacacggcctcctgacaatctctgggtccagactgaggac
gaggctgattattactgctgctcatatgcaggtagtagtatttctgtatattcggcggagggaaccaaggtgaccgtccta

Ab # 3 VH 미리 최적화된 핵산 서열 (서열번호 33)

gaagttcaattgttagagctcgtggcggtctgttcagcctgggtgttcttacgtctttcttgcgctgcttcgggattcactttctct
gcttacaatatgcgttgggttcgccaagctcctgtaagggttggagtggtttcttatctatcctctcgttggcgctactcgtt
atgctgactccgttaagggtcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctactgagatgaacagcttaagggtc
tgaggacacggcggtgtattactgtgcgagagggtactactacaggtatggacgtctgggccaaggcaccctgtgcaccg
tctcaagc

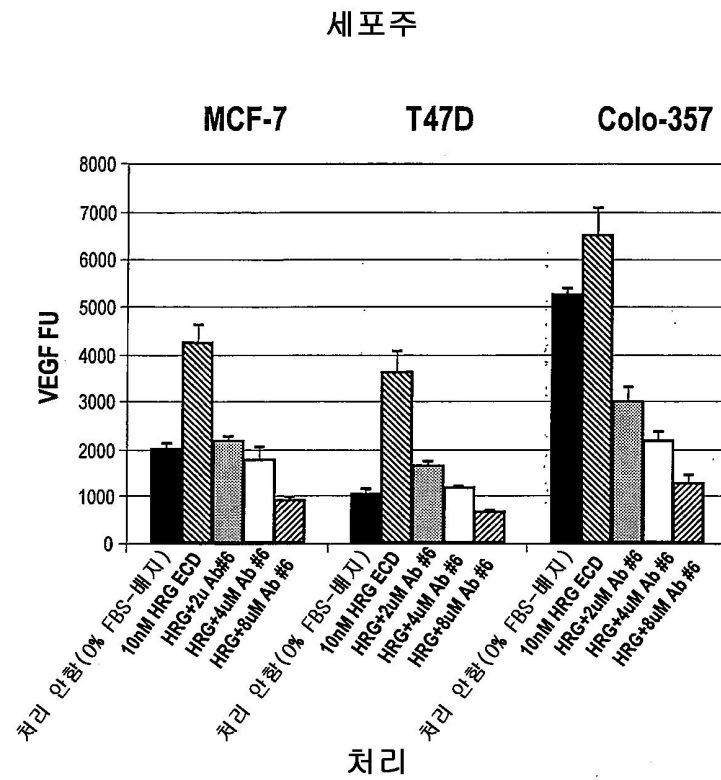
Ab # 3 VL 미리 최적화된 핵산 서열 (서열번호 34)

cagagcgcttgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcgtgttcttgggaagcgactcca
acatcggaagaaattatattatgttaccagcaattccaggaacggccccaaagctcctcatataggaataatcagcgcc
cctcaggggtccctgacccaatctctggctccaagtctggcacctcagcctcctggccatcagtggggtccggtccgaggat
gaggctgagatcactgtggaacatgggatgacagcctgagtggtccggtattcggcggagggaactaagctgaccgtccta

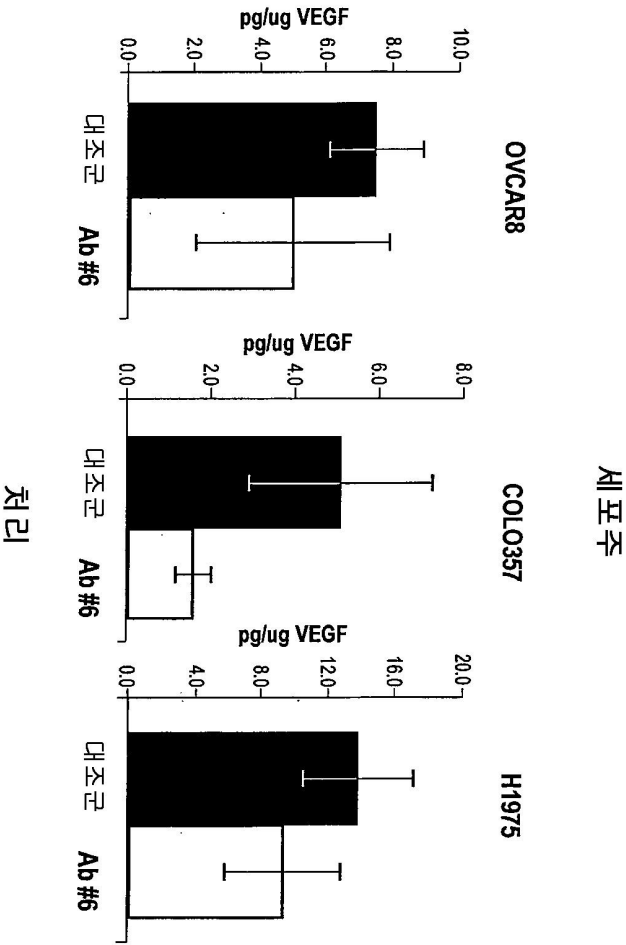
도면23

- **Ab #6 VLb:**
- QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPK
LMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYA
GSSIFVIFGGGKVTVL (서열번호 51)
- **Ab #17 VK1b:**
- QDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIGDSLNWYQQKPGKAPRLL
IYDASNLETGVPPRFSGSGSGTDFTFTRSLQPEDIATYFCQQSANAP
FTFGPGTKVDIR (서열번호 52)
- **Ab #19 VL2b:**
- QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQQHPGKAPK
LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTS
SSTVVFGGGKLTVL (서열번호 53)

도면24a

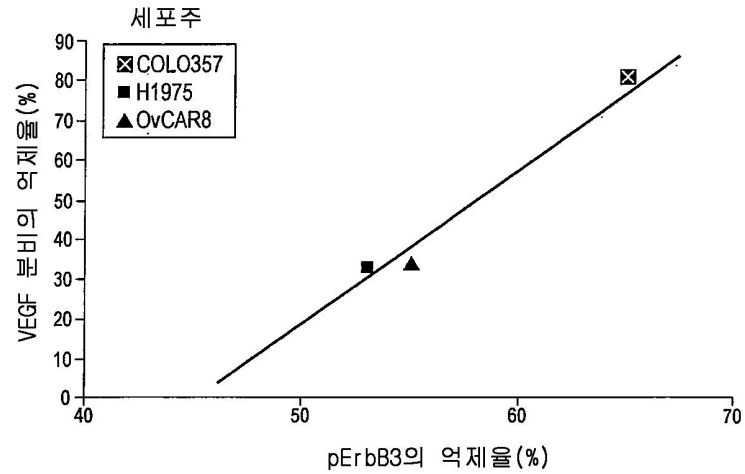


도면24b



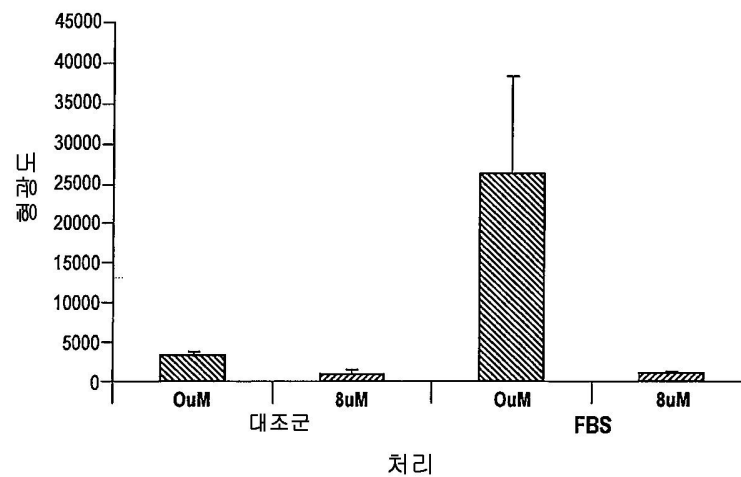
도면24c

pErbB3 억제와 VEGF 분비 억제의 상관관계



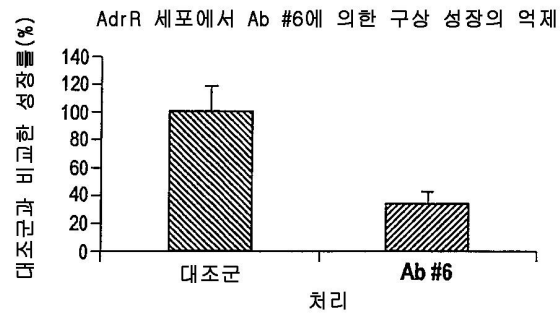
도면25

세포 이동에 있어서 Ab #6의 효과

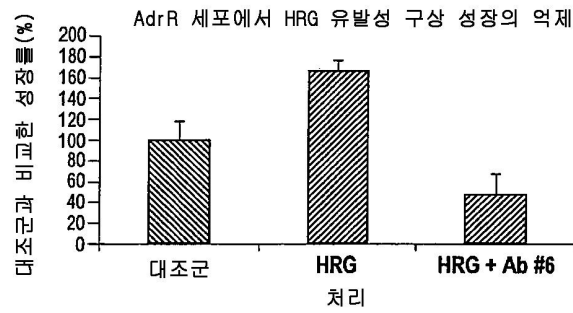


RPMI 배지 단독
RPMI + 8uM Ab #6
RPMI + 10% FBS
10% FBS + 8uM Ab #6

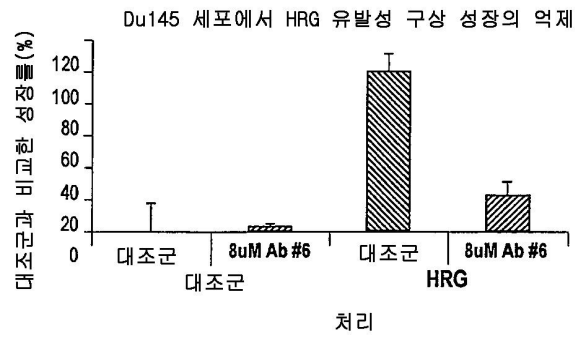
도면26a



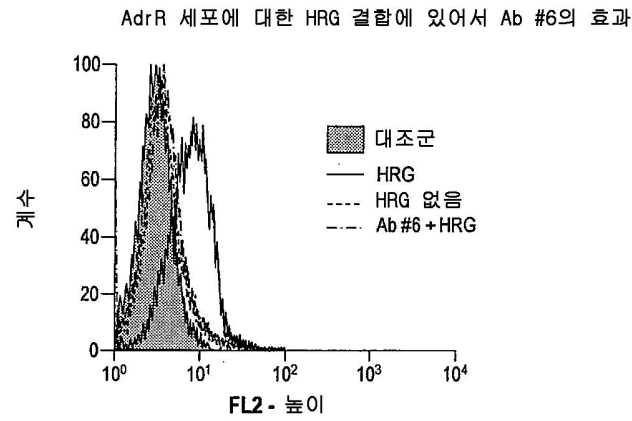
도면26b



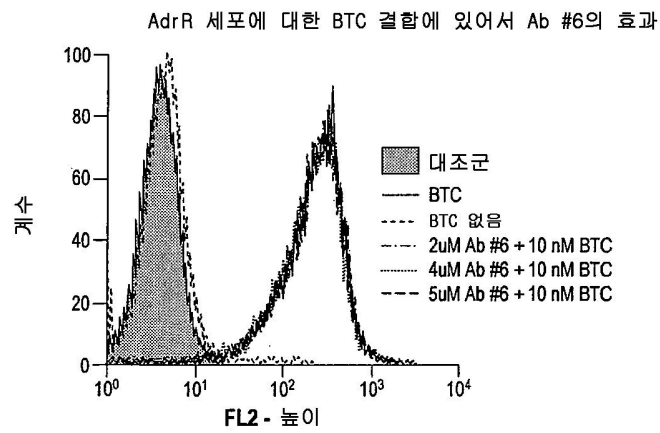
도면26c



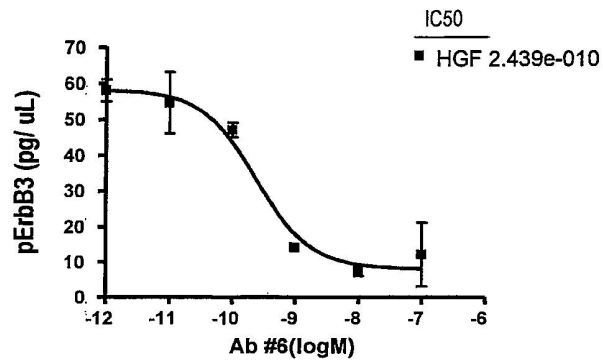
도면27a



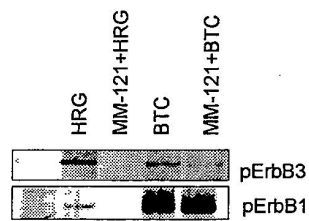
도면27b



도면28



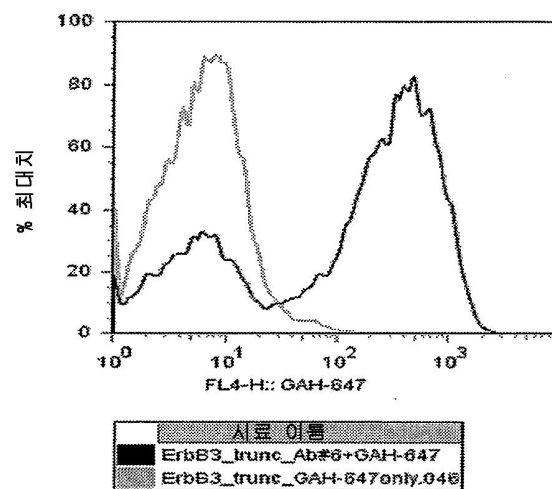
도면29a



도면29b



도면30



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.

<120> ANTIBODIES AGAINST ERBB3 AND USES THEREOF

<130> MMJ-001PC

<140> PCT/US2008/002119

<141> 2008-02-15

<150> 60/901,904

<151> 2007-02-16

<150> 61/009,796

<151> 2008-01-02

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

85

90

95

Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 2

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Ile Ile Tyr Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 4

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 5
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Leu	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Val	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								
<210> 6															
<211> 106															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"															
<400> 6															
Gln	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Gln	Leu	Gly	Ser	Lys	Phe	Val
			20					25					30		
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Met	Tyr
		35					40					45			
Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	Pro	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Ile
65					70					75					80
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Ser	Thr	Tyr	Val
				85					90					95	

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 7
His Tyr Val Met Ala
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 8
Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 9
 Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 10
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Val Val Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 11
 Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 12
 Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Phe Val Ile
 1 5 10

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 13
 Ala Tyr Asn Met Arg
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 14
 Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 15
 Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 16
 Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Ile Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 17
 Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 18
 Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 19
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 19

Ala Tyr Gly Met Gly
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 20

Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 21

Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 22

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 23

Tyr Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 24

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
1 5

<210> 25

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:

Synthetic polynucleotide"

<400> 25

gaggtgcagc tgctggagag cggcggaggg ctggtccagc caggcggcag cctgaggctg 60
tcttgccgag ccagcggcgtt caccttcagc cactacgtga tggcctgggt gcggcaggcc 120
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccagc atcagcagca gcggcggctg gaccctgtac 180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac caggggcctg 300
aagatggcca ccatcttcga ctactggggc cagggcaccc tggtagacct gagcagc 357

<210> 26

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 26

cagtccgccc tgaccagacc cggcagcgtg agcggcagcc caggccagag catcaccatc 60
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc agctacaacg tgggtgctctg gtatcagcag 120
caccgccgca agggccccc aa gctgatcatc tacgaggtgt cccagaggcc cagcggcgtg 180
agcaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctg 240
cagaccgagg acgaggccga ctactactgc tgcagctacg ccggcagcag catcttcgtg 300
atcttcggcg gagggacca ggtgaccgtc cta 333

<210> 27

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 27

gaggtgcagc tgctgaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
tcttgccgag ccagcggcgtt caccttcagc gcctacaaca tgagatgggt gcggcaggcc 120
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccgtg atctacceca gcggcggagc caccagatac 180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caggggctac 300
tactactacg gcatggacct gtggggccag ggcaccctgg tgacctgag cagc 354

<210> 28

<211> 330

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 28
cagagcgtgc tgaccagcc cccaagcgcc agcggcaccc caggccagag ggtgaccatc 60
agctgcagcg gcagcgacag caacatcggc aggaactaca tctactggtg tcagcagttc 120
cccggcaccc cccccaagct gctgatctac aggaacaacc agaggcccag cggcgtgccc 180
gacaggatca gcggcagcaa gagcggcacc agcggccagcc tggccatcag cggcctgaga 240

agcaggagcg aggccgagta ccactgcggc acctgggacg acagcctgag cggcccagtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 29
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 29
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gcttacggtg tgggttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaac gtttggagtg ggtttcttat atctctctt ctggtggcca tactaagtat 180
gctgactcgg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtactg 300
gaaactggct tattggttga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360
tcaagc 366

<210> 30
<211> 318
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 30
cagtacgaat tgactcagcc accctcagtg tccgtgtacc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagatcaatt ggggagtaaa tttgtttcct ggtatcagca gaggccaggc 120

cagtcgccctg tgttggtcat gtataaagat aaaaggcggc cgtcagagat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctata 240
 gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggcactggg 300
 accaaggtca ccgtccta 318

<210> 31
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic polynucleotide"

<400> 31
 gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttagctctt 60
 tcttgcgctg cttccgatt cactttctct cattacgtta tggcttgggt tcgccaagct 120
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctct atctcttctt ctggtggctg gactctttat 180
 gctgactcgc ttaaaggctg cttactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac tagaggctctc 300
 aagatggcta caatttttga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcaagc 357

<210> 32
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic polynucleotide"

<400> 32
 cagagcgttt tgactcagcc tgcctcgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tctgactgag gaaccagcag tgatgttggg agttataatg ttgtctcctg gtaccaacaa 120
 caccagcga aagccccaa actcatcatt tatgaggtca gtcagcggcc ctcaggggtt 180
 tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacaat ctctgggctc 240
 cagactgagg acgaggtga ttattactgc tgcctcatatg caggtagtag tattttcgtg 300
 atattcggcg gagggacca ggtgaccgtc cta 333

<210> 33
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:"

Synthetic polynucleotide"

<400> 33
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccgatt cactttctct gcttacaata tgcgttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctatcctt ctggtggcgc tactcgttat 180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtac 300
tactactacg gtatggacgt ctggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc aagc 354

<210> 34
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polynucleotide"

<400> 34
cagagcgtct tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcgtgttctg gaagcgactc caacatcgga agaaattata tatattggtg ccagcaattc 120
ccaggaacgg cccccaagct cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180
gaccgaatct ctggtcctca gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccgg 240
tccgaggatg aggtctgagta tctactgtga acatgggatg acagcctgag tgggtccgta 300
ttcggcggag ggactaagct gaccgtccta 330

<210> 35
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 35
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30
Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 36
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic polypeptide"
 <400> 36
 Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp
 20 25 30
 Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 37
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Gly Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic polypeptide"

<400> 38
 Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
 20 25 30

Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 39

Trp Tyr Gly Met Gly
1 5

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 40
Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 41
Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 42
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp Ser Leu Asn

1 5 10

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 43
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 44
 Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro Phe Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 45
 Arg Tyr Gly Met Trp
 1 5

<210> 46

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 46
 Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 47
 Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic peptide"

<400> 48
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp Asn Ile Val Ser
 1 5 10

<210> 49
 <211> 7

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 49
Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic peptide"

<400> 50
Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 51
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 51
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> /note="Description of Artificial Sequence:
Synthetic polypeptide"

<400> 52

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp
20 25 30

Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg

100

105

<210> 53
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> /note="Description of Artificial Sequence:
 Synthetic polypeptide"

<400> 53
 Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
 20 25 30

Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110