



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월21일
(11) 등록번호 10-1243590
(24) 등록일자 2013년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 31/7012**
(2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7008903
(22) 출원일자(국제) 2005년10월19일
 심사청구일자 2010년10월19일
(85) 번역문제출일자 2007년04월19일
(65) 공개번호 10-2007-0068385
(43) 공개일자 2007년06월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/037471
(87) 국제공개번호 WO 2006/044908
 국제공개일자 2006년04월27일
(30) 우선권주장
 60/620,413 2004년10월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
 WO2003105894 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 히스티딘-아세테이트 완충제 중의 항체 제형

(57) 요 약

본 출원에는 HER2의 도메인 II와 결합하는 항체 [예를 들어, 페르투주마브 (Pertuzumab)]를 포함하는 제형, 및 DR5와 결합하는 항체 [예를 들어, 아포마브 (Apomab)]를 포함하는 제형 뿐만 아니라 히스티딘-아세테이트 완충제 중에서 제형화된 모노클로날 항체를 포함한 항체 제형이 기재되어 있다.

대 표 도



(72) 발명자

리우, 준

미국 94044 캘리포니아주 퍼시피카 글레이셤 애비
뉴 1108

센, 예

미국 94112 캘리포니아주 샌프란시스코 팩손 애비
뉴 386

특허청구의 범위

청구항 1

20 mg/mL 내지 40 mg/mL 농도의 페르투주마브(pertuzumab), 10 mM 내지 40 mM 농도의 히스티딘-아세테이트 완충제, 60 mM 내지 250 mM 농도의 수크로스, 및 0.01% 내지 0.1% 농도의 폴리소르베이트 20을 포함하며, pH가 5.5 내지 6.5이고, 페르투주마브가 서열 3에 나타낸 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 4에 나타낸 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 페르투주마브가 서열 15에 나타낸 경쇄 아미노산 서열 및 서열 16에 나타낸 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, pH가 5.8 내지 6.2인 제약 제형.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 30 mg/mL의 페르투주마브, 20 mM의 히스티딘-아세테이트, 120 mM의 수크로스, 및 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함하며, pH가 6.0인 제약 제형.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 질병 또는 장애를 치료하는데 유효한 양으로 대상체에게 제약 제형을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서의 질병 또는 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 제약 제형.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 암을 치료하는데 유효한 양으로 대상체에게 제약 제형을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 사용하기 위한 제약 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 암이 HER2-발현성 암인 제약 제형.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

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

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

명세서

[0001] 본 출원은 2004년 10월 20일자로 출원된 미국 가출원 제60/620,413호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 대한 우선권을 청구하고 있는, 37 CFR 1.53(b) 하에 출원된 비-가출원이다.

기술 분야

[0002] 본 발명은 HER2의 도메인 II와 결합하는 항체 [예를 들어, 페르투주마브 (Pertuzumab)]를 포함하는 제형, 및 DR5와 결합하는 항체 [예를 들어, 아포마브 (Apomab)]를 포함하는 제형 뿐만 아니라 히스티딘-아세테이트 완충제 중에 제형화된 모노클로날 항체를 포함한 항체 제형에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 과거 10년간, 생명공학 기술 분야에서의 진보로 인해 재조합 DNA 기술을 사용하여 제약 적용을 위한 각종 단백질을 생산하는 것이 가능하였다. 단백질은 전통적인 유기 및 무기 약물보다 더 크고 보다 복잡하기 때문에 (즉, 복잡한 3차원적 구조 이외에도 여러 가지 관능기를 보유하고 있기 때문에), 이러한 단백질을 제형화하는 것은 특수한 문제점을 안고 있다. 단백질이 자신의 생물학적 활성을 유지하기 위해서는, 제형이 이러한 단백질의 아미노산의 적어도 코어 서열의 입체 형태적 원형을 보존해야 함과 동시에 단백질의 여러 가지 관능기가 분해되지 않도록 해야만 한다. 단백질에 대한 분해 경로는 화학적 불안정성 (즉, 결합 형성이나 절단에 의해 단백질을 변형시켜 새로운 화학적 실재물을 생성시키는 것을 포함하는 모든 과정) 또는 물리적 불안정성 (즉, 단백질의 보다 고 차원 구조 상의 변화)과 관련이 있을 수 있다. 화학적 불안정성은 탈아미드화, 라세미화, 가수분해, 산화, 베타 제거 또는 디설파이드 교환으로부터 비롯될 수 있다. 물리적 불안정성은, 예를 들어 변성, 응집, 침전 또는 흡착으로부터 비롯될 수 있다. 가장 흔히 발생하는 3가지 단백질 분해 경로가 단백질 응집, 탈아미드화 및 산화이다 [참고: Cleland et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993)].

항체 제형

[0005] 제약 적용을 위해 사용되는 단백질에는 항체가 포함된다. 요법에 유용한 항체의 한 예는 HER2 항원과 결합하는 항체, 예를 들어 페르투주마브이다.

[0006] 미국 특허 제6,339,142호에는 항-HER2 항체와 그의 하나 이상의 산성 변이체의 혼합물 (여기서, 산성 변이체(들)의 양은 약 25% 미만이다)을 포함하는 HER2 항체 조성물이 기재되어 있다. 트라스투주마브 (Trastuzumab)가 HER2 항체의 한 예이다.

[0007] 미국 특허 제6,267,958호 및 제6,685,940호 (Andya et al.)에는 HER2 및 IgE 항체 제형을 포함한 동결건조 항체 제형이 기재되어 있다. WO97/04807 및 US 2004/0197326A1 (Fick et al.)에는 IgE 항체를 사용하여 알레르기성 친식을 치료하는 방법이 기재되어 있다. WO99/01556 (Lowman et al.)은 이성체화되기 쉬운 아스파르til 잔기를 수반한 IgE 항체, 및 그의 개선된 변이체에 관한 것이다. US 2002/0045571 (Liu et al.)은 인간화 IgE 항체 제형인 rhuMAb E25 및 E26으로써 예시된, 점도가 저하된 농축 단백질 제형을 제공한다. WO 02/096457 및 US 2004/0170623 (Arvinte et al.)에는 항-IgE 항체 E25를 포함하는 안정한 액상 제형이 기재되어 있다. 또한, 고 농도의 항-IgE 제형에 관한 US 2004/0197324 A1 (Liu and Shire)을 참고할 수 있다.

[0008] 미국 특허 제6,171,586호 (Lam et al.)에는 안정한 수성 항체 제형이 기재되어 있다. $F(ab')_2$ rhuMAb CD 18 항체를 나트륨 아세테이트 및 히스티딘-HCl 완충제에서 제형화하였다. rhuMAb CD18에 대한 바람직한 제형은 10 mM 나트륨 아세테이트, 8% 트레할로스, 0.01% TWEEN 20TM (pH 5.0)이다. 40°C에서 1개월 동안 저장한 rhuMAb CD20의 아세테이트 (pH 5.0) 제형은 히스티딘 (pH 5.0 또는 6.0)에서 제형화된 샘플보다 더 큰 안정성을 나타내

었다.

- [0009] US 2003/0190316 (Kakuta et al.)은 인간화 IL-6 수용체 항체인 제형화된 항체 hPM-1에 관한 것이다. 단량체 손실은 나트륨 시트레이트 (pH 6.7)에서 가장 컼고, 그 다음으로 인산나트륨 (pH 6.8), 트리스 (Tris)-HCl (pH 7.2), 히스티딘-HCl (pH 7.2) 및 글리신 (pH 7.6) 순으로 단량체 손실이 줄어들었다. hPM-1의 안정성에 대한 인산염-Na (pH 6.5), 인산염-His (pH 6.0 또는 6.5), His-HCl (pH 6.5), 및 인산염-Na (pH 6.0)의 효과를 평가하였다.
- [0010] WO2004/071439 (Burke et al.)에는 외견상 금속 이온과 히스티딘이 관여한 산화 반응을 통하여, 폴리소르베이트 80의 분해로 인해 나탈리주마브 (natalizumab) (항-알파4 인테그린 인간화 모노클로날 항체) 제형에서 불순물이 발생하였다고 언급되어 있다. 따라서, 인산염 완충제가 선택되었다.
- [0011] WO 2000/066160 (영어 대응물 EP 1 174 148A1) (Okada et al.)은 인산나트륨 또는 나트륨 시트레이트 완충제 중의, 인간 혈소판 막 당단백질 GPIIb/IIIa의 피브리노겐 수용체와 결합하는 인간화 C4G1 항체의 제형을 지칭하고 있다.
- [0012] WO2004/019861 (Johnson et al.)은 50 mM 나트륨 아세테이트 (pH 5.5) 및 125 mM 염화나트륨 중에서 200 mg/ml 으로 제형화된, 폐길화 항-TNF α Fab 단편인 CDP870에 관한 것이다.
- [0013] WO2004/004639 (Nesta, P.)은 50 mM 석신산 완충제 (pH 6.0) 및 수크로스 (5% w/v) 중의 종양 활성화 면역독소인 huC242-DM1에 대한 제형을 지칭하고 있다.
- [0014] WO03/039485 (Kaisheva et al.)은 다클리주마브 (Dacilizumab) (인간화 IL-2 수용체 항체)가 나트륨 숙시네이트 완충제 (pH 6.0)에서 가장 높은 안정성을 나타내었고, 이러한 완충제가 산화됨에 따라 히스티딘 내에서의 효력이 급격히 상실된다는 사실을 밝혀내었다.
- [0015] WO 2004/001007은 히스티딘 HCl, 나트륨 아세테이트 또는 나트륨 시트레이트 완충제 중의 CD80 모노클로날 항체에 관한 것이다.
- [0016] 미국 특허 제6,252,055호 (Relton, J.)는 말레이트, 숙시네이트, 나트륨 아세테이트 또는 인산염 완충제 중에서 제형화된 (이들 중에서 인산염이 바람직한 완충제인 것으로 확인되었다) 항-CD4 및 항-CD23 항체를 지칭하고 있다.
- [0017] 미국 특허 제5,608,038호 (Eibl et al.)는 내부에 면역글로불린, 글루코스 또는 수크로스, 및 염화나트륨을 수반한 고도로 농축된 폴리클로날 면역글로불린 제제를 지칭하고 있다.
- [0018] WO03/015894 (Oliver et al.)은 제형화할 경우 (동결건조시키기 전)에 25 mM 히스티딘, 1.6 mM 글리신 및 3% w/v 만니톨 (pH 6.0)을 함유하는 동결건조된 SYNAGIS[®]
, 및 100 mg/mL SYNAGIS[®]
, 25 mM 히스티딘-HCl, 1.6 mM 글리신 (pH 6.0)의 수성 제형을 지칭하고 있다.
- [0019] US 2004/0191243 A1 (Chen et al.)에는 인간 IgG2 항체인 ABX-IL8의 제형이 보고되었다.
- [0020] US 2003/0113316 A1 (Kaisheva et al.)은 동결건조된 항-IL2 수용체 항체 제형을 지칭하고 있다.
- [0021] **HER2 항체**
- [0022] HER 계열의 수용체 티로신 키나제는 세포 성장, 분화 및 생존에 있어 중요한 매개인자이다. 이러한 수용체 계열에는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1, 또는 HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185^{neu}), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 포함한 4가지 별개의 구성원이 포함된다.
- [0023] erbB1 유전자에 의해 코딩된 EGFR은 인간 악성 종양의 원인에 밀접한 영향을 끼쳐 왔다. 특히, EGFR의 발현 증가가 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암 및 위암 뿐만 아니라 교모세포종에서 관찰되었다. EGFR 수용체 발현 증가는 종종, 자가분비 자극 경로에 의한 수용체 활성화를 가져다 주는 동일한 종양 세포에 의해, EGFR 리간드, 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- α)의 생성 증가와 연관이 있다 [참고: Baselga and Mendelsohn *Pharmac Ther.* 64:127-154 (1994)]. EGFR 또는 그의 리간드, TGF- α 및 EGF에 대항하여 유도된 모노클로날 항체가 이러한 악성 종양을 치료하는데 있어 치료제로서 평가되었다 [참고: 예를 들어, Baselga and Mendelsohn., 상기 참고; Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); 및 Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905

(1995)].

[0024] HER 계열의 제2 구성원인 p185^{neu}은 화학적으로 처리시킨 랫트의 신경모세포종으로부터 전환 유전자의 생성물로서 처음으로 확인되었다. 활성화 형태의 neu 원종양형성 유전자는 코딩된 단백질의 막관통 영역 내에서의 점 돌연변이 (발린이 글루탐산으로 돌연변이됨)로부터 비롯된 것이다. neu의 인간 동족체 증폭이 유방암 및 난소암에서 관찰되었으며, 이는 불량한 예후와 상관이 있다 [참고: Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); 및 미국 특허 제4,968,603호]. 현재까지, neu 원종양형성 유전자 내에서의 점 돌연변이와 유사한 어떠한 점 돌연변이도 인간 종양에 대해 보고된 바가 없었다. HER2의 과발현 (늘 그런 것은 아니지만 종종 유전자 증폭에 기인한다)이, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광 암종을 포함한 기타 암종에서 또한 관찰되었다 [참고: King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhou et al., *Mol Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland et al., *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams et al., *Pathobiology* 59:46-52 (1991); 및 McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990)]. HER2은 전립선 암에서 과발현될 수도 있다 [참고: Gu et al., *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross et al., *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross et al., *Cancer* 79:2162-70 (1997); 및 Sadasivan et al., *J. Urol.* 150:126-31 (1993)].

[0025] 랫트 p185^{neu} 및 인간 HER2 단백질 생성물에 대항하여 유도된 항체가 보고되었다. 드레빈 (Drebin)과 그의 동료들은 랫트 neu 유전자 생성물 p185^{neu}에 대항한 항체를 생성하였다 [참고: 예를 들어, Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); 및 WO94/22478]. 문헌 [참고: Drebin et al., *Oncogene* 2:273-277 (1988)]에는 p185^{neu}의 2가지 별개 영역과 반응성인 항체들의 혼합물이, 누드 마우스 내로 이식된 neu-형질전환된 NIH-3T3 세포에 대한 상승적 항종양 효과를 야기시킨다고 보고되었다 [또한, 미국 특허 제5,824,311호 (1998년 10월 20일자로 허여됨) 참고].

[0026] 문헌 [참고: Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)]에는 인간 유방 종양 세포주 SK-BR-3를 사용하여 성상 확인한 HER2 항체 패널의 생성 방법에 관해 기재되어 있다. 상기 항체에 대한 노출 후 SK-BR-3 세포의 상대적 세포 증식은, 72시간 후 단층을 크리스탈 바이올렛 염색함으로써 결정하였다. 이러한 검정을 사용하여, 세포성 증식을 56% 정도 억제시킨 항체 (4D5로 지칭됨)를 사용하여 최대 억제를 획득하였다. 패널 내의 기타 항체들은 이러한 검정에서 보다 덜한 정도로 세포성 증식을 저하시켰다. 항체 4D5는 HER2-과발현성 유방 종양 세포주가 TNF-α의 세포독성 효과에 감작되도록 한다는 사실이 추가로 밝혀졌다 [참고: 미국 특허 제5,677,171호 (1997년 10월 14일자로 허여됨)]. 후드지악 (Hudziak) 등의 문헌에서 논의된 HER2 항체가 다음 문헌에서 추가로 성상 확인되었다 [참고: Fendly et al., *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al., *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup et al., *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard et al., *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar et al., *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras et al., *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al., *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott et al., *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis et al., *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); 및 Schaefer et al., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)].

[0027] 뮤린 HER2 항체 4D5의 재조합 인간화 버전 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, 트라스투주마브 또는 HERCEPTIN® ; 미국 특허 제5,821,337호)은 기존에 광범위한 항암 요법을 받은 적이 있는 HER2-과발현성 전이성 유방암 환자에게서 임상적으로 활성을 나타낸다 [참고: Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)]. 트라스투주마브는 HER2 단백질을 과발현하는 전이성 유방암 환자를 치료하도록 1998년 9월 25일자로 식품 의약청으로부터 승인되어 판매되고 있는 약품이다.

[0028] 각종 특성을 지닌 기타 HER2 항체가 다음 문헌에 보고되었다 [참고: Tagliabue et al., *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie et al., *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier et al., *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88:8691-8695

(1991); Bacus et al. *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu et al. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54: 1367-1373 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); U.S. Patent No. 5,783,186; 및 Klapper et al. *Oncogene* 14:2099-2109 (1997)].

[0029] 상동성 스크리닝 결과, 다음 2가지 기타 HER 수용체 계열 구성원을 동정하였다: HER3 [참고: 미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호; 및 Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)] 및 HER4 [참고: EP 특허 출원 제599,274호; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); 및 Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)]. 이들 수용체 둘 다는 적어도 몇몇 유방암 세포주 상에서의 발현 증가를 나타내었다.

[0030] 상기 HER 수용체들은 일반적으로, 세포에서 각종 조합으로 발견되고, 이종-이랑체화가 각종 HER 리간드에 대한 세포성 반응의 다양성을 증가시키는 것으로 여겨진다 [참고: Earp et al. *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132 (1995)]. EGFR는 6가지 상이한 리간드에 의해 연결된다: 표피 성장 인자 (EGF), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 암페리게루린 (amphiregulin), 헤파린 결합성 표피 성장 인자 (HB-EGF), 베타셀룰린 (betacellulin) 및 에피리게루린 (epiregulin) [참고: Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]. 단일 유전자의 대체 스플라이싱으로부터 비롯되는 헤레글린 (heregulin) 단백질 계열은 HER3 및 HER4에 대한 리간드이다. 헤레글린 계열에는 알파, 베타 및 감마 헤레글린 [참고: Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); 미국 특허 제5,641,869호; 및 Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]; neu 분화 인자 (NDFs), 신경교성 성장 인자 (GGF); 아세틸콜린 수용체 유도 활성 (ARIA); 및 감각 및 운동 신경원 유래 인자 (SMDF)가 포함된다 [참고: Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) 및 Lee et al. *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995)]. 최근에는 3가지 부가의 HER 리간드가 확인되었다: HER3 또는 HER4와 결합하는 것으로 보고된 뉴레글린 (neuregulin)-2 (NRG-2) [참고: Chang et al. *Nature* 387:509-512 (1997); 및 Carraway et al. *Nature* 387:512-516 (1997)]; HER4와 결합하는 뉴레글린-3 [참고: Zhang et al. *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)]; 및 HER4와 결합하는 뉴레글린-4 [참고: Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)]. HB-EGF, 베타셀룰린 및 에피리게루린 또한 HER4와 결합한다.

[0031] EGF와 TGF α 가 HER2와 결합하지 않긴 하지만, EGF는 EGFR과 HER2를 자극하여 이종-이랑체를 형성시키는데, 이는 EGFR를 활성화시키고 이종-이랑체 중의 HER2를 인산전이 반응시킨다. 이랑체화 및/또는 인산전이 반응이 HER2 티로신 키나제를 활성화시키는 것으로 보인다 [Earp et al., 상기 참고]. 마찬가지로, HER3이 HER2와 공동 발현되는 경우에는, 활성 신호 전달 복합체가 형성되고 HER2에 대항하여 유도된 항체가 이러한 복합체를 붕괴시킬 수 있다 [참고: Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]. 부가적으로, 헤레글린 (HRG)에 대한 HER3의 친화성은 HER2와 공동 발현되는 경우에 보다 높은 친화 상태로 증가된다. 또한, HER2-HER3 단백질 복합체에 관한 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Levi et al., *Journal of Neuroscience* 15:1329-1340 (1995); Morrissey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435 (1995); 및 Lewis et al., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996)]. HER4는 HER3과 마찬가지로, HER2와 함께 활성 신호 전달 복합체를 형성한다 [참고: Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)].

[0032] HER 신호 전달 경로를 표적으로 하기 위해, HER2와 기타 HER 수용체와의 이랑체화를 억제함으로써 리간드-구동된 인산화 및 활성화와, RAS 및 AKT 경로의 하단 활성화를 억제시키는 인간화 항체로서 rhuMAb 2C4 [페르투주마브, OMNITARG™]를 개발하였다. 고형 종양을 치료하기 위한 단일 작용제로서의 페르투주마브의 제I상 시험에서는, 3명의 진행된 난소암 환자를 페르투주마브로 치료하였다. 1명은 영속적인 부분 반응을 나타내었고, 다른 대상체는 15주 동안 안정한 질병 상태를 나타내었다 [참고: Agus et al. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 192, Abstract 771 (2003)].

[0033] DR5 항체

[0034] 종양 괴사 인자 (TNF) 초분자군에 속하는 각종 리간드 및 수용체가 당해 분야에서 동정되었다. 이러한 리간드에는 종양 괴사 인자-알파 ("TNF-알파"), 종양 괴사 인자-베타 ("TNF-베타" 또는 "림포토신-알파"), 림포토신-베타 ("LT-베타"), CD30 리간드, CD27 리간드, CD40 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, LIGHT, Apo-1 리간드 (Fas 리간드 또는 CD95 리간드로서 지칭되기도 함), Apo-2 리간드 (Apo2L 또는 TRAIL로서 지칭되기도 함), Apo-3 리간드 (TWEAK로서 지칭되기도 함), APRIL, OPG 리간드 (RANK 리간드, ODF, 또는 TRANCE로서 지칭되기도 함), 및 TALL-1 (BlyS, BAFF 또는 THANK로서 지칭되기도 함)이 포함된다 [참고: 예를 들어, Ashkenazi, *Nature*

Review, 2:420-430 (2002); Ashkenazi and Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi and Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997); Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley et al., *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Schmid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry et al., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning et al., *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage et al. *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 (1997년 1월 16일자로 공개됨); WO 97/25428 (1997년 7월 17일자로 공개됨); Marsters et al., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); WO 98/28426 (1998년 7월 2일자로 공개됨); WO 98/46751 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 98/18921 (1998년 5월 7일자로 공개됨); Moore et al., *Science*, 285:260-263 (1999); Shu et al., *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider et al., *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay et al., *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)].

[0035]

이러한 TNF 계열 리간드에 의해 매개된 각종 세포성 반응의 유도는 전형적으로, 특이적 세포 수용체에 대한 그들의 결합성에 의해 개시된다. 전부는 아니지만, 몇몇 TNF 계열 리간드는 세포 표면 "사멸 수용체"와 결합하고, 이러한 수용체를 통하여 각종 생물학적 활성을 유도시켜 카스파제, 또는 세포 사멸 또는 세포소멸 경로를 수행하는 효소를 활성화시킨다 [참고: Salvesen et al., *Cell*, 91:443-446 (1997)]. 지금까지 확인된 TNF 수용체 초분자군의 구성원들은 TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (Apo-1 또는 CD95로서 지칭되기도 함), DR4 (TRAIL-R1로서 지칭되기도 함), DR5 (Apo-2 또는 TRAIL-R2로서 지칭되기도 함), DcR1, DcR2, 오스테오프로테게린 (osteoprotegerin) (OPG), RANK 및 Apo-3 (DR3 또는 TRAMP로서 공지되기도 함)이다.

[0036]

이들 TNF 수용체 계열 구성원들의 대부분은 세포 표면 수용체 특유의 구조 (이에는 세포외, 막관통 및 세포내 영역이 포함된다)를 공유하고 있는 반면, 다른 것들은 막관통 도메인과 세포내 도메인이 결여된 가용성 단백질로서 천연상 발견된다. 전형적인 TNFR의 세포외 부분은 NH₂-말단으로부터 출발하여, 다중 시스테인-풍부 도메인 (CRD)의 반복 아미노산 서열 패턴을 함유하고 있다.

[0037]

Apo2-L 또는 TRAIL로서 지칭된 리간드가 TNF 계열 사이토kin의 구성원으로서 수년 전에 확인되었다 [참고: 예를 들어, Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); WO 97/01633; WO 97/25428; 미국 특허 제5,763,223호 (1998년 6월 9일자로 허여됨); 미국 특허 제6,284,236호 (2001년 9월 4일자로 허여됨)]. 전장의 천연 서열 인간 Apo2L/TRAIL 폴리펩티드는 281개 아미노산 길이의 유형 II 막관통 단백질이다. 몇몇 세포는 상기 폴리펩티드의 세포외 영역을 효소적 절단시킴으로써, 이러한 폴리펩티드의 천연 가용성 형태를 생성시킬 수 있다 [참고: Mariani et al., *J. Cell. Biol.*, 137: 221-229 (1997)]. 가용성 형태의 Apo2L/TRAIL을 결정학적으로 연구한 결과, TNF 및 기타 관련 단백질의 구조와 유사한 동종-삼량체성 구조인 것으로 밝혀졌다 [참고: Hymowitz et al., *Mol. Cell.*, 4:563-571 (1999); Cha et al., *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya et al., *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz et al., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]. 그러나 Apo2L/TRAIL은 다른 TNF 계열 구성원들과는 달리, (동종-삼량체 내의 각 소단위체의 위치 230에서의) 3개 시스테인 잔기가 함께, 아연 원자와 배위 결합하고, 이러한 아연 결합이 삼량체 안정성과 생물학적 활성을 있어 중요하다는 점에서 독특한 구조적 특징을 지니고 있는 것으로 밝혀졌다 [참고: Hymowitz et al., 상기 참고; Bodmer et al., *J. Biol. Chem.*, 275: 20632-20637 (2000)].

[0038]

Apo2L/TRAIL은 자가면역 질환 (예: 류마티스성 관절염)을 포함한 면역계 조정에 있어 일정 역할을 할 수 있다는 사실이 다음 문헌에 보고되었다 [참고: 예를 들어, Thomas et al., *J. Immunol.*, 161:2195-2200(1998); Johnsen et al., *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith et al., *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song et al., *J. Exp. Med.*, 191: 1095-1103 (2000)].

[0039]

가용성 형태의 Apo2L/TRAIL는 각종 암 세포, 예를 들어 결장, 폐, 유방, 전립선, 방광, 신장, 난소 및 뇌 종양 뿐만 아니라 흑색종, 백혈병, 및 다발성 골수종에서 세포소멸을 유도시키는 것으로 또한 보고되었다 [참고: 예를 들어, Wiley et al., 상기 참고; Pitti et al., 상기 참고; 미국 특허 제6,030,945호 (2000년 2월 29일자로 허여됨); 미국 특허 제6,746,668호 (2004년 6월 8일자로 허여됨); Rieger et al., *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi et al., *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak et al., *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane et al., *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani et al., *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu et al., *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000);

Chinnaiyan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 1754-1759 (2000)]. 뮤린 종양 모델에서의 생체내 연구 결과는, Apo2L/TRAIL이 단독으로, 또는 화학요법 또는 방사선 요법과 병용해서 상당한 항종양 효과를 발휘할 수 있다는 것을 추가로 제시하고 있다 [참고: 예를 들어, Ashkenazi et al., 상기 참고; Walczak et al., 상기 참고; Gliniak et al., *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan et al., 상기 참고; Roth et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265: 1999 (1999); PCT 출원번호 US/00/15512; PCT 출원번호 US/01/23691]. 많은 유형의 암 세포와는 달리, 대부분의 정상 인간 세포 유형은 특정 재조합 형태의 Apo2L/TRAIL에 의한 세포 소멸 유도에 대해 저항성인 것으로 여겨진다 [참고: Ashkenazi et al., 상기 참고; Walczak et al., 상기 참고]. 다음 문헌에는 폴리히스티딘-태그화 가용성 형태의 Apo2L/TRAIL가, 분리된 정상 인간 (비-인간이 아님) 간세포에서 시험관내 세포소멸을 유도시켰다고 보고되었다 [참고: Jo et al., *Nature Med.*, 6: 564-567 (2000); Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)]. 특정의 재조합 Apo2L/TRAIL 제제는, 예를 들어 태그 분자의 존재 또는 부재, 아연 함량, 및 삼랑체 함량 %에 따라서 병든 세포 대 정상 세포에 대한 생화학적 특성 및 생물학적 활성을 측면에서 다양할 수 있는 것으로 여겨진다 [참고: Lawrence et al., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin et al., *Nature, Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)].

[0040]

Apo2L/TRAIL은 5개 이상의 상이한 수용체와 결합하는 것으로 밝혀졌다. Apo2L/TRAIL와 결합하는 수용체들 중의 2개 이상이 기능적 세포질성 사멸 도메인을 함유하고 있다. 이러한 수용체 중의 하나가 "DR4" (및 또 다른 한 편으론, TR4 또는 TRAIL-R1)로서 지칭되었다 [참고: Pan et al., *Science*, 276: 111-113 (1997); WO 98/32856 (1998년 7월 30일자로 공개됨); WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 12월 7일자로 공개됨); US 6,433,147 (2002년 8월 13일자로 허여됨); US 6,461,823 (2002년 10월 8일자로 허여됨), 및 US 6,342,383 (2002년 1월 29일자로 허여됨)].

[0041]

Apo2L/TRAIL에 대한 또 다른 수용체가 DR5로서 지칭되었다 (이는 또한, Apo-2; TRAIL-R 또는 TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 또는 KILLER로서 지칭되기도 하였다) [참고: 예를 들어, Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997), Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997), WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO 98/41629 (1998년 9월 24일자로 공개됨); Screaton et al., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak et al., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu et al., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); EP 870,827 (1998년 10월 14일자로 공개됨); WO 98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO 99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨); WO 99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨); US 2002/0072091 (2002년 8월 13일자로 공개됨); US 2002/0098550 (2001년 12월 7일자로 공개됨); US 6,313,269 (2001년 12월 6일자로 허여됨); US 2001/0010924 (2001년 8월 2일자로 공개됨); US 2003/01255540 (2003년 7월 3일자로 공개됨); US 2002/0160446 (2002년 10월 31일자로 공개됨); US 2002/0048785 (2002년 4월 25일자로 공개됨); US 6,342,369 (2002년 2월에 허여됨); US 6,569,642 (2003년 5월 27일자로 허여됨); US 6,072,047 (2000년 6월 6일자로 허여됨); US 6,642,358 (2003년 11월 4일자로 허여됨); US 6,743,625 (2004년 6월 1일자로 허여됨)]. DR4과 같이, DR5는 세포질성 사멸 도메인을 함유하고, 리간드 결합시 (또는 이러한 리간드의 활성을 모방하는 분자, 예를 들어 아고니스트 항체 결합시) 세포소멸을 신호 전달 할 수 있는 것으로 보고되었다. Apo-2L/TRAIL과 DR5 간에 형성된 복합체의 결정 구조가 문헌 [참고: Hymowitz et al., *Molecular Cell*, 4:563-571 (1999)]에 기재되어 있다.

[0042]

리간드 결합시, DR4와 DR5 둘 다는 FADD/Mort1로서 지칭되는 사멸-도메인-함유 적응인자 분자를 통하여, 세포소멸 개시인자인 카스파제-8을 동원 및 활성화시킴으로써 세포소멸을 독립적으로 촉발시킬 수 있다 [참고: Kischkel et al., *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick et al., *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer et al., *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)].

[0043]

Apo2L/TRAIL은 또한, 신호 전달의 변환기가 아닌 억제제로서 기능하는 것으로 여겨지는 DcR1, DcR2 및 OPG로서 지칭된 수용체와 결합하는 것으로 보고되었다 {예를 들어, DcR1 (TRID, LIT 또는 TRAIL-R3으로서 지칭되기도 함) [참고: Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane et al., *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider et al., *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti et al., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); 및 Mongkolsapaya et al., *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)]; DcR2 (TRUNDD 또는 TRAIL-R4로서 지칭되기도 함) [참고: Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan et al., *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti et al., *Immunity*, 7:813-820 (1997)], 및 OPC}. DR4 및 DR5와는 달리, DcR1 및 DcR2 수용체는 세포소멸을 신호 전달하지 않는다.

[0044]

DR4 및/또는 DR5 수용체와 결합하는 특정의 항체가 당해 분야의 문헌에 보고되었다. 예를 들어, DR4 수용체에

대해 유도되고 특정의 포유류 세포에서 작동성 또는 세포소멸 활성을 지닌 항-DR4 항체가 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: 예를 들어, WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 7월 12일자로 공개됨); WO 03/066661 (2003년 8월 14일자로 공개됨); Griffith et al., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai et al., *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); WO 02/097033 (2002년 12월 2일자로 공개됨); WO 03/042367 (2003년 5월 22일자로 공개됨); WO 03/038043 (2003년 5월 8일자로 공개됨); WO 03/037913 (2003년 5월 8일자로 공개됨)]. 특정의 항-DR5 항체 역시 다음 문헌에 기재되었다 [참고: 예를 들어, WO 98/51793 (1998년 11월 8일자로 공개됨); Griffith et al., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa et al., *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hylander et al., "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada; WO 03/038043 (2003년 5월 8일자로 공개됨); WO 03/037913 (2003년 5월 8일자로 공개됨)]. 또한, DR4 수용체와 DR5 수용체 둘 다와 교차 반응성을 나타내는 특정의 항체가 보고되었다 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제 6,252,050호 (2001년 6월 26일자로 협여됨)].

[0045] 발명의 요약

본 발명은 적어도 부분적으로, 모노클로날 항체, 특히 탈아미드화 및/또는 응집에 대해 감수성인 전장의 IgG1 항체를 제형화하는데 특히 유용한 완충제로서의 pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트를 확인하는 것에 관한 것이다. 이러한 제형은 그 내부에 함유된 항체 생성물의 분해를 지연시킨다.

따라서, 제1 국면에서 본 발명은 pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제 중에 모노클로날 항체를 포함하는 안정한 제약 제형에 관한 것이다. 모노클로날 항체는 바람직하게, HER2, CD20, DR5, BR3, IgE, 및 VEGF로 이루어진 군 중에서 선택된 항원과 결합한다.

또한, 본 발명은 상기 제형을 특정 질병 또는 장애를 치료하는데 유효한 양으로 특정 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 이러한 대상체에게서 특정 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

또 다른 국면에서, 본 발명은 (a) 탈아미드화 또는 응집에 대해 감수성인 전장의 IgG1 항체 약 10 mg/mL 내지 약 250 mg/mL; (b) pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제; (c) 트레할로스 및 수크로스로 이루어진 군 중에서 선택된 당류 약 60 mM 내지 약 250 mM; 및 (d) 폴리소르베이트 20 약 0.01% 내지 약 0.1%를 포함하는 제약 제형에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 치료적 모노클로날 항체를 pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제 중에서 제형화하는 것을 포함하여, 이러한 치료적 모노클로날 항체의 탈아미드화 또는 응집을 저하시키는 방법을 제공한다.

추가 국면에서, 본 발명은 pH 약 5.5 내지 약 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제, 당류 및 계면활성제 중에서, HER2의 도메인 II와 결합하는 항체를 포함하는 제약 제형에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 약 20 mg/mL 내지 약 40 mg/mL 양의 폐르투주마브, 히스티딘-아세테이트 완충제, 수크로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는 제약 제형 (이러한 제형의 pH는 약 5.5 내지 약 6.5이다)에 관한 것이다.

본 발명은 또한, pH 약 5.5 내지 약 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제; 당류; 및 계면활성제 중에 DR5 항체를 포함하는 제약 제형에 관한 것이다.

또 다른 국면에서, 본 발명은 약 10 mg/mL 내지 약 30 mg/mL 양의 아포마브 (Apomab), 히스티딘-아세테이트 완충제, 트레할로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는 제약 제형 (이러한 제형의 pH는 약 5.5 내지 약 6.5이다)에 관한 것이다.

또 다른 국면에서, 본 발명은 제약 제형을 암을 치료하는데 유효한 양으로 특정 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 이러한 대상체에게서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 주사기로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알, 또는 스테인레스강 탱크 내부에, 임의로 동결된 형태의 제형을 포함하는, 상기 바이알 또는 탱크에 관한 것이다.

더우기, 본 발명은 (a) 모노클로날 항체 제형을 제조하는 단계; 및 (b) 이러한 제형 중의 모노클로날 항체의 물리적 안정성, 화학적 안정성 또는 생물학적 활성을 평가하는 단계를 포함하여, 제약 제형을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

[0093] 용어 "제약 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 해줄 수 있는 형태로 존재하고, 해당 제형이 투여되는 대상체에 대해 허용 가능하지 않은 수준으로 독성인 부가의 성분을 전혀 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제형은 멸균 상태이다.

[0095] "멸균" 제형은 무균성이거나, 또는 살아있는 모든 미생물 및 그의 포자가 존재하지 않는다.

[0096] 본원에서 "동결된" 제형은 0°C 이하 온도에 있는 것이다. 일반적으로, 동결된 제형은 동결건조되지 않은 것일 뿐만 아니라 이전에 또는 이후에도 동결건조시키지 않은 것이다. 바람직하게는, 동결된 제형이 (스테인레스강 탱크 내에서의) 저장을 위해 동결된 약물, 또는 (최종 바이알 입체 배치 내에서의) 동결된 약물 생성물을 포함한다.

[0097] "안정한" 제형은 내부에 함유된 단백질이 본질적으로, 저장시 그의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 보유하고 있는 것이다. 바람직하게, 이러한 제형은 본질적으로, 저장시 그의 생물학적 활성 뿐만 아니라 그의 물리적 안정성과 화학적 안정성을 유지하고 있다. 저장 기간은 일반적으로, 의도한 제형의 저장 수명에 근거하여 선택한다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 각종 분석적 기술이 당해 분야에서 이용 가능하고, 이는 예를 들어, 다음 문헌에 고찰되어 있다 [참고: *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) 및 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993)]. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된 온도에서 측정할 수 있다. 바람직하게, 제형은 약 40°C 하에 약 2 내지 4주 이상 동안 안정하고/하거나, 약 5°C 및/또는 약 15°C 하에 3개월 이상 동안 안정하고/하거나, 약 -20°C 하에 3개월 이상 또는 1년 이상 동안 안정하다. 더우기, 제형은 이러한 제형을 동결 (예를 들어, -70°C로 동결시킴)과 해동 후, 예를 들어 동결과 해동을 1, 2 또는 3주기 수행한 후에도 안정한 것이 바람직하다. 안정성은 각종의 상이한 방식으로 정성적 및/또는 정량적으로 평가할 수 있는데, 이에는 응집체 형성 평가 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하고/하거나 혼탁도를 측정하고/하거나 가시적으로 검사한다); 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관대 전기영동을 이용한 전하 불균질성 평가; 아미노-말단 또는 카복시-말단 서열 분석; 질량 분광측정 분석; 환원된 항체와 본래 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 웨티드 지도 (예를 들어, 트립티 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합성 기능 평가 등이 포함된다. 불안정성은 다음 중의 한 가지 이상과 관련이 있을 수 있다: 응집, 탈아미드화 (예: Asn 탈아미드화), 산화 (예: Met 산화), 이성체화 (예: Asp 이성체화), 클립핑 (clipping)/가수분해/단편화 [예: 힌지 (hinge) 영역 단편화], 석신이미드 형성, 쌍을 이루지 않은 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 프로세싱, 글리코실화 차이 등.

[0098] 본원에서의 "탈아미드화" 모노클로날 항체는 그의 1개 이상의 아스파라긴 잔기를, 예를 들어 아스파르트산 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화시킨 것이다.

[0099] "탈아미드화에 대해 감수성"인 항체는 탈아미드화되기 쉬운 것으로 밝혀진 1개 이상의 잔기를 포함하는 것이다.

[0100] "응집에 대해 감수성"인 항체는 특히 동결 및/또는 진탕시 기타 항체 분자(들)와 함께 응집하는 것으로 밝혀진 것이다.

[0101] "단편화에 대해 감수성"인 항체는, 예를 들어 그의 힌지 영역에서 2개 이상의 단편으로 절단되는 것으로 밝혀진 것이다.

[0102] "탈아미드화, 응집 또는 단편화를 저하시킨다"는 것은 상이한 pH 또는 상이한 완충제에서 제형화된 모노클로날 항체와 비교해서 탈아미드화, 응집 또는 단편화를 방지하거나 탈아미드화, 응집 또는 단편화되는 양을 감소시키는 것이다.

[0103] 본원에서, 모노클로날 항체의 "생물학적 활성"은 항원과 결합하여, 시험관내 또는 생체 내에서 측정할 수 있는 측정 가능한 생물학적 반응을 생성시킬 수 있는 항체의 능력을 지칭한다. 이러한 활성은 길항성 (예를 들어, 항체가 HER2 항체인 경우) 또는 작동성 (예를 들어, 항체가 DR5와 결합하는 경우)일 수 있다. 페르투주마브인 경우의 한 양태에서는, 생물학적 활성이 인간 유방암 세포주 MDA-MB-175-VII의 증식을 억제시킬 수 있는 제형화된 항체의 능력을 지칭한다. 항체가 아포마브인 경우, 생물학적 활성은, 예를 들어 결장 암종 세포 Colo205를 사멸시킬 수 있는 제형화된 항체의 능력을 지칭할 수 있다.

- [0104] "등장성"이란, 관심있는 제형이 인체 혈액과 본질적으로 동일한 삼투압을 지닌 것을 의미한다. 등장성 제형은 일반적으로, 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 지닐 것이다. 등장성은, 예를 들어 증기압 또는 열음-동결 유형 삼투압 측정기를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 바와 같은 "완충제"는 그의 산-염기 공액 성분들의 작용에 의한 pH 상의 변화를 견디는 완충 용액을 지칭한다. 본 발명의 완충제는 바람직하게 약 5.0 내지 약 7.0, 바람직하게 약 5.5 내지 약 6.5, 예를 들어 약 5.8 내지 약 6.2 범위의 pH를 갖고, 가장 바람직하게는 pH 약 6.0을 갖는다. 이러한 범위 내의 pH를 제어할 완충제의 예에는 아세테이트, 숙시네이트, 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트, 글리실글리신 및 기타 유기 산 완충제가 포함된다. 본원에서 바람직한 완충제는 히스티딘 완충제이다.
- [0106] "히스티딘 완충제"는 히스티딘 이온을 포함하는 완충제이다. 히스티딘 완충제의 예에는 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트, 히스티딘 설페이트가 포함된다. 본원 실시예에서 확인된 바람직한 히스티딘 완충제는 히스티딘 아세테이트인 것으로 밝혀졌다. 바람직한 양태에서, 히스티딘 아세테이트 완충제는 L-히스티딘 (자유 염기, 고체)을 아세트산 (액체)으로 적정함으로써 제조한다. 바람직하게, 히스티딘 완충제 또는 히스티딘-아세테이트 완충제는 pH 5.5 내지 6.5, 바람직하게 pH 5.8 내지 6.2이다.
- [0107] 본원에서의 "당류"는 일반적인 조성 (CH_2O_n) 및 그의 유도체를 포함하는데, 이에는 단당류, 이당류, 삼당류, 다당류, 당 알코올, 환원 당, 비환원 당 등이 포함된다. 본원에서의 당류의 예에는 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 락토스, 프럭토스, 말토스, 텍스트란, 글리세린, 텍스트란, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 실리톨, 소르비톨, 만니톨, 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트리오스, 스타키오스, 말토스, 락툴로스, 말툴로스, 글루시톨, 말티톨, 락티톨, 이소-말툴로스 등이 포함된다. 본원에서 바람직한 당류는 비환원 이당류, 예를 들어 트레할로스 또는 수크로스이다.
- [0108] 본원에서, "계면활성제"는 표면 활성제, 바람직하게는 비이온성 계면활성제를 지칭한다. 본원에서의 계면활성제의 예에는 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80); 폴옥사머 (예: 폴옥사머 188); 트리톤; 나트륨 도데실 설페이트 (SDS); 나트륨 라우릴 설페이트; 나트륨 옥틸 글리코시드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코크아미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-베타인 (예: 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 나트륨 메틸 코코일-, 또는 이나트륨 메틸 올레일-타우레이트; 및 MONAQUAT™ 시리즈 (공급처: Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 및 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체 [예: 플루로닉스 (Pluronics), PF68 등] 등이 포함된다. 본원에서 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다.
- [0109] "HER 수용체"는 HER 수용체 계열에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이고, 이에는 EGFR, HER2, HER3 및 HER4 수용체와, 미래에 확인될 상기 계열의 기타 구성원들이 포함된다. HER 수용체는 일반적으로, HER 리간드와 결합할 수 있는 세포외 도메인; 친지성 막관통 도메인; 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 몇 가지 티로신 잔기를 정착시킨 카복실-말단 신호 전달 도메인을 포함할 것이다. 바람직하게는, HER 수용체가 천연 서열 인간 HER 수용체이다.
- [0110] HER의 세포외 도메인은 다음 4개의 도메인을 포함한다: 도메인 I (아미노산 잔기 약 1 내지 195), 도메인 II (아미노산 잔기 약 196 내지 320), 도메인 III (아미노산 잔기 약 321 내지 488), 및 도메인 IV (아미노산 잔기 약 489 내지 632) (신호 웨პ티드를 포함하지 않은 잔기 넘버링) [참고: Garrett et al. *Mol. Cell.* 11:495-505 (2003), Cho et al. *Nature* 421:756-760 (2003), Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004), or Plowman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993)]. 또한, 본원의 도 1 참고.
- [0111] 용어 "ErbB1", "HER1", "표피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 이는 예를 들어, 문헌 [참고: Carpenter et al., *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987)]에 기재된 바와 같은 EGFR을 지칭하는데, 이에는 그의 천연 발생적 돌연변이체 형태, 예를 들어 문헌 [참고: Humphrey et al., *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)]에서와 같은 결실 돌연변이체 EGFR이 포함된다. erbB1은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 지칭한다.
- [0112] 표현 "ErbB2" 및 "HER2"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 이는 예를 들어, 문헌 [참고: Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) 및 Yamamoto et al., *Nature* 319:230-234 (1986)]에 기재된 인간 HER2 단백질을 지칭한다 (유전자은행 승인 번호 X03363). 용어 "erbB2"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 지칭하고,

"neu"는 랫트 p185^{neu}를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 바람직한 HER2는 천연 서열 인간 HER2이다.

[0113] "ErbB3" 및 "HER3"은, 예를 들어 문헌 [참고: 미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호; Kraus et al., *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)]에 기재된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 지칭한다.

[0114] 본원에서의 용어 "ErbB4" 및 "HER4"는, 예를 들어 문헌 [참고: EP 특허 출원 제599,274호; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); 및 Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)]에 기재된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 지칭하는데, 이에는 예를 들어, WO 99/19488 (1999년 4월 22일자로 공개됨)에 기재된 바와 같은 그의 이소형이 포함된다.

[0115] "HER 리간드"란 HER 수용체와 결합하고/하거나 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 의미한다. 본원에서 특히 관심 있는 HER 리간드는 천연 서열 인간 HER 리간드, 예를 들어 표피 성장 인자 (EGF) [참고: Savage et al., *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)]; 형질전환 성장 인자 알파 (TGF-α) [참고: Marquardt et al., *Science* 223:1079-1082 (1984)]; 신경초종 (schwanoma) 또는 각질세포 자가분비 성장 인자로서 공지되기도 한 암페레글린 [참고: Shoyab et al., *Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura et al., *Nature* 348:257-260 (1990); 및 Cook et al., *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)]; 베타셀룰린 [참고: Shing et al., *Science* 259:1604-1607 (1993); 및 Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)]; 혜파린-결합성 표피 성장 인자 (HB-EGF) [참고: Higashiyama et al., *Science* 251:936-939 (1991)]; 에페레글린 [참고: Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); 및 Komurasaki et al., *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)]; 혜레글린 (하기 참고); 뉴레글린-2 (NRG-2) [참고: Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997)]; 뉴레글린-3 (NRG-3) [참고: Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)]; 뉴레글린-4 (NRG-4) [참고: Harari et al., *Oncogene* 18:2681-89 (1999)] 또는 크립토 (cripto) (CR-1) [참고: Kannan et al., *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)]이다. EGFR과 결합하는 HER 리간드에는 EGF, TGF-α, 암페레글린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에페레글린이 포함된다. HER3과 결합하는 HER 리간드에는 혜레글린이 포함된다. HER4와 결합할 수 있는 HER 리간드에는 베타셀룰린, 에페레글린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 및 혜레글린이 포함된다.

[0116] 본원에서 사용된 경우의 "혜레글린" (HRG)은 문헌 [참고: 미국 특허 제5,641,869호 또는 Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]에 기재된 바와 같은 혜레글린 유전자 생물체에 의해 코딩된 폴리펩티드를 지칭한다. 혜레글린의 예에는 혜레글린-α, 혜레글린-β1, 혜레글린-β2 및 혜레글린-β3 [참고: Holmes et al., *Science* 256:1205-1210 (1992); 및 미국 특허 제5,641,869호]; neu 분화 인자 (NDF) [참고: Peles et al., *Cell* 69:205-216 (1992)]; 아세틸콜린 수용체-유도 활성 (ARIA) [참고: Falls et al., *Cell* 72:801-815 (1993)]; 신경교 성장 인자 (GGF) [참고: Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]; 감각 및 운동 신경원 유래 인자 (SMDF) [참고: Ho et al., *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)]; γ-혜레글린 [참고: Schaefer et al., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]이 포함된다. 상기 용어에는 천연 서열 HRG 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편 및/또는 아미노산 서열 변이체, 예를 들어 그의 EGF-유사 도메인 단편 (예: HRGβ1₁₇₇₋₂₄₄)이 포함된다.

[0117] 본원에서의 "HER 이량체"는 2개 이상의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유적으로 연합된 이량체이다. 이러한 복합체는 2개 이상의 HER 수용체를 발현하는 세포가 HER 리간드에 노출되는 경우에 형성될 수 있고, 예를 들어 문헌 [참고: Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]에 기재된 바와 같이 면역침전에 의해 분리할 수 있고 SDS-PAGE에 의해 분석할 수 있다. 이러한 HER 이량체의 예에는 EGFR-HER2, HER2-HER3 및 HER3-HER4 이종-이량체가 포함된다. 더우기, HER 이량체는 상이한 HER 수용체, 예를 들어 HER3, HER4 또는 EGFR과 결합된 2개 이상의 HER2 수용체를 포함할 수 있다. 기타 단백질, 예를 들어 사이토킨 수용체 소단위체 (예: gp130)가 상기 이량체와 연합될 수 있다.

[0118] HER2 상의 "이종-이량체성 결합 부위"는 그와의 이량체 형성시 EGFR, HER3 또는 HER4의 세포외 도메인 내의 영역과 접촉하거나 또는 이를 방해하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역을 지칭한다. 이 영역은 HER2의 도메인 II에서 발견된다 [참고: Franklin et al., *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].

[0119] "HER 활성화" 또는 "HER2 활성화"는 하나 이상의 HER 수용체 또는 HER2 수용체의 활성화, 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, HER 활성화로 인해, 신호 변환이 발생한다 (예를 들어, HER 수용체 또는 기질 폴리펩티드 내의 HER 수용체 인산화성 티로신 잔기의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발된다). HER 활성화는 관심있는 HER 수용체를 포함하는 HER 이량체에 대한 HER 리간드 결합에 의해 매개될 수 있다. HER 이량체에 대한 HER 리간드 결합이 이량체 중의 하나 이상의 HER 수용체의 키나제 도메인을 활성화시킴으로써, 하나 이상의 HER 수용체들 중의 티로신 잔기를 인산화시키고/시키거나 부가의 기질 폴리펩티드(들), 예를 들어 Akt 또는 MAPK 세포내 키나

제 중의 티로신 잔기를 인산화시킬 수 있다.

[0120] 본원에서의 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로는 전장의 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 전장의 항체로부터 형성된 다중-특이적 항체 (예: 이중-특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편이 포함된다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가, 모노클로날 항체 생성시 발생할 수도 있는 가능한 변이체 (이러한 변이체는 일반적으로 미량으로 존재한다)를 제외하고는 동일하고/하거나 동일한 에피토프와 결합하는 집단으로부터 수득한 항체를 지칭한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 모노클로날 항체는 그의 특이성이외에도, 기타 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 형질을 지시하고, 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 추론되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 문헌 [참고: Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있거나 또는 재조합 DNA 방법 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]에 의해 만들 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어 문헌 [참고: Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파아지 (phage) 항체 라이브러리로부터 분리할 수 있다.

[0122] 본원에서의 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다 [참고: 미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)]. 본원에서 관심있는 키메라 항체에는 비-인간 영장류 [예: 구세계 원숭이, 유인원 등]로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합성 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 포함된다.

[0123] "항체 단편"은 바람직하게 그의 항원 결합성 또는 가변 영역을 포함하는, 전장의 항체 일부를 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아보디 (diabody); 선형 항체; 단일 쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중-특이적 항체가 포함된다.

[0124] "전장의 항체"는 항원-결합성 가변 영역 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (C_L)과 중쇄 불변 도메인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예: 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게, 전장의 항체는 한 가지 이상의 효과기 기능을 지닌다.

[0125] 본원에서의 용어 "주요 종 항체"는 조성물 중에 정량적으로 우세한 항체 분자인, 이러한 조성물 내의 항체 구조를 지칭한다. 한 양태에서는, 주요 종 항체가 HER2 항체, 예를 들어 HER2의 도메인 II와 결합하는 항체, 트라스투주마브보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제시키는 항체, 및/또는 HER2의 이중-이량체성 결합 부위와 결합하는 항체이다. 본원에서 주요 종 HER2 항체의 바람직한 양태는 서열 3 및 4 중의 가변 경쇄 아미노산 서열과 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는, 서열 15 및 16 (페르투주마브) 중의 가변 경쇄 아미노산 서열과 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것이다.

[0126] 본원에서 "아미노산 서열 변이체" 항체는 주요 종 항체와 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 주요 종 항체와의 상동률이 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 주요 종 항체의 아미노산 서열 내에 또는 이러한 서열에 인접한 특정 위치에서의 치환, 결실 및/또는 부가를 지니고 있다. 본원에서의 아미노산 서열 변이체의 예에는 산성 변이체 (예: 탈아미드화 항체 변이체), 염기성 변이체, 그의 1개 또는 2개 경쇄 상에 아미노-말단 리더 (leader) 연장물 (예: VHS-)을 수반한 항체, 그의 1개 또는 2개 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 수반한 항체 등이 포함되고, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열 변이의 조합물이 포함된다. 본원에서 특히 관심있는 항체 변이체는 주요 종 항체와 비교해서 기타 아미노산 서열 및/또는 글리코실화 차이를 임의로 추가로 포함하는, 그의 1개 또는 2개 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장물을 포함하는 항체이다.

[0127] "치료적 모노클로날 항체"는 인간 대상체를 치료하는데 사용되는 항체이다. 본원에 기재된 치료적 모노클로날 항체에는 다음이 포함된다: 암 및 각종 비-악성 질환 또는 장애 치료를 위한 HER2 항체; B 세포 악성 종양, 자가면역 질환, 이식편 거부, 또는 외래 항원에 대한 면역 반응 차단을 치료하기 위한 CD20 또는 BR3 항체; IgE-

매개된 장애를 치료하기 위한 IgE 항체; 암 요법을 위한 DR5 또는 VEGF 항체.

- [0128] 본원에서의 "글리코실화 변이체" 항체는 주요 종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 부분과는 상이한 하나 이상의 탄수화물 부분이 부착된 항체이다. 본원에서의 글리코실화 변이체의 예에는 그의 Fc 영역에 부착된, G0 올리고당류 구조 대신 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 지닌 항체, 그의 1개 또는 2개의 경쇄에 부착된 1개 또는 2개의 탄수화물 부분을 갖는 항체, 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 전혀 없는 항체, 및 글리코실화 변경들의 조합물이 포함된다.
- [0129] 항체가 Fc 영역을 갖는 경우, 본원에서의 도 16에 도시된 바와 같은 올리고당류 구조가, 예를 들어 잔기 299 (298, 잔기의 Eu 넘버링에 따름)에서 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착될 수 있다. 페르투주마브의 경우에는, G0가 우세한 올리고당류 구조였고, 기타 올리고당류 구조, 예를 들어 G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 및 G2는 페르투주마브 조성을 내에 보다 적은 양으로 존재한다.
- [0130] 달리 언급되지 않는 한, 본원에서의 "G1 올리고당류 구조"에는 G-1, G1-1, G1(1-6) 및 G1(1-3) 구조가 포함된다.
- [0131] 본원에서 "아미노-말단 리더 연장물"은 항체의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에 존재하는 아미노-말단 리더 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 예시되는 아미노-말단 리더 연장물은 항체 변이체의 하나의 경쇄 또는 둘 다의 경쇄 상에 존재하는 3개 아미노산 잔기 VHS를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0132] "상동률"은 서열들을 정렬하고, 최대 상동률을 달성하기 위해 필요에 따라 캡을 도입한 후에 동일한 아미노산 서열 변이체 내의 잔기 비율로서 규정된다. 정렬 방법 및 정렬시키기 위한 컴퓨터 프로그램은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램 중의 하나가 "얼라인 (Align) 2"인데, 이는 제넨테크, 인코포레이티드 (Genentech, Inc.)가 1991년 12월 10일자로 미국 저작권국 (the United States Copyright Office, Washington, DC 20559)에 사용자 문서로 출원하였다.
- [0133] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예에는 Clq 결합성; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합성; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예: B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 포함된다.
- [0134] 전장의 항체 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 이러한 항체는 상이한 "부류"로 지정될 수 있다. 전장의 항체에는 5 가지 주요 부류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM가 있는데, 이들 중의 몇 개는 "아부류" (이 소형)으로 추가 분할될 수 있다: 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불리운다. 상이한 부류의 면역글로불린의 소단위체 구조와 3차원적 입체 배치는 널리 공지되어 있다.
- [0135] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예: 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 다음, 연속해서 이러한 표적 세포의 용해를 유발시키는 세포-매개성 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는데 있어 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RII 만을 발현하는 반면, 단구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [참고: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예를 들어 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 효과기 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 또 다른 한편 또는 부가적으로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [참고: Clynes et al., *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.
- [0136] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcRs를 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 상기 세포가 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단구, 세포독성 T 및 호중구가 포함되는데, PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다. 이러한 효과기 세포는 그의 천연 공급원, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMCs로부터 분리할 수 있다.
- [0137] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역과 결합하는 수용체를 기재하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 것이고 (감마 수용체), 이에는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 아부류의 수용체가 포함되는데, 이에는 이들 수용체의 대립 유전자성 변이체 및 교대로 스

플라이싱된 형태가 포함된다. Fc γ RII 수용체에는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제성 수용체")가 포함되는데, 이는 그의 세포질성 도메인에 있어서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질성 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제성 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질성 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 [참고: M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997)]. FcRs는 다음 문헌에 고찰되었다 [참고: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994); 및 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995)]. 기타 FcRs는 앞으로 확인될 것을 포함하여, 본원에서의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어에는 또한, 모계 IgGs를 태아에게 전이시키는데 책임이 있는 신생아 수용체 FcRn이 포함된다 [참고: Guyer et al., *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) 및 Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)].

[0138]

"보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적을 용해시킬 수 있는 특정 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을, 동족 항원과 복합체를 형성한 분자 (예: 항체)와 결합시킴으로써 개시시킨다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [참고: Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0139]

"천연 항체"는 통상적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종-사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설파이드 경쇄 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄들 간에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한, 규칙적으로 이격된 쇄내 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_H)에 이어 수 많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0140]

용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간의 서열에 있어 광범위하게 상이하고, 이러한 부분은 특정한 각 항체가 그의 특정한 항원에 대한 특이성과 결합을 위해 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 균등한 수준으로 분포되지는 않는다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역으로 불리우는 3 가지 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분이 골격 영역 (FRs)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FRs를 포함하는데, 이는 β -시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에는 이러한 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 β -시트 입체 배치를 상당 부분 채택하고 있다. 각 쇄 내의 초가변 영역은 상기 FRs에 의해 아주 근접하게 함께 결합되어 있고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역은 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 각종의 효과기 기능, 예를 들어 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체 참여를 나타낸다.

[0141]

본원에 사용된 경우의 용어 "초가변 영역"은 항원 결합에 책임이 있는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 [예를 들면, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3); 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); 참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 [예를 들면, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3); 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 참고: Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)]를 포함한다. "골격 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 규정된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0142]

항체를 파파인 분해시키면, "Fab" 단편으로 불리우는 2개의 동일한 항원 결합성 단편 (각각은 단일 항원 결합 부위를 갖는다)과 잔류성 "Fc" 단편 (이의 명칭은 용이하게 결정화될 수 있는 그의 능력을 반영한다)이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 항원과 여전히 가교 결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.

[0143]

"Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변

도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단하게 비공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다. 이러한 입체 배치에서는, 각 가변 도메인의 3개 초가변 영역이 V_H - V_L 이량체 표면 상에 항원 결합 부위를 명백히 규정하도록 상호 작용한다. 집합적으로, 6개 초가변 영역이 항체에 항원 결합 특이성을 부여해 준다. 그러나, 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화도이긴 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 특정 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 지니고 있다.

[0144] Fab 단편은 또한, 경쇄의 불변 도메인과, 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH_1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 헌지 영역으로부터의 1개 이상 시스테인을 포함한 중쇄 CH_1 도메인의 카복시 말단에 수 개의 잔기가 부가된다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab' -SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 1개 이상의 자유 티올기를 보유하고 있는, Fab' 에 대한 본원의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래에는, 그들 사이에 헌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링물이 또한 공지되어 있다.

[0145] 모든 척추동물 종으로부터의 항체의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 2 가지 명백한 별개 유형 [카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭됨] 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0146] "단일 쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. 바람직하게, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 해 주는, V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv 고찰을 위해, 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]. HER2 항체 scFv 단편이 WO93/16185; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다.

[0147] 용어 "디아보디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭하는데, 이들 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 가변 경쇄 도메인 (V_L)과 연결된 가변 중쇄 도메인 (V_H)을 포함한다 ($V_H - V_L$). 동일한 쇄 상에서 두 도메인 간에 쌍을 형성시키기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 이들 도메인을 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성시킴으로써, 2개의 항원-결합 부위를 창출시킨다. 디아보디는, 예를 들어 다음 문헌에 보다 상세히 기재되었다 [참고: EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)].

[0148] "인간화" 형태의 비-인간 (예: 설치류) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키 메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 골격 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더우기, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정련시키기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FRs는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로, 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 내역에 대해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)].

[0149] 인간화 HER2 항체에는 미국 특허 제5,821,337호 (본원에 참고로 삽입된다)의 표 3에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 또는 트拉斯투주마브 (HERCEPTIN®)

); 인간화 520C9 [참고: WO 93/21319] 및 본원에 기재된 바와 같은 인간화 2C4 항체가 포함된다.

[0150] 본원의 목적상, "트拉斯투주마브", "HERCEPTIN®"

" 및 "huMAb4D5-8"은 서열 13 및 14 중의 경쇄 아미노산 서열과 중쇄 아미노산 서열을 각각 포함하는 항체를 지칭한다.

[0151] 본원에서, "페르투주마브", "rhuMAb 2C4" 및 "OMNITARG™"은 서열 3 및 4 중의 가변 경쇄 아미노산 서열과 가변 중쇄 아미노산 서열을 각각 포함하는 항체를 지칭한다. 페르투주마브가 전장의 항체인 경우, 이는 서열 15 및

16 중의 경쇄 아미노산 서열과 중쇄 아미노산 서열을 각각 포함하는 것이 바람직하다.

[0152] "있는 그대로의 (노출된) 항체"는 이종 분자, 예를 들어 세포독성 부분 또는 방사성표지와 접합되지 않은 항체(본원에 정의된 바와 같음)이다.

[0153] "친화성 성숙된" 항체는 변경(들)을 나타내지 않는 모 항체와 비교해서 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시켜 주는, 하나 이상의 초가변 영역에서의 한 가지 이상 변경을 나타내는 항체이다. 바람직한 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 지닐 것이다. 친화성 성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌 [참고: Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화성 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Scier et al., *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)].

[0154] "아고니스트 항체"는 수용체와 결합하여 이를 활성화시키는 항체이다. 일반적으로, 아고니스트 항체의 수용체 활성화 능력은 이러한 수용체의 천연 아고니스트 리간드와 적어도 정성적으로 유사할 것이고 정량적으로도 거의 유사할 수 있다. 아고니스트 항체의 예는 TNF 수용체 초분자군 내의 수용체, 예를 들어 DR5와 결합하고, TNF 수용체 (예: DR5)를 발현하는 세포의 세포소멸을 유도시키는 것이다. 세포소멸 유도를 결정하기 위한 검정이 WO98/51793 및 WO99/37684 (이들 둘 다는 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0155] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 특정 구성분으로 확인되어, 이러한 환경으로부터 격리 및/또는 회수시킨 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단적 또는 치료적 용도를 방해할 수도 있는 물질인데, 이에는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질이 포함될 수 있다. 항체를 (1) 로리 (Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로 정제시키거나, (2) 스피닝 컵 시퀸레이터 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제시키거나, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색 (silver stain)을 사용하여 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하도록 정제할 것이다. 분리된 항체에는 재조합 세포 내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 분리된 항체는 한 가지 이상의 정제 단계에 의해 제조할 것이다.

[0156] "트라스투주마브보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제시키는" HER2 항체는 트라스투주마브보다 더 효과적으로 (예를 들어, 약 2배 이상 더 효과적으로) HER 이량체를 저하 또는 제거시키는 것이다. 바람직하게는, 이러한 항체가 뮤린 모노클로날 항체 2C4, 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 Fab 단편, 페르투주마브, 및 페르투주마브의 Fab 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 항체와 적어도 대략 동일한 정도로 효과적으로 HER2 이량체화를 억제시킨다. HER 이량체를 직접적으로 연구함으로써, 또는 HER 활성화 또는 하단 신호 전달 (이는 HER 이량체화로부터 비롯된다)를 평가함으로써 및/또는 항체-HER2 결합 부위 등을 평가함으로써, HER 이량체화 억제를 평가할 수 있다. 트라스투주마브보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제시킬 수 있는 능력을 지닌 항체를 스크리닝하기 위한 검정이 문헌 [참고: Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002) 및 WO 01/00245 (Adams et al.)]에 기재되어 있다. 단지 예로써, 예를 들어 HER 이량체 형성의 억제를 평가하고 [참고: 예를 들어, Fig 1A-B of Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002); 및 WO 01/00245]; HER 이량체를 발현하는 세포의 HER 리간드 활성화 저하를 평가하며 [참고: 예를 들어, WO 01/00245 및 Fig. 2A-B of Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]; HER 이량체를 발현하는 세포에 대한 HER 리간드 결합의 차단을 평가하고 [참고: 예를 들어, WO 01/00245, 및 Fig. 2E of Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]; HER 리간드의 존재 (또는 부재) 하에 HER 이량체를 발현하는 암 세포 (예: MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D 세포)의 세포 성장 억제를 평가하며 [참고: 예를 들어, WO 01/00245 및 Figs. 3A-D of Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]; 하단 신호 전달의 억제 (예를 들어, HRG-의존성 AKT 인산화의 억제 또는 HRG- 또는 TGF α -의존성 MAPK 인산화의 억제)를 평가함으로써 [참고: 예를 들어, WO 01/00245, 및 Fig. 2C-D of Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)], HER 이량체화의 억제에 관해 검정할 수 있다. 또한, 항체-HER2 결합 부위를 연구함으로써, 예를 들어 HER2와 결합된 항체의 구조 또는 모델, 예를 들면 결정 구조를 평가함으로써 항체가 HER 이량체화를 억제하는지의 여부를 평가할 수 있다 [참고: 예를 들어, Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].

[0157] HER2 항체는 트라스투주마브보다 더 효과적으로 (예를 들어, 2배 이상 더 효과적으로) "HRG-의존성 AKT 인산화를 억제"시키고/시키거나 "HRG- 또는 TGF α -의존성 MAPK 인산화를 억제"시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002) 및 WO 01/00245].

- [0158] HER2 항체는 "HER2 외부영역 (ectodomain) 절단을 억제하지 않는" 것일 수도 있다 [참고: Molina et al. *Cancer Res.* 61:4744-4749 (2001)].
- [0159] HER2의 "이종-이량체성 결합 부위와 결합"하는 HER2 항체는 도메인 II 내의 잔기와 결합하고 (임의로는, HER2 세포와 도메인의 기타 도메인, 예를 들어 도메인 I 및 III 내의 잔기와 결합하기도 한다), 적어도 어느 정도는 HER2-EGFR, HER2-HER3, 또는 HER2-HER4 이종-이량체의 형성을 입체적으로 장애시킬 수 있다. 문헌 [참고: Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]에서는 RCSB 단백질 데이터 은행 (ID 코드 IS78)에 기탁된 HER2-페르투주마브 결정 구조를 성상 확인하였는데, 이는 HER2의 이종-이량체성 결합 부위와 결합하는 항체의 예를 나타낸 것이다.
- [0160] HER2의 "도메인 II와 결합"하는 항체는 도메인 II 내의 잔기와, 임의로는 HER2의 기타 도메인들, 예를 들어 도메인 I 및 III 내의 잔기와 결합한다. 바람직하게는, 도메인 II와 결합하는 항체가 HER2의 도메인 I, II 및 III 간의 연접부에 결합한다.
- [0161] 본원에 사용된 경우의 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체 내에서 세포, 특히 HER 발현성 암 세포의 성장을 억제시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S 상에서 HER-발현성 세포 비율을 상당히 저하시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예에는 (S 상 이외의 위치에서) 세포 주기 진행을 차단시키는 작용제, 예를 들어 G1 정지와 M-상 정지를 유도시키는 작용제가 포함된다. 전통적인 M-상 차단제에는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 포함된다. G1을 정지시키는 작용제가 또한 S-상 정지로까지 영향을 미치는데, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들면, 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C가 있다. 추가의 정보는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13].
- [0162] "성장 억제성" 항체의 예는 HER2와 결합하고, HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제시켜 주는 것이다. 바람직한 성장 억제성 HER2 항체는 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도에서, 세포 배양 중인 SK-BR-3 유방 종양 세포의 성장을 20% 초과, 바람직하게는 50% 초과 (예를 들어, 약 50% 내지 약 100%) 억제시키는데, 이러한 성장 억제는 SK-BR-3 세포를 항체에 노출시킨지 6일 후에 결정한다 [참고: 미국 특허 제5,677,171호 (1997년 10월 14 일자로 허여됨)]. SK-BR-3 세포 성장 억제 검정은 상기 특허 및 다음에 보다 상세히 기재되어 있다. 바람직한 성장 억제성 항체는 뮤린 모노클로날 항체 4D5의 인간화 변이체, 예를 들어 트拉斯투주마브이다.
- [0163] "세포소멸을 유도시키는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 내형질 세망의 확장, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (세포소멸체로 불리움)의 형성에 의해 결정된 바와 같이, 프로그램된 세포 사멸을 유도시키는 것이다. 세포는 통상적으로, 항체가 결합하는 항원을 발현하는 것이다. 바람직하게는, 세포가 종양 세포이다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고; DNA 단편화는 DNA 래더링을 통하여 평가할 수 있으며; DNA 단편화에 따른 핵/크로마틴 축합은 저이배체 세포 상의 모든 증가에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게, 세포소멸을 유도시키는 항체는 이러한 항체와 결합하는 항원을 발현하는 세포를 사용하여 아넥신 결합 검정에서 처리시키지 않은 세포와 비교해서 아넥신 결합 유도를 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 증가시켜 주는 항체이다. 세포소멸을 유도시키는 항체의 예는 HER2 항체 7C2 및 7F3, 및 특정의 DR5 항체이다.
- [0164] "에피토프 2C4"는 항체 2C4와 결합하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프와 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상적인 교차-차단성 검정, 예를 들어 문헌 [참고: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 또 다른 한편, 에피토프 지도화를 수행하여, 항체가 HER2의 2C4 에피토프와 결합하는지를 평가할 수 있다. 에피토프 2C4는 HER2의 세포외 도메인 내의 도메인 II로부터의 잔기를 포함한다. 2C4 및 페르투주마브는 도메인 I, II 및 III의 연접부에서 HER2의 세포외 도메인과 결합한다 [참고: Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].
- [0165] "에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463) 및 트拉斯투주마브와 결합하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이러한 에피토프는 HER2의 막관통 도메인에 근접해 있고, HER2의 도메인 IV 내에 있다. 4D5 에피토프와 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상적인 교차-차단성 검정, 예를 들어 문헌 [참고: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수

행할 수 있다. 또 다른 한편, 에피토프 지도화를 수행하여, 항체가 HER2의 4D5 에피토프 (예를 들어, HER2의 잔기 약 529로부터 잔기 약 625 까지의 영역 내의 1개 이상의 잔기)와 결합하는지를 평가할 수 있다.

[0166] "에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및/또는 7F3 항체 (각각 ATCC에 기탁되었다: 하기 참고)와 결합하는 HER2의 세포외 도메인의 도메인 I 내의 아미노 말단 하의 영역이다. 7C2/7F3 에피토프와 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상적인 교차-차단성 검정, 예를 들어 문헌 [참고: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 또 다른 한편, 에피토프 지도화를 수행하여, 항체가 HER2 상의 7C2/7F3 에피토프 (예를 들어, HER2의 잔기 약 22로부터 잔기 약 53 까지의 영역 내의 1개 이상의 잔기)와 결합하는지를 확립할 수 있다.

[0167] "치료 (처치)"는 치료적 처치와 예방적 조치 둘 다를 지칭한다. 치료가 필요한 대상체에는 이미 질병이 있는 대상체 뿐만 아니라 질병을 예방하고자 하는 대상체가 포함된다. 따라서, 본원에서 치료하고자 하는 환자는 해당 질병에 걸린 것으로 진단될 수 있거나 또는 이러한 질병에 걸릴 것으로 예측되거나 걸리기 쉬울 수 있다.

[0168] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유류에게서의 생리적 질환을 지칭하거나 기재한다. 암의 예에는 암종, 림프종, 모세포종 (수모세포종 및 망막모세포종 포함), 육종 (지방육종 및 활막 세포 육종 포함), 신경내분비 종양 [카르시노이드 종양, 가스트린종 (*gastrinoma*) 및 썸세포 암 포함], 중피종, 신경집종 (청신경초종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프계 악성 종양이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평 세포 암 (예: 상피 편평 세포 암), 폐암, 예를 들어 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포암, 위암, 예를 들어 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담관 종양 뿐만 아니라 두경부암이 포함된다.

[0169] 용어 "유효량"은 특정 환자에게서의 특정 질병에 유효한 약물의 양을 지칭한다. 질병이 암인 경우, 이러한 약물의 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 성장을 어느 정도 억제시키고/시키거나; 암과 연관된 한 가지 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 방지시키고/시키거나 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도까지는 이러한 약물이 세포증식 억제성 및/또는 세포 독성일 수 있다. 유효량은 질병 진행이 없는 생존 기간을 연장시킬 수 있고, 객관적 반응 (부분 반응, PR, 또는 완전한 반응, CR 포함)을 가져다 주며, 전반적인 생존 기간을 증가시키고/시키거나 암의 한 가지 이상 증상을 개선시킬 수 있다.

[0170] "HER2-발현성 암"은 그들의 세포 표면에 존재하는 HER2 단백질을 갖는 세포를 포함하는 것이다.

[0171] HER2 수용체를 "과발현하는" 암은 동일한 조직 유형의 비-암성 세포와 비교해서, 그의 세포 표면에 상당히 고수준의 HER 수용체, 예를 들어 HER2를 갖는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭에 의해 유발되거나, 또는 전사 또는 해독 증가에 의해 유발될 수 있다. HER 수용체 과발현은 특정 세포 표면 상에 존재하는 HER 단백질의 수준 증가를 평가함으로써 진단 또는 예후 검정 (예: 면역조직화학 검정; IHC)에서 결정할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 예를 들어 형광성 계내 혼성화 [FISH; 참고: WO 98/45479 (1998년 10월에 공개됨)], 서던 블로팅 (southern blotting), 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 실시간 정량 PCR (RT-PCR)을 통하여 세포 내의 HER-코딩 핵산 수준을 측정할 수 있다. 또한, 생물학적 유체, 예를 들어 혈청에서 쉐드 (shed) 항원 (예: HER 세포의 도메인)을 측정함으로써 HER 수용체 과발현을 연구할 수 있다 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,933,294호 (1990년 6월 12일자로 허여됨); WO 91/05264 (1991년 4월 18일자로 공개됨); 미국 특허 제5,401,638호 (1995년 3월 28일자로 허여됨); 및 Sias et al. *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)]. 상기 검정 이외에도, 각종 생체내 검정이 전문의에게 이용 가능하다. 예를 들어, 환자 체내 세포를, 탐지 가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지시킨 항체에 노출시킬 수 있고, 이러한 환자 내의 세포에 대한 항체 결합을, 예를 들어 방사능에 대한 외부 스캐닝에 의해 또는 항체에 미리 노출시킨 환자로부터 취한 생검을 분석함으로써 평가할 수 있다.

[0172] 역으로 말하면, "HER2 수용체를 과발현하지 않는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포와 비교해서 HER2 수용체를 정상 수준보다 높은 수준으로 발현하지 않는 것이다.

[0173] HER 리간드를 "과발현하는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포와 비교해서 상기 리간드를 상당히 더 높은 수

준으로 생성시키는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭에 의해, 또는 전사 또는 해독 증가에 의해 유발될 수 있다. HER 리간드의 과발현은 환자, 예를 들어 종양 생검에서 리간드(또는 이를 코딩하는 핵산)의 수준을 평가하거나, 또는 각종 진단 검정, 예를 들어 IHC, FISH, 서던 블로팅, PCR 또는 상기 언급된 생체내 검정에 의해 진단적으로 결정할 수 있다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴를 유발시키는 물질을 지칭한다. 이 용어에는 방사성 동위원소(예: At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 독소, 예를 들어 소분자 독소, 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소(그의 단편 및/또는 변이체 포함)가 포함된다.

[0175] "화학요법제"는 암을 치료하는데 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어 티오태파 및 시클로포스파미드(CYTOXAN®

); 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라벨라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸톨로멜라민; 아세토게닌(특히, 불라타신 및 불라타시논); 멜타-9-테트라하이드로칸나비놀(드로나비놀, MARINOL®

); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 캄프토테신 [합성 유사체 토포테칸(HYCAMTIN®

), CPT-11(օ리노테칸, CAMPTOSAR®

), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함]; 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신(합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님무스틴; 항생제, 예를 들어 엔디인(enediyne) 항생제[예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1(참고: Agnew, *Chem Int'l Ed Engl.* 33: 183-186 (1994)); 디네미신(디네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 빨색단 및 관련 색단백질 엔디인 항생제 빨색단], 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신(ADRIAMYCIN®

, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-페롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사제(DOXIL®

), 리포솜성 독소루비신 TLC D-99(MYOSET®

), 폐길화 리포솜성 독소루비신(CAELYX®

), 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신(예: 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예를 들어 메토트렉세이트, 쟈시타빈(GEMZAR®

), 테가푸르(UFTORAL®

), 카페시타빈(XELODA®

), 에포티론 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 퍼리미딘 유사

체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 폐나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®

다당류 복합체 (공급처: JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (TAXOL®

), 파클리탁셀 (ABRAXANE™)의 일부민-공학 처리시킨 나노입자 제형 및 독세탁셀 (TAXOTERE®); 클로람부실; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빙블라스틴 (VELBAN®

), 빙크리스틴 (ONCOVIN®

), 빙테신 (ELDISINE®

, FILDSEIN®

), 및 비노렐빈 (NAVELBINE®

)을 포함한, 투불린 중합으로 인해 미소관이 형성되지 못하게 하는 빙카; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보빈; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예: 레티노산) [백사로텐 (TARGRETIN®

) 포함]; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예: BONEFOS®

또는 OSTAC®

), 에티드로네이트 (DIDROCAL®

), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (ZOMETA®

), 알랜드로네이트 (FOSAMAX®

), 파미드로네이트 (AREDIA®

), 틸루드로네이트 (SKELID®

), 또는 리세드로네이트 (ACTONEL®

); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상한 세포 증식에 밀접한 영향을 미치는 신호 전달 경로에 있어 유전자, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드; 백신, 예를 들어 THERATOPE®

백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN®

백신, LEUVECTIN®

백신 및 VAXID®

백신; 토포이소마라제 1 억제제 (LURTOTECAN®)

); rmRH (예: ABARELIX®

); BAY439006 (소라페니브; 공급처: Bayer); SU-11248 (공급처: Pfizer); 페리포신, COX-2 억제제 (예: 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예: PS341); 보르테조미브 (VELCADE®

); CCI-779; 티피파르니브 (R11577); 오라페니브, ABT510; Bcl-2 억제제, 예를 들어 오블리메르센 나트륨 (GENASENSE®)

); 픽산트롬; EGFR 억제제 (하기 정의 참고); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참고); 및 상기 언급된 제제의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라 상기 제제의 2가지 이상 병용물, 예를 들어 CHOP (이는 시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레드니솔론의 병용 요법에 대한 약어이다), 및 FOLFOX (이는 5-FU 및 류코보빈과 병용된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 이용한 치료 섭생에 대한 약어이다)이 포함된다.

[0176]

상기 정의에는 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제시키는 작용을 하는 항호르몬제, 예를 들어 혼합된 아고니스트/길항체 프로파일을 나타내는 항에스트로겐제, 예를 들어 타목시펜 (NOLVADEX®

), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (FARESTON®

), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (EVISTA®

), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조정제 (SERMs), 예를 들어 SERM3; 아고니스트 특성을 지니지 않은 순수한 항에스트로겐제, 예를 들어 풀베스트란트 (FASLODEX®

), 및 EM800 [이러한 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단시키고/시키거나, DNA 결합을 억제시키고/시키거나, ER 전환율을 증가시키고/시키거나 ER 수준을 억제시킬 수 있다]; 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예를 들면, 포르메스탄 및 액세메스탄 (AROMASIN®

), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예를 들면, 아나스트로졸 (ARIMIDEX®

), 레트로졸 (FEMARA®

) 및 아미노글루테티미드, 및 기타 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (RIVISOR®

), 메게스트롤 아세테이트 (MEGASE®

), 파드로졸, 이미다졸; 황체형성 호르몬 방출 호르몬 아고니스트, 예를 들어 름프롤리드 (LUPRON®

및 ELIGARD®

), 고세렐린, 부세렐린, 및 트리프테렐린; 성 호르몬, 예를 들어 프로게스테론, 예를 들면, 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예를 들면, 디에틸스틸베스트롤 및 프레마린, 및 안드로겐/레티노이드, 예를 들어 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERDs); 항안드로겐제, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 테스톨락톤; 및 상기 언급된 제제의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라 상기 제제의 2가지 이상 병용물이 포함된다.

[0177]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "EGFR-표적화 약물"은 EGFR와 결합하고, 임의로는 EGFR 활성화를 억제시키는 치료제를 지칭한다. 이러한 작용제의 예에는 EGFR와 결합하는 항체 및 소분자가 포함된다. EGFR와 결합하는 항체의 예에는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) [참고: 미국 특허 제4,943,533호 (Mendelsohn et al.)] 및 그의 변이체, 예를 들어 인간화 225 [C225 또는 세톡시마브 (Cetuximab); ERBITUX®

] 및 다시 만든 인간 225 (H225) [참고: WO 96/40210, Imclone Systems Inc.]; 유형 II 돌연변이체 EGFR와 결합하는 항체 [참고: 미국 특허 제5,212,290호]; 미국 특허 제5,891,996호에 기재된 바와 같은, EGFR와 결합하는

인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR와 결합하는 인간 항체, 예를 들어 ABX-EGF [참고: WO98/50433, Abgenix]가 포함된다. 항-EGFR 항체를 세포독성제와 접합시킴으로써, 면역접합체를 생성시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, EP 659,439A2, Merck Patent GmbH]. EGFR와 결합하는 소분자의 예에는 ZD1839 또는 제피티니브 (Gefitinib) (IRESSA™; 공급처: Astra Zeneca), CP-358774 또는 애를로티니브 (Erlotinib) HC1 (TARCEVA™; 공급처: Genentech/OSI) 및 AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen)이 포함된다.

[0178] "티로신 키나제 억제제"는 HER 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 어느 정도 억제시키는 분자이다. 이러한 억제제의 예에는 앞서 단락에 언급된 EGFR-표적화 약물 뿐만 아니라 소분자 HER2 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 TAK165 (공급처: Takeda), EGFR과 우선적으로 결합하지만 HER2-과발현성 세포와 EGFR-과발현성 세포 둘 다를 억제시키는 이중-HER 억제제, 예를 들어 EKB-569 (공급처: Wyeth), 경구 HER2 및 EGFR 티로신 키나제 억제제인 GW572016 (공급처: Glaxo), 및 PKI-166 (공급처: Novartis); 범 (pan)-HER 억제제, 예를 들어 카네르티니브 (canertinib) (CI-1033; Pharmacia); Raf-1 신호 전달을 억제시키는 Raf-1 억제제, 예를 들어 안티센스 작용제 ISIS-5132 (공급처: ISIS Pharmaceuticals); 비-HER 표적화 TK 억제제, 예를 들어 이마티니브 (Imatinib) 메실레이트 (Gleevac™; 공급처: Glaxo); MAPK 세포의 조절된 키나제 I 억제제 CI-1040 (공급처: Pharmacia); 퀴나졸린, 예를 들어 PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노)퀴나졸린; 피리도피리미딘; 피리미도피리미딘; 피롤로피리미딘, 예를 들어 CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706; 피라졸로피리미딘, 4-(페닐아미노)-7H-피롤로[2,3-d] 피리미딘; 쿠르쿠민 (디페롤로일 메탄, 4,5-비스 (4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 니트로티오펜 부분을 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (공급처: Warner-Lamber); 안티센스 분자 (예를 들어, HER-코딩 핵산과 결합하는 것); 퀴녹살린 [참고: 미국 특허 제5,804,396호]; 트리포스틴 [참고: 미국 특허 제5,804,396호]; ZD6474 (공급처: Astra Zeneca); PTK-787 (공급처: Novartis/Schering AG); 범-HER 억제제, 예를 들어 CI-1033 (공급처: Pfizer); 아파니탁 (Affinitac) (ISIS 3521; 공급처: Isis/Lilly); 이마티니브 메실레이트 (Gleevac; 공급처: Novartis); PKI 166 (공급처: Novartis); GW2016 (공급처: Glaxo SmithKline); CI-1033 (공급처: Pfizer); EKB-569 (공급처: Wyeth); 세막시니브 (Semaxinib) (공급처: Sugen); ZD6474 (공급처: AstraZeneca); PTK-787 (공급처: Novartis/Schering AG); INC-IC11 (공급처: Imclone); 또는 다음 특허 공보 중의 어느 것에 기재된 바와 같은 것이 포함된다: 미국 특허 제5,804,396호; WO99/09016 (American Cyanimid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); 및 WO96/33980 (Zeneca).

[0179] "항혈관형성제"는 혈관의 발생을 어느 정도 차단시키거나 방해하는 화합물을 지칭한다. 항혈관형성 인자는, 예를 들어 혈관형성을 증진시키는데 관여하는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체와 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 본원에서 바람직한 항혈관형성 인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)와 결합하는 항체, 예를 들어 베바시주마브 (Bevacizumab) (AVASTIN®

)이다.

[0180] 용어 "사이토킨"은 또 다른 세포 상에서 세포간 매개인자로서 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토킨의 예는 램포카인, 모노카인, 및 전통적 폴리펩티드 호르몬이다. 이러한 사이토킨에 포함되는 것은 특히, 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소의 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 텔락신; 프로텔락신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 및 황체형성 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토젠; 종양 피사 인자- α 및 - β ; 뮬러의 (mullerian) 억제성 물질; 마우스 성선자극호르몬 관련 웨პ티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- β ; 혈소판 성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGFs), 예를 들어 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- α , - β 및 - γ ; 접락 자극 인자 (CSFs), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (ILs), 예를 들어 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 종양 피사 인자, 예를 들어 TNF- α 및 TNF- β ; 및 기타 폴리펩티드 인자 [이에는 LIF 및 kit 리간드 (KL)가 포함된다]이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 사이토킨에는 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성을 등가물이 포함된다.

[0181] 제형화되는 항체는 바람직하게 본질적으로 순수하고 본질적으로 균질한 (즉, 오염성 단백질 등을 함유하지 않음) 것이 바람직하다. "본질적으로 순수한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 항체를 약 90 중량%

이상, 바람직하게는 약 95 중량% 이상 포함하는 조성물을 의미한다. "본질적으로 균질한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 항체를 약 99 중량% 이상 포함하는 조성물을 의미한다.

[0182] 본원에서의 "B-세포 표면 마커" 또는 "B-세포 표면 항원"은 이와 결합하는 항체를 이용하여 표적화시킬 수 있는 B 세포의 표면 상에 발현된 항원이다. 예시되는 B-세포 표면 마커에는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 및 CD86 백혈구 표면 마커가 포함된다 [이에 대한 설명은 문헌 (The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)을 참고할 수 있다]. 기타 B-세포 표면 마커에는 RP105, FcRH2, B-세포 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 및 239287이 포함된다. 본원에서 특히 관심있는 B-세포 표면 마커는 포유류의 기타 비-B-세포 조직과 비교해서 B 세포 상에 우선적으로 발현되고, 전구체 B 세포와 성숙한 B 세포 둘 다 상에서 발현될 수 있다. 본원에서 바람직한 B-세포 표면 마커는 CD20 또는 BR3이다.

[0183] "CD20" 항원, 또는 "CD20"은 말초혈 또는 림프계 기관으로부터 B 세포의 90% 초과 표면 상에서 발견되는, 분자량이 대략 35 kD인 비-글리코실화 (non-glycosylated) 인단백질이다. CD20은 정상 B 세포 뿐만 아니라 악성 B 세포 상에도 존재하지만, 줄기 세포 상에서는 발현되지 않는다. 당해 분야의 문헌에 보고된 CD20에 대한 다른 명칭에는 "B-림프구-제한된 항원" 및 "Bp35"가 포함된다. CD20 항원은, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Clark et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 1766 (1985)].

[0184] 본원의 목적상, "인간화 2H7"은 그의 CDR 서열이 미국 특허 제5,500,362호 (도 5 및 6) (이는 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있는, 2H7 항체의 인간화 변이체를 지칭한다. 본원에서 인간화 2H7 항체의 예에는 WO2004/056312 (이는 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 변이체 뿐만 아니라 기타 변이체, 예를 들어 2H7v16, 2H7v31, 2H7v73, 2H7v75, 2H7v96, 2H7v114, 2H7v115, 2H7v116, 2H7v138, 2H7v477, 2H7v375 등이 포함된다.

[0185] 한 양태에서, 인간화 2H7 항체는 다음 CDR 서열들 중의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함한다:

[0186] CDR L1 서열 RASSSVSYXH [여기서, X는 M 또는 L이다 (서열 67)], 예를 들어 서열 57 (도 18A),

[0187] 서열 58의 CDR L2 서열 (도 18A),

[0188] CDR L3 서열 QQWXFNPPT [여기서, X는 S 또는 A이다 (서열 68)], 예를 들어 서열 59 (도 18A),

[0189] 서열 60의 CDR H1 서열 (도 18B),

[0190] CDR H2 서열 AIYPNGXTSYNQKFKG [여기서, X는 D 또는 A이다 (서열 69)], 예를 들어 서열 61 (도 18B), 및

[0191] CDR H3 서열 VVYYSSXYWYFVDV [여기서, 위치 6에서의 X는 N, A, Y, W, 또는 D이고, 위치 7에서의 X는 S 또는 R이다 (서열 70)], 예를 들어 서열 62 (도 18B).

[0192] 상기 CDR 서열은 일반적으로, 인간 가변 경쇄 및 가변 중쇄 골격 서열, 예를 들어 실질적으로 인간 경쇄 카파 아군 I (V_L κ I)의 인간 컨센서스 FR 잔기, 및 실질적으로 인간 중쇄 아군 III (V_H III)의 인간 컨센서스 FR 잔기 내에 제시된다 [참고: WO 2004/056312 (Lowman et al.)].

[0193] 가변 중쇄 영역은 인간 IgG 쇄 불변 영역에 연결시킬 수 있는데, 이러한 영역은 예를 들어, IgG1 또는 IgG3 (천연 서열 및 변이체 불변 영역 포함)일 수 있다.

[0194] 바람직한 양태에서는, 상기 항체가 위치 56, 100 및/또는 100a에서 하나 이상의 아미노산 치환(들), 예를 들어 가변 중쇄 도메인 중의 D56A, N100A, 또는 N100Y, 및/또는 S100aR; 및 위치 32 및/또는 92에서 하나 이상의 아미노산 치환(들), 예를 들어 가변 경쇄 도메인 중의 M32L 및/또는 S92A를 임의로 포함하는, 서열 26의 가변 경쇄 도메인 서열 (v16, 도 18A에 도시된 바와 같음)을 또한 임의로 포함하는, 서열 29의 가변 중쇄 도메인 서열 (v16, 도 18B에 도시된 바와 같음)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 항체가 서열 63 또는 64의 경쇄 아미노산 서열과, 서열 65, 66, 71 또는 72의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 본래 항체이다.

[0195] 바람직한 인간화 2H7 항체는 오크렐리주마브 (ocrelizumab) (공급처: Genentech)이다.

[0196] 본원의 항체는 Fc 영역 내에, ADCC 활성을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있는데, 예를 들어 아미노산 치환이 중쇄 잔기의 Eu 네모버링을 이용하여 위치 298, 333, 및 334에서 이루어진 것인데, 바람직하게는 S298A, E333A, 및 K334A이다 [참고: 미국 특허 제6,737,056 B1호 (Presta)].

[0197] 이들 항체 모두는 Fc 영역 내에, FcRn 결합성 또는 혈청 반감기를 개선시키는 하나 이상의 치환을 포함할 수 있는데, 예를 들어 중쇄 위치 434에서의 치환, 예를 들어 N434W을 포함할 수 있다 [참고: 미국 특허 제6,737,056 B1호 (Presta)].

[0198] 이들 항체 모두는 Fc 영역 내에, CDC 활성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있는데, 예를 들어 위치 326에서의 하나 이상의 치환, 바람직하게는 K326A 또는 K326W을 포함할 수 있다 [참고: 미국 특허 제6,528,624 B1호 (Idusogie et al.)].

[0199] 몇몇 바람직한 인간화 2H7 변이체는 서열 26의 가변 경쇄 도메인 및 서열 29의 가변 중쇄 도메인을 포함하는 것인데, 이에는 Fc 영역 (존재한다면)에서의 치환을 수반하거나 수반하지 않는 것, 및 서열 29에서 변경 N100A; 또는 D56A 및 N100A; 또는 D56A, N100Y, 및 S100aR을 수반한 가변 중쇄 도메인과, 서열 26에서 변경 M32L; 또는 S92A; 또는 M32L 및 S92A를 수반한 가변 경쇄 도메인을 포함하는 것이 포함된다.

[0200] 2H7v16의 가변 중쇄 도메인 중의 M34는 항체 안정성의 잠재적 공급원으로서 확인되었고, 이는 치환을 위한 또 다른 잠재적 후보이다.

[0201] 본 발명의 각종의 몇몇 바람직한 양태를 요약해 보면, 2H7v16에 기초한 변이체의 가변 영역은 다음 표에 나타낸 아미노산 치환 위치를 제외하고는, v16의 아미노산 서열을 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 2H7 변이체는 v16과 동일한 경쇄를 갖는다.

예시되는 인간화 2H7 항체 변이체

2H7 버전	중쇄 (V_H) 변화	경쇄 (V_L) 변화	Fc 변화
16 (참고용)			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

[0202]

[0203] 한 가지 바람직한 인간화 2H7은 2H7v16 가변 경쇄 도메인 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR

[0204]

[0205] 및 2H7v16 가변 중쇄 도메인 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYWFDWVGQGTLVTVSS (서열 29).

[0206]

[0207] 을 포함한다.

[0208] 인간화 2H7v16 항체가 본래 항체인 경우, 이는 경쇄 아미노산 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (서열 63);

- [0210] 및 서열 65의 중쇄 아미노산 서열, 또는 다음 중쇄 아미노산 서열:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGL**E**WVGAIYPGNGDTSYNQFKGR
 FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
 SSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK**D**TLMISRTPEVTCVVVDVSH
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE**S**NGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 71).
- [0211]
- [0212] 을 포함할 수 있다.
- [0213] 또 다른 바람직한 인간화 2H7 항체는 2H7v511 가변 경쇄 도메인 서열:
 DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLI**Y**APSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTSSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (서열 73)
- [0214]
- [0215] 및 2H7v511 가변 중쇄 도메인 서열:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGL**E**WVGAIYPGNGATSYNQFKGR
 FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVW GQGTLVTVSS (서열 74).
- [0216]
- [0217] 을 포함한다.
- [0218] 인간화 2H7v511 항체가 본래 항체인 경우, 이는 경쇄 아미노산 서열:
 DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLI**Y**APSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTSSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIP**P**SDIEQLKSGTASVVCNNFYPR
 EA**K**VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE**K**HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGE**C** (서열 64)
- [0219]
- [0220] 및 서열 66의 중쇄 아미노산 서열, 또는 다음 중쇄 아미노산 서열:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGL**E**WVGAIYPGNGATSYNQFKGR
 FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK**D**TLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAA**L**PAPIAA
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE**S**NGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 72).
- [0221]
- [0222] 을 포함할 수 있다.
- [0223] 본원에서의 "B-세포 악성 종양"에는 비호지킨 림프종 (NHL), 예를 들어 저 악성도/소포성 NHL, 소 림프구성 (SL) NHL, 중간 악성도/소포성 NHL, 중간 악성도 화산성 NHL, 고 악성도 면역모세포성 NHL, 고 악성도 림프아구성 NHL, 고 악성도 소형 비-절단 세포 NHL, 거대 질환 NHL, 외투 세포 림프종, AIDS-관련 림프종 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia); 백혈병, 예를 들어 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발 세포 백혈병 및 만성 골수아구성 백혈병; 및 기타 혈액학적 악성 종양이 포함된다. 이러한 악성 종양은 B-세포 표면 마커, 예를 들어 CD20에 대항하여 유도된 항체를 사용하여 치료할 수 있다.
- [0224] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비호지킨 림프종" 또는 "NHL"은 호지킨 림프종 이외의 림프계 암을 지칭한다. 호지킨 림프종은 일반적으로, 리드-슈테른베르크 (Reed-Sternberg) 세포가 호지킨 림프종에는 존재하고 비호지킨 림프종에는 존재하지 않는 것으로써, 비호지킨 림프종과 구별될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 상기 용어에 포함되는 비호지킨 림프종의 예에는 당해 분야에 공지된 분류 도식, 예를 들어 문헌 [참고: Color Atlas of Clinical Hematology, Third Edition; A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd. 2000) (특히 도 11.57, 11.58 및/또는 11.59 참고)]에 기재된 바와 같은 개정 유럽-미국 림프종 [Revised European-American Lymphoma (REAL)] 분류에 따라서 당업자 (예: 종양학자 또는 병리학자)에 의해 그 자체로서 확인될 수 있는 것이 포함된다. 보다 구체적인 예에는 재발성 또는 난치성 NHL, 제일선 저 악성도 (front line low grade) NHL, 병기 III/IV NHL, 화학요법 내성 NHL, 전구체 B 림프아구성 백혈병 및/또는 림프종, 소 림프구성 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 프로-림프구성 백혈병 및/또는 소 림프구성 림프종, B-세포 프로-림프구성 림프종, 면역종 및/또는 림프형질세포성 림프종, 연변층 (marginal zone) B 세포

림프종, 비장 연변층 림프종, 림프절 이외 연변층 - MALT 림프종, 림프절 연변층 림프종, 모발 세포 백혈병, 형질세포종 및/또는 형질 세포 골수종, 저 악성도/소포성 림프종, 중간 악성도/소포성 NHL, 외투 세포 림프종, 소포 중심 림프종 (소포성), 중간 악성도 확산성 NHL, 확산성 대형 B-세포 림프종, 침습성 (공격성) NHL (침습성 제일선 NHL 및 침습성 재발 NHL 포함), 자기 유래 줄기 세포 이식 후에 재발하거나 이에 난치성인 NHL, 원발성 종격 (mediastinal) 대형 B-세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 고 악성도 면역모세포성 NHL, 고 악성도 림프아구성 NHL, 고 악성도 소 비-절단 세포 NHL, 거대 질환 NHL, 베키트 (Burkitt) 림프종, 전구체 (말초) T-세포 림프아구성 백혈병 및/또는 림프종, 성체 T-세포 림프종 및/또는 백혈병, T 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 프로-림프구성 백혈병, 대형 과립상 림프구성 백혈병, 균상식육종 (mycosis fungoides) 및/또는 세자리 (Sezary) 증후군, 림프절 이외 천연 킬러/T-세포 (코 유형) 림프종, 장병증 유형 T-세포 림프종, 간비장 T-세포 림프종, 피하 지방층염 (pannulitis) 유사 T-세포 림프종, 피부 림프종, 역형성 대형 세포 림프종, 혈관중심성 림프종, 소장 T 세포 림프종, 말초 T 세포 (달리 명시되지 않는 한) 림프종 및 혈관면역모세포성 T 세포 림프종이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0225]

본원에서의 "자가면역 질환"은 개개인 자신의 조직이나 그의 공동-분리물 또는 발현물로부터 유발되고 자신의 조직이나 그의 공동-분리물 또는 발현물에 대항하여 유도된 질병 또는 장애, 또는 이로부터 비롯되는 질환이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예에는 관절염 [류마티스성 관절염, 유년성 발병 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염 및 강직성 척추염], 건선, 피부염 (아토피성 피부염 포함); 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역성 두드러기, 다발성 근염/피부 근염, 독성 표피 괴사용해, 피부 경화증 (전신성 피부 경화증 포함), 경화증 (예: 진행성 전신성 경화증), 염증성 장 질환 (IBD) [예: 크론병 (Crohn's disease), 궤양성 결장염, 자가면역성 염증성 장 질환], 피저 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염, 호흡기 장애 증후군, 예를 들어 성인 호흡기 장애 증후군 (ARDS), 수막염, IgE-매개성 질환, 예를 들어 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예를 들어 라스무센 (Rasmussen) 뇌염, 포도막염 또는 자가면역성 포도막염, 결장염, 예를 들어 현미경적 (미세) 결장염 및 콜라겐성 결장염, 사구체신염 (GN), 예를 들어 막성 GN (막성 신병증), 특발성 막성 GN, 막성 증식성 GN (MPGN) (유형 I 및 유형 II 포함), 및 신속한 진행성 GN, 알레르기성 질환, 알레르기 반응, 습진, 천식, T 세포 침윤과 만성 염증 반응과 관련된 질환, 아테롬성 경화증, 자가면역성 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 루푸스 (신염, 뇌염, 소아, 비-신, 원판상, 탈모증 포함), 유년성 발병 (유형 I) 당뇨병 [소아 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 당뇨병 (유형 II 당뇨병) 포함], 다발성 경화증 (MS), 예를 들어 스피노-광학 (spino-optical) MS, 사이토킨 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증 (sarcoidosis), 육아종증, 예를 들어 림프종양 육아종증, 베게너스 (Wegener's) 육아종증, 과립구결핍증, 혈관염, 예를 들어 대혈관 혈관염 [류마티스성 다발성 근육통 및 거대 세포 (다카야스) 관절염 포함], 중혈관 혈관염 [가와사키병 (Kawasaki's disease) 및 결절성 다발성 동맥염 포함], CNS 혈관염, 전신성 괴사성 혈관염, 및 ANCA-관련 혈관염, 예를 들어 추르크-스트라우쓰 (Churg-Strauss) 혈관염 또는 증후군 (CSS), 측두 동맥염, 재생불량성 빈혈, 콤브스 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드-블랙판 빈혈, 자가면역성 용혈성 빈혈 (AIHA)을 포함한 면역 용혈성 빈혈 또는 용혈성 빈혈, 악성 빈혈, 진정 적혈구계 무형성 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역성 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 누출과 관련된 질환, CNS 염증 장애, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병 (Bechet disease), 캐슬맨 증후군 (Castleman's syndrome), 구드페스츄어 증후군 (Goodpasture's Syndrome), 레이노이드 증후군 (Reynaud's syndrome), 쇼그伦 증후군 (Sjogren's syndrome), 스티븐스-존슨 (Stevens- Johnson) 증후군, 유사천포창, 예를 들어 수포성 유사천포창, 천포창 (심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 및 점막 유사천포창 천포창 포함), 자가면역성 다발성 내분비병증, 라이터병 (Reiter's disease), 면역 복합 신염, 만성 신경병증, 예를 들어 IgM 다발신경병증 또는 IgM 매개된 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어, 심근 경색 환자에 의해 발병되는 바와 같다), 예를 들어 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개된 저혈소판증, 예를 들어 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP) (만성 또는 급성 ITP 포함), 고환 및 난소의 자가면역 질환, 예를 들어 자가면역성 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선 기능저하증, 부갑상선 기능저하증, 자가면역성 내분비 질환, 예를 들어 자가면역성 갑상선염, 만성 갑상선염 [하시모토 (Hashimoto') 갑상선염] 또는 아급성 갑상선염 등의 갑상선염, 자가면역성 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능저하증, 애디송병 (Addison's disease), 그레이브스병 (Grave's disease), 다분비선 증후군, 예를 들어 자가면역성 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비증 증후군), 종양연관성 증후군, 예를 들어 신경학적 종양연관성 증후군, 예를 들면, 람버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-람버트 증후군, 근육강直 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기성 뇌척수염, 중증 근무력증, 소뇌 변성, (대뇌) 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 신경근

육간장증, 안진전 또는 안진전 간대성근경련증 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 쉬이한 증후군 (Sheehan's syndrome), 자가면역성 간염, 만성 간염, 루포이드 (lupoid) 간염, 만성 활동성 간염 또는 자가면역성 만성 활동성 간염, 럼프계 간질성 폐렴, 폐쇄성 세기관지염 (비-이식성) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군 (Guillain-Barre' Syndrome), 베르거병 [Berger's Disease (IgA 신병증)], 원발성 담즙성 간경변, 비열대 스프루 (글루텐 장병증), 난치성 스프루, 포진성 피부염, 한랭글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS; Lou Gehrig's disease), 관상 동맥 질환, 자가면역성 내이 질환 (AIED) 또는 자가면역성 난청, 안전진 간대성근경련증 (OMS), 다발성 연골염, 예를 들어 난치성 다발성 연골염, 폐포 단백증, 아밀로이드증, 거대 세포 간염, 공막염, 비-암성 럼프구증가증, 모노클로날 B 세포 럼프구증가증을 포함하는 원발성 럼프구증가증 (예: 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 의미 미확정의 모노클로날 감마글로불린병, MGUS), 말초 신경병증, 종양연관성 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근육병증, 국소 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도막망막염, 자가면역성 혈액 질환, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전증, 슈미츠 (Schmidt) 증후군, 부신염, 위선 위축증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 드레슬러 (Dressler) 증후군, 원형 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노이드 현상, 식도 운동장애, 손발 가락 경화증 및 모세혈관 확장증), 남성 및 여성 자가면역성 불임, 강직성 척추염, 혼합 결체 조직 질환, 샤가스병 (Chagas disease), 류마티스성 발열, 재발성 유산, 농부폐, 다형 홍반, 심장절개 후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 애조가 폐 (bird-fancier's lung), 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예를 들어 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증 (leishmaniasis), 키파노소마증 (kypanosomiasis), 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증 (aspergillosis), 삼프터 (Sampter) 증후군, 캐이플란 (Caplan) 증후군, 뎅기 (dengue), 심내막염, 심내막심근 섬유증, 안내염 (눈속염증), 장기 용기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 숀만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 헤테로크로닉 (heterochronic) 섬모체염, 또는 푸스 (Fuch) 섬모체염, 헤노호-쉔라인 (Henoch-Schonlein) 자반증, 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머 병, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종 후 증후군, 선천성 풍진 감염, 엠슈타인-바르 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 유행성 이하선염, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역성 생식선 기능상실, 시덴햄 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신염, 폐쇄 혈전관염, 갑상선중독증, 척수 매독, 및 거대 세포 다발성 근육통이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0226]

본원에서 "종양 괴사 인자 수용체 초분자군" 또는 "TNF 수용체 초분자군"은 TNF 계열 내의 사이토킨에 의해 결합된 수용체 폴리펩티드를 지칭한다. 일반적으로, 이들 수용체는 그들의 세포외 도메인에 1개 이상의 시스테인 풍부 반복 서열을 수반하는 유형 I 막관통 수용체이다. TNF 수용체 초분자군은 (1) 사멸 수용체; (2) 미끼 수용체; 및 (3) 사멸 도메인이 결여된 신호 전달 수용체로 추가로 세분될 수 있다. "사멸 수용체"는 그의 세포질 성 또는 세포내 영역에 "사멸 도메인", 즉 특정 유전자의 세포소멸 또는 유도를 야기시킬 수 있는 세포 내의 신호를 변환시키는 작용을 하는 영역 또는 서열을 함유한다. "미끼 수용체"에는 기능적 사멸 도메인이 결여되어 있고, 세포소멸을 유발시키는 신호를 변환시킬 수 없다. TNF 유전자 계열 내의 사이토킨의 예에는 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 종양 괴사 인자-베타 (TNF-베타 또는 램포톡신), CD30 리간드, CD27 리간드, CD40 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, Apo-1 리간드 (Fas 리간드 또는 CD95 리간드로서 지칭되기도 함), Apo-2 리간드 (TRAIL로서 지칭되기도 함), Apo-3 리간드 (TWEAK로서 지칭되기도 함), 오스테오프로테제린 (OPG), APRIL, RANK 리간드 (TRANCE로서 지칭되기도 함), 및 TALL-1 (BlyS, BAFF 또는 THANK로서 지칭되기도 함)이 포함된다. TNF 수용체 초분자군의 예에는 유형 1 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR1), 유형 2 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR2), p75 신경 성장 인자 수용체 (NGFR), B 세포 표면 항원 CD40, T 세포 항원 OX-40, Apo-1 수용체 (Fas 또는 CD95로서 지칭되기도 함), Apo-3 수용체 (DR3, sw1-1, TRAMP 및 LARD로서 지칭되기도 함), "막관통 활성인자 및 CAML-반응인자" 또는 "TACI"로서 지칭된 수용체, BCMA 단백질, DR4, DR5 (또 다른 한편으로, Apo-2; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 또는 KILLER로서 지칭되기도 함), DR6, DcR1 (TRID, LIT 또는 TRAIL-R3으로서 지칭되기도 함), DcR2 (TRAIL-R4 또는 TRUNDD로서 지칭되기도 함), OPG, DcR3 (TR6 또는 M68로서 지칭되기도 함), CAR1, HVEM (ATAR 또는 TR2로서 지칭되기도 함), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, 램포톡신 베타 수용체 (LTBr), 4-1BB 수용체 및 TR9가 포함된다 [참고: EP 988,371A1].

[0227]

용어 "Apo-2 리간드", "Apo-2L", "Apo2L", "Apo-2 리간드/TRAIL", 및 "TRAIL"은 도 24 (서열 46)에 도시된 아미노산 서열의 아미노산 잔기 114 내지 281, 잔기 95 내지 281, 잔기 92 내지 281, 잔기 91 내지 281, 잔기 41-281, 잔기 39 내지 281, 잔기 15 내지 281, 또는 잔기 1 내지 281을 포함하는 폴리펩티드 서열 뿐만 아니라 상기 서열의 생물학적 활성 단편, 결실, 삽입 또는 치환형 변이체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 한 양태에서는, 상기 폴리펩티드 서열이 도 24 (서열 46)의 잔기 114 내지 281을 포함한다. 임의로

는, 폴리펩티드 서열이 도 24 (서열 46)의 잔기 92 내지 281 또는 잔기 91 내지 281을 포함한다. Apo-2L 폴리펩티드는 도 24에 도시된 천연 뉴클레오티드 서열 (서열 45)에 의해 코딩될 수 있다. 임의로는, 도 24 (서열 45)의 잔기 Pro119를 코딩하는 코돈이 "CCT" 또는 "CCG"일 수 있다. 임의로는, 단편 또는 변이체가 생물학적으로 활성이고, 상기 언급된 서열들 중의 어느 하나와의 아미노산 서열 동일률이 약 80% 이상, 또는 약 90% 이상, 또는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상이다. 상기 정의는 그의 천연 아미노산 중의 1개 이상이 또 다른 아미노산, 예를 들어 알라닌 잔기에 의해 치환되는, Apo-2 리간드의 치환형 변이체를 포함한다. 상기 정의는 또한, Apo-2 리간드 공급원으로부터 분리되거나 또는 재조합 및/또는 합성 방법에 의해 제조된 천연 서열 Apo-2 리간드를 포함한다. 본 발명의 Apo-2 리간드에는 WO97/01633 (1997년 1월 16일자로 공개됨), WO97/25428 (1997년 7월 17일자로 공개됨), WO99/36535 (1999년 7월 22일자로 공개됨), WO 01/00832 (2001년 1월 4일자로 공개됨), WO 02/09755 (2002년 2월 7일자로 공개됨), WO 00/75191 (2000년 12월 14일자로 공개됨), 및 미국 특허 제 6,030,945호 (2000년 2월 29일자로 허여됨)에 기재된 Apo-2 리간드 또는 TRAIL로서 지칭된 폴리펩티드가 포함된다. 상기 용어는 이러한 폴리펩티드의 단량체, 이량체, 삼량체, 육량체 또는 보다 고 차수의 올리고머 형태를 포함하는, Apo-2 리간드의 형태를 일반적으로 지칭하기 위해 사용된다. Apo-2L 서열 내에 지칭된 모든 아미노산 잔기 넘버링은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 도 24 (서열 46)에 따르는 넘버링을 이용한다.

[0228] "Apo-2 리간드 수용체"에는 당해 분야에서 "DR4" 및 "DR5"로서 지칭된 수용체가 포함된다. 다음 문헌에는 "DR4"로서 지칭된 TNF 수용체 계열 구성원이 기재되었다 [참고: Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997); WO 98/32856 (1998년 7월 30일자로 공개됨); WO 99/37684 (1999년 7월 29일자로 공개됨); WO 00/73349 (2000년 12월 7일자로 공개됨); US 6,433,147 (2002년 8월 13일자로 허여됨); US 6,461,823 (2002년 10월 8일자로 허여됨), 및 US 6,342,383 (2002년 1월 29일자로 허여됨)]. 문헌 [참고: Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997) 및 Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997)]에는 Apo2L/TRAIL에 대한 또 다른 수용체가 기재되었다 [참고: WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO 98/41629 (1998년 9월 24일자로 공개됨)]. 이 수용체는 DR5로서 지칭된다 (이 수용체는 또한, Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAP08, TRICK2 또는 KILLER로서 지칭되기도 하였다) [참고: 예를 들어, Screaton et al., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak et al., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu et al., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO 98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); EP 870,827 (1998년 10월 14일자로 공개됨); WO 98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO 99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨); WO 99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨); US 2002/0072091 (2002년 8월 13일자로 공개됨); US 2002/0098550 (2001년 12월 7일자로 공개됨); US 6,313,269 (2001년 12월 6일자로 허여됨); US 2001/0010924 (2001년 8월 2일자로 공개됨); US 2003/01255540 (2003년 7월 3일자로 공개됨); US 2002/0160446 (2002년 10월 31일자로 공개됨); US 2002/0048785 (2002년 4월 25일자로 공개됨); US 6,569,642 (2003년 5월 27일자로 허여됨); US 6,072,047 (2000년 6월 6일자로 허여됨); US 6,642,358 (2003년 11월 4일자로 허여됨)]. 상기 언급된 바와 같이, Apo-2L에 대한 기타 수용체에는 DcR1, DcR2, 및 OPG가 포함된다. 본원에서 사용된 경우의 용어 "Apo-2L 수용체"는 천연 서열 수용체 및 수용체 변이체를 포함한다. 이를 용어는 인간을 포함한 각종 포유류에서 발현된 Apo-2L 수용체를 포함한다. Apo-2L 수용체는 각종 인간 조직 계통에서 천연상 발생하는 바와 같이 내인적으로 발현될 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 발현될 수 있다. "천연 서열 Apo-2L 수용체"는 천연으로부터 유래된 Apo-2L 수용체와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 Apo-2L 수용체는 인간을 포함한 모든 포유류로부터의 천연 발생적 Apo-2L 수용체의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 천연 서열 Apo-2L 수용체는 천연으로부터 분리할 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성시킬 수 있다. 용어 "천연 서열 Apo-2L 수용체"는 구체적으로, 천연 발생적 절단 또는 분비된 형태의 수용체 (예를 들어, 세포 외 도메인 서열을 함유하는 가용성 형태), 천연 발생적 변이체 형태 (예: 교대로 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생적 대립 유전자성 변이체를 포함한다. 수용체 변이체에는 천연 서열 Apo-2L 수용체의 단편 또는 결실 돌연변이체가 포함될 수 있다. 도 25A-C는 1998년 11월 19일자로 WO 98/51793에 공개된 바와 같은 인간 DR5 수용체의 411개 아미노산 서열을, 그의 뉴클레오티드 서열과 함께 (서열 47 및 48) 도시한 것이다. 인간 DR5 수용체의 전사 스플라이스 변이체가 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 스플라이스 변이체는 그의 뉴클레오티드 서열과 함께 (서열 49 및 50) 도 26A-C에 도시된 바와 같고, 1998년 8월 20일자로 WO 98/35986에 공개된 바와 같은 인간 DR5 수용체의 440개 아미노산 서열을 코딩한다.

[0229] "사멸 수용체 항체"는 종양 괴사 인자 수용체 초분자군 내의 수용체에 대해 유도되고 세포소멸을 신호 전달할 수 있는 사멸 도메인을 함유하는 항체(들)를 일반적으로 지칭하기 위해 본원에서 사용되고, 이러한 항체에는 DR5 항체 및 DR4 항체가 포함된다.

[0230] "DR5 수용체 항체", "DR5 항체" 또는 "항-DR5 항체"는 광범위한 의미로, 한 가지 이상 형태의 DR5 수용체 또는

그의 세포외 도메인과 결합하는 항체를 지칭하기 위해 사용된다. 임의로는, DR5 항체가 이종 서열 또는 분자와 융합되거나 연결된다. 바람직하게는, 이종 서열이 항체가 보다 고차수 또는 올리고머성 복합체를 형성할 수 있도록 해주거나 이를 촉진시켜 준다. 임의로는, DR5 항체가 DR5 수용체와는 결합하지만, 어느 부가의 Apo-2L 수용체 (예: DR4, DcR1, 또는 DcR2)와는 결합하지 않거나 교차 반응하지도 않는다. 임의로는, 상기 항체가 DR5 신호 전달 활성의 아고니스트이다.

[0231] 임의로는, 본 발명의 DR5 항체가 BIA코어 결합 검정에서 측정된 바와 같은 약 0.1 nM 내지 약 20 mM의 농도 범위에서 DR5 수용체와 결합한다. 임의로는, 본 발명의 DR5 항체가 BIA코어 결합 검정에서 측정된 바와 같은 약 0.6 nM 내지 약 18 mM의 IC50 값을 나타낸다.

[0232] 본원의 순수한 목적상, 용어 "아포마브"는 DR5와 결합하는 아고니스트 항체를 지칭하고, 서열 55 및 56의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 아포마브가 각각 서열 51 및 52의 중쇄 및 경쇄 서열을 포함한다.

II. 항체의 생성

[0234] 본 발명에 따라서 제형화할 수 있는 항체를 생성하는 기술은 다음과 같다.

(i) 항원 선별 및 제조

[0235] 바람직하게, 항체가 결합하는 항원은 생물학적으로 중요한 당단백질이고, 특정 질병이나 장애로 인해 고통받고 있는 포유류에게 항체를 투여하는 것이, 이러한 포유류에게 치료적 이득이 될 수 있다. 그러나, 비-폴리펩티드 항원에 대항하여 유도된 항체 (예를 들어, 종양 관련 당지질 항원; 미국 특히 제5,091,178호 참고)도 또한 고려된다.

[0236] 항원이 폴리펩티드인 경우에는, 이것이 막관통 분자 (예: 수용체) 또는 리간드 (예: 성장 인자)일 수 있다. 항원의 예에는 다음이 포함된다: 레닌과 같은 분자; 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 및 소의 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 항체형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예를 들어 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 (TF), 및 폰 빌레브란트 (von Willebrands) 인자; 항-응고 인자, 예를 들어 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예를 들어 우로키나제 또는 인간 뇨 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 봄베신 (bombeisin); 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (정상적으로 발현되고 분비된 T-세포 활성화시 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예를 들어 인간 혈청 알부민; 월리의 억제성 물질; 렐락신 (relaxin) A-쇄; 렐락신 B-쇄; 프로렐락신; 마우스 성선자극 호르몬-관련 웹티드; 미생물성 단백질, 예를 들어 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예를 들어 CTLA-4; 인히빈 (inhibin); 악티빈 (activin); 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 성 인자; 항신경성 인자, 예를 들어 뼈-유래된 항신경성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF-b; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유아세포 성장 인자, 예를 들어 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF-알파 및 TGF-베타 (TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3, TGF-b4 또는 TGF-b5 포함); 종양 괴사 인자 (TNF), 예를 들어 TNF-알파 또는 TNF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합성 단백질; CD 단백질, 예를 들어 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 및 CD40; 에리트로포이에틴; 글유도성 인자; 면역독소; 골형성발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 접락 자극 인자 (CSFs), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터루킨 (ILs), 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 및 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면-막 단백질; 붕괴-가속 인자; 바이러스성 항원, 예를 들어 AIDS 외피 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체 (homing receptor); 아드레신 (addressin); 조절성 단백질; 인테그린, 예를 들어 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 관련 항원, 예를 들어 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 상기 열거된 폴리펩티드 모두의 단편.

[0238] 본 발명에 포함되는 항체에 대한 분자상 표적의 예에는 CD 단백질, 예를 들어 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 및 CD40; ErbB 수용체 계열의 구성원, 예를 들어 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; B 세포 표면 항원, 예를 들어 CD20 또는 BR3; 종양 괴사 수용체 초분자군의 구성원 (DR5 포함); 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA); 세포 부착 분자, 예를 들어 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 알파4/베타7 인테그린,

및 알파v/베타3 인테그린 (그의 알파 또는 베타 소단위체 포함) (예: 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예를 들어 VEGF 뿐만 아니라 그에 대한 수용체; 조직 인자 (TF); 종양 괴사 인자 (TNF), 예를 들어 TNF-알파 또는 TNF-베타, 알파 인터페론 (알파-IFN); 인터루킨, 예를 들어 IL-8; IgE; 혈액군 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등이 포함된다.

[0239] 임의로 기타 분자와 접합된 가용성 항원 또는 그의 단편을, 항체를 생성하기 위한 면역원으로서 사용할 수 있다. 막관통 분자, 예를 들어 수용체의 경우에는, 이들의 단편 (예: 수용체의 세포외 도메인)을 면역원으로서 사용할 수 있다. 또 다른 한편, 이러한 막관통 분자를 발현하는 세포를 면역원으로서 사용할 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예: 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막관통 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환시킨 세포일 수 있다. 항체를 제조하는데 유용한 기타 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0240] HER2 항체를 생성시키는 경우에는, 이를 생성시키기 위해 사용될 HER2 항원이, 예를 들어 목적하는 에피토프를 함유하는, HER2의 세포외 도메인의 가용성 형태 또는 그의 일부일 수 있다. 또 다른 한편, 그의 세포 표면에서 HER2를 발현하는 세포 [예를 들어, HER2를 과발현하도록 형질전환시킨 NIH-3T3 세포; 또는 암종 세포주, 예를 들어 SK-BR-3 세포; 참고: Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)]를 사용하여 항체를 생성시킬 수 있다.

[0241] (ii) 모노클로날 항체

[0242] 모노클로날 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가, 모노클로날 항체 생성 동안에 유발될 수도 있는 가능한 변이체를 제외하고는 동일하고/하거나 동일한 에피토프와 결합하는 집단으로부터 수득한다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 형질이 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것을 표시 한다.

[0243] 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [참고: Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]에 의해 제조할 수 있다.

[0244] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적당한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터를 상기 언급된 바와 같이 면역시켜, 면역을 위해 사용된 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 생성시키거나 생성시킬 수 있는 램프구를 유도시킨다. 또 다른 한편, 램프구를 시험관 내에서 면역시킬 수 있다. 이어서, 적합한 융합제, 예를 들어 폴리 에틸렌 글리콜을 사용하여, 램프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 [참고: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].

[0245] 이로써 제조된 하이브리도마 세포를 시딩하고, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장을 억제하는 한 가지 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우에는, 하이브리도마에 대한 배양 배지가 전형적으로, HGPRT-결핍성 세포의 성장을 방지시키는 물질인 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이다.

[0246] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합시켜 주고, 선별된 항체 생산 세포에 의한 안정한 고수준의 항체 생성을 뒷받침해주며, HAT 배지 등의 배지에 민감한 세포이다. 이를 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들어 공급처 [Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA]로부터 입수 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것; 및 공급처 [American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA]로부터 입수 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종-골수종 세포주 또한, 인간 모노클로날 항체를 생산하는 것으로 보고되었다 [참고: Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

[0247] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 대상으로 하여, 항원에 대항하여 유도된 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역 침전법, 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들어 방사성 면역검정 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0248] 모노클로날 항체의 결합 친화성은, 예를 들어 문헌 [참고: Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)]

의 스캐챠드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.

[0249] 목적하는 특이성, 친화성, 및/또는 활성의 항체를 생성시키는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 과정에 의해 클론을 아클로닝시킨 다음, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 [참고: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. 이러한 목적에 적합한 배양 배지에는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물 중에서 복수 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.

[0250] 상기 아클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를, 통상적인 항체 정제 과정, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 갤 전기영동, 투석 또는 친화 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수 또는 혈청으로부터 적합하게 격리시킨다.

[0251] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 과정 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함)을 사용하여 용이하게 분리 및 서열 분석한다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 제공된다. 일단 분리되면, DNA를 발현 벡터 내로 위치시킨 다음, 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포 (이들은 항체 단백질을 생산하지 않는다) 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 획득할 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA를 세균 내에서 재조합 발현시키는 것에 관한 고찰 문헌에는 다음 문헌이 포함된다 [참고: Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992)].

[0252] 추가의 양태에서는, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [참고: McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 생성된 항체 파아지 라이브러리로부터 분리시킬 수 있다. 문헌 [참고: Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에는 파아지 라이브러리를 사용하여 뮤린 및 인간 항체를 각각 분리시키는 방법이 기재되어 있다. 후속 공개 문헌에는 매우 큰 파아지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합 [참고: Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)] 뿐만 아니라 연쇄 셀플링 [참고: Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)]에 의해 고 친화성 (nM 범위) 인간 항체를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 따라서, 이들 기술은 모노클로날 항체를 분리시키기 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행 가능한 대체 방안이다.

[0253] DNA는, 예를 들어, 상동성 뮤린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 코딩 서열로 치환시키거나 [참고: 미국 특허 제4,816,567호; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)], 또는 면역글로불린 코딩 서열에 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수도 있다.

[0254] 전형적으로, 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드를 항체의 불변 도메인 대신 사용하거나, 또는 항체의 하나의 항원 결합 부위의 가변 도메인 대신 사용하여, 항원에 대한 특이성을 지닌 하나의 항원 결합 부위와, 상이한 항원에 대한 특이성을 지닌 또 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 창출시킨다.

(iii) 인간화 항체

[0255] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법이 당해 분야에 보고되었다. 바람직하게는, 인간화 항체가 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입 (import)" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 본질적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써, 다음 문헌의 방법에 따라서 수행할 수 있다 [참고: Winter and co-workers (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988))]. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 본래의 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 키메라 항체 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]이다. 실제적으로, 인간화 항체는 전형적으로, 몇몇 초가변 영역 잔기와 가능하게는 몇몇 FR 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다.

[0257] 인간화 항체를 제조하는데 사용될, 중쇄 및 경쇄의 인간 가변 도메인의 선택이 항원성을 저하시키는데 있어 매우 중요하다. 소위 "최량 적합 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 이때, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 골격 영역 (FR)으로서 허용한다 [참고: Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296

(1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 골격 영역을 이용한다. 동일한 골격을 여러 개의 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 [참고: Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)].

[0258] 항원에 대한 고 친화성과 기타 바람직한 생물학적 특성을 유지하고 있는 항체로 인간화시키는 것이 추가로 중요하다. 이를 달성하기 위한 바람직한 양태에 따르면, 모 서열과 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열과 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 면역글로불린 모델은 시판되고 있으며, 당업자에게 널리 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 추정상의 3차원적 입체 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있는데, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원과 결합할 수 있는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별하고, 이를 수용자로부터 유입 서열과 합하여, 목적하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화성 증가를 달성하도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 있어 직접적이면서도 가장 실재적으로 관여한다.

[0259] WO 01/00245에는 HER2와 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단시키는, 예시되는 인간화 HER2 항체의 생성 방법이 기재되어 있다. 본원에서 특히 관심있는 인간화 항체는 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)와 본질적으로 동일한 정도로 효과적으로 MAPK의 EGF, TGF- α 및/또는 HRG 매개된 활성화를 차단시키고/시키거나 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)와 본질적으로 동일한 정도로 효과적으로 HER2와 결합한다. 본원에서의 인간화 항체는, 예를 들어 인간 가변 중쇄 도메인 내로 혼입된 비-인간 초가변 영역 잔기를 포함하고, 문헌 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제시된 가변 도메인 넘버링 시스템을 활용하여 69H, 71H 및 73H로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에서 골격 영역 (FR) 치환을 추가로 포함할 수 있다. 한 양태에서는, 상기 인간화 항체가 69H, 71H 및 73H 위치들 중의 2개 또는 모든 위치에서 FR 치환을 포함한다.

[0260] 본원에서 관심있는 것으로 예시되는 인간화 항체는 가변 중쇄 도메인 상보성 결정 잔기 GFTFTDYTMX [여기서, X는 바람직하게 D 또는 S이다] (서열 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (서열 8); 및/또는 NLGPSFYFDY (서열 9)를 포함하는데, 이는 이들 CDR 잔기의 아미노산 변형을 추가로 포함하고, 예를 들어 이러한 변형은 항체의 친화성을 본질적으로 유지시키거나 개선시켜 준다. 예를 들어, 관심있는 항체 변이체는 상기 가변 중쇄 CDR 잔기 내에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개 아미노산 치환을 나타낼 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 다음에 기재되는 바와 같은 친화성 성숙에 의해 제조할 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 4 중의 가변 중쇄 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0261] 인간화 항체는, 예를 들어 앞서 단락의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에도, 가변 경쇄 도메인 상보성 결정 잔기 KASQDV SIGVA (서열 10); SASYXXX [여기서, 위치 5에서의 X는 바람직하게 R 또는 L이고, 위치 6에서의 X는 바람직하게 Y 또는 E이며, 위치 7에서의 X는 바람직하게 T 또는 S이다] (서열 11); 및/또는 QQYYIYPYT (서열 12)를 포함할 수 있다. 이러한 인간화 항체는 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 임의로 포함하는데, 예를 들어 이러한 변형은 항체의 친화성을 본질적으로 유지시키거나 개선시켜 준다. 예를 들어, 관심있는 항체 변이체는 상기 가변 경쇄 CDR 잔기 내에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개 아미노산 치환을 나타낼 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 다음에 기재되는 바와 같은 친화성 성숙에 의해 제조할 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 3 중의 가변 경쇄 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0262] 본 발명은 또한, HER2와 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단시키는 친화성 성숙된 항체를 고려한다. 모 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체, 예를 들어 서열 3 및 4 각각의 가변 경쇄 및/또는 중쇄 서열을 포함하는 것 (즉, 변이체 574)일 수 있다. 친화성 성숙된 항체는 바람직하게, 뮤린 2C4 또는 변이체 574보다 탁월한 친화도로 HER2 수용체와 결합한다 [예를 들어, HER2-세포의 도메인 (EDC) ELISA를 사용하여 평가한 바와 같이, 친화도가 약 2배 또는 약 4배 내지 약 100배 또는 약 1000배 정도 개선되었다]. 치환하기 위해 예시되는 가변 중쇄 CDR 잔기에는 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 또는 이들 잔기의 2개 이상 (예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개)의 조합물이 포함된다. 변경시키기 위해 예시되는 가변 경쇄 CDR 잔기에는 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97, 또는 이들 잔기의 2개 이상 (예를 들어, 2개 내지 3개, 4개, 5개 또는 약 10개 이하)의 조합물이 포함된다.

[0263] 각종 형태의 인간화 항체 또는 친화성 성숙된 항체가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 친화성 성숙된 항체는 면역접합체를 생성시키기 위해 하나 이상의 세포독성제(들)와 임의로 접합되는 항체 단편 (예: Fab)일 수 있다. 또 다른 한편, 인간화 항체 또는 친화성 성숙된 항체는 전장의 항체, 예를 들어 전장의 IgG1 항체일 수 있다.

[0264] (iv) 인간 항체

[0265] 인간화에 대한 대체 방안으로서, 인간 항체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 면역시 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 완전한 레퍼토리의 인간 항체를 생성시킬 수 있는 트랜스제닉 동물 (예: 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포계 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동형접합성 결실로 인해, 내인성 항체 생성이 완전히 억제되는 것으로 보고되었다. 이러한 생식세포계 돌연변이체 마우스에서 인간 생식세포계 면역글로불린 유전자 어레이를 전이시키면, 항원 챌린지시 인간 항체가 생성될 것이다 [참고: 예를 들어, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Brugermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); 및 미국 특허 제5,591,669호, 제5,589,369호 및 제5,545,807호].

[0266] 또 다른 한편, 파아지 디스플레이 기술 [참고: McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990)]을 사용하여, 면역시키지 않은 공여자로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관 내에서 생성시킬 수 있다. 이러한 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자를 필라멘트상 박테리오파아지, 예를 들면, M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 외피 단백질 유전자 내로 동일 프레임 내에서 클로닝시키고, 파아지 입자 표면 상에서 기능적 항체 단편으로서 디스플레이한다. 필라멘트상 입자는 파아지 게놈의 단일 가닥 DNA 카페를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기준으로 하여 선별하게 되면, 이들 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자를 선별할 수 있다. 따라서, 파아지는 B 세포의 특성을 중의 몇 가지 특성을 모방한다. 파아지 디스플레이는 각종 포맷으로 수행할 수 있으며, 이들에 대한 고찰은, 예를 들어 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993)]. V-유전자 절편의 몇 가지 공급원을 파아지 디스플레이를 위해 사용할 수 있다. 문헌 [참고: Clackson et al., *Nature*, 352 : 624-628 (1991)]에서는 면역시킨 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항육사졸론 항체의 다양한 어레이를 분리하였다. 면역시키지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자 레퍼토리를 구축할 수 있고, 다양한 항원 (자가 항원 포함) 어레이에 대한 항체는 본질적으로, 문헌 [참고: Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), or Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라서 분리시킬 수 있다 [또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호 참고].

[0267] 상기 논의된 바와 같이, 인간 항체는 시험관내 활성화 B 세포에 의해 생성시킬 수도 있다 [참고: 미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호].

[0268] 인간 HER2 항체가 미국 특허 제5,772,997호 (1998년 6월 30일자로 협여됨) 및 WO 97/00271 (1997년 1월 3일자로 공개됨)에 기재되어 있다.

[0269] (v) 항체 단편

[0270] 항체 단편을 생성시키기 위한 각종 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 전장의 항체를 단백질 분해적 절단시킴으로써 유도되었다 [참고: 예를 들어, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]. 그러나, 이들 단편은 현재, 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파아지 라이브러리로부터 분리할 수 있다. 또 다른 한편, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 이를 화학적으로 커플링시켜 $F(ab')_2$ 단편을 형성시킬 수 있다 [참고: Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)]. 또 다른 접근법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 분리시킬 수 있다. 항체 단편을 생성시키기 위한 기타 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 기타 양태에서는 선택되는 항체가 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다 [참조: WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호]. 항체 단편은 예를 들어, 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일-특이적 또는 이중-특이적일 수 있다.

[0271] (vi) 이중-특이적 항체

[0272]

이중-특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 지닌 항체이다. 예시되는 이중-특이적 항체는 HER2 단백질의 2개의 상이한 에피토프와 결합할 수 있다. 이러한 기타 항체는 HER2 결합 부위를 EGFR, HER3 및/또는 HER4에 대한 결합 부위(들)와 합할 수 있다. 또 다른 한편, HER2 암 (arm)은 HER2-발현성 세포에 대한 세포성 방어 기전에 집중하도록, 백혈구 상의 촉발성 분자, 예를 들어 T-세포 수용체 분자 (예: CD2 또는 CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체 ($Fc\gamma R$), 예를 들어 $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) 및 $Fc\gamma RIII$ (CD16)과 결합하는 암과 합할 수 있다. 이중-특이적 항체를 사용하여 세포독성제를, HER2를 발현하는 세포에 국재시킬 수도 있다. 이들 항체는 HER2-결합성 암과, 세포독성제 (예: 사포린, 항인터페론- α , 빈카 알카로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)과 결합하는 암을 보유하고 있다. 이중-특이적 항체는 전장의 항체 또는 항체 단편 (예: $F(ab') 이중-특이적 항체)로서 제조할 수 있다.$

[0273]

WO 96/16673에는 이중-특이적 HER2/ $Fc\gamma RIII$ 항체가 기재되어 있고, 미국 특허 제5,837,234호에는 이중-특이적 HER2/ $Fc\gamma RI$ 항체 IDM1 (Osidem)가 기재되어 있다. 이중-특이적 HER2/ $Fc\alpha$ 항체가 WO 98/02463에 제시된다. 미국 특허 제5,821,337호는 이중-특이적 HER2/항-CD3 항체를 교시하고 있다. MDX-210은 이중-특이적 HER2- $Fc\gamma RIII Ab$ 이다.

[0274]

이중-특이적 항체의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 전장의 이중-특이적 항체의 전통적인 생성 방법은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 동시에 발현시키는 것에 기초하는데, 상기 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 [참고: Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 [쿠아드로마 (quadromas)]는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성시키는데, 이들 중에서 1개 만이 정확한 이중-특이적 구조를 갖는다. 친화 크로마토그래피 단계에 의해 통상 수행되는, 상기 정확한 분자의 정체는 다소 성가시고, 생성물 수율도 낮다. 유사한 과정이 문헌 [참고: WO 93/08829, 및 Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다.

[0275]

상이한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 지닌 항체 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합시킨다. 이러한 융합은 바람직하게는, 헌지, CH2, 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는, 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과 이루어진다. 융합물 중의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요로 하는 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물과, 경우에 따라 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동 형질감염시킨다. 이는 구축에 사용된 3가지 폴리펩티드 쇄의 불균등한 비율이 최적의 수율을 제공해주는 경우의 양태에서, 3가지 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 융통성을 제공해준다. 그러나, 2가지 이상의 폴리펩티드 쇄를 동등한 비율로 발현시키는 것이 고 수율을 가져다 주거나, 또는 이들 비율이 특별한 의미를 갖지 않은 경우에, 2가지 또는 3가지 모두의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터에 삽입하는 것이 가능하다.

[0276]

상기 접근법의 바람직한 양태에서는, 이중-특이적 항체가 하나의 암 중에 제1의 결합 특이성을 지닌 하이브리드 면역글로불린 중쇄와, 다른 암 중에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2의 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이러한 비대칭 구조가 목적하는 이중-특이적 화합물을 불필요한 면역글로불린 쇄 조합물로부터 격리시키는 것을 촉진시켜 주는데, 이는 이중-특이적 분자의 단지 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 격리 방식을 제공해주기 때문인 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 기재되어 있다. 이중-특이적 항체를 생성시키기 위한 추가의 내역에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)]을 참고할 수 있다.

[0277]

미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 간의 계면을 공학적으로 처리하여, 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종-이량체의 비율 (%)을 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서는, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예: 티로신 또는 트립토판)으로 대체시킨다. 큰 측쇄와 동일하거나 유사한 크기의 대상성 "강 (cavity)"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예: 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체시킴으로써 제2 항체 분자의 계면 상에서 창출시킨다. 이는 기타 불필요한 최종 생성물, 예를 들어 동종-이량체에 비해 이종-이량체의 수율을 증가시켜 주는 기전을 제공한다.

[0278]

이중-특이적 항체에는 가교결합되거나 "이종-접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종-접합체 내의 항체들 중의 하나를 아비딘에 커플링시킬 수 있고, 다른 것은 바이오틴에 커플링시킬 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 면역계 세포를 불필요한 세포에 표적화하고 [참고: 미국 특허 제4,676,980호], HIV 감염을 치료하는 것으로 제안되었다 [참조: WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089]. 이종-접합체 항체는 편리한 모든 가교결합

방법을 사용하여 만들 수 있다. 적합한 가교결합제는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 수 많은 가교결합 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 기재되어 있다.

[0279] 항체 단편으로부터 이중-특이적 항체를 생성시키는 기술 또한 당해 분야의 문헌에 보고되었다. 예를 들어, 이중-특이적 항체는 화학적 연쇄를 이용하여 제조할 수 있다. 문헌 [참고: Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]에는 전장의 항체를 단백질 분해적으로 절단시켜 $F(ab')_2$ 단편을 생성시키는 과정이 기재되어 있다. 이들 단편은 디티올 치화제 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜 인접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디설파이드 형성을 방지시킨다. 이어서, 이로써 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 다음, Fab'-TNB 유도체들 중의 하나를 머캅토에틸아민으로 환원시킴으로써 Fab'-티올로 재전환시키고, 이를 등물 량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중-특이적 항체를 형성시킨다. 이로써 생성된 이중-특이적 항체를, 효소를 선택적으로 고정화시키기 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0280] 최근 기술상의 진보로 인해, 이. 콜라이로부터 Fab'-SH 단편을 직접적으로 회수하는 것이 촉진되었는데, 이들 단편을 화학적으로 커플링하여 이중-특이적 항체를 형성시킬 수 있다. 문헌 [참고: Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중-특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생성 방법이 기재되어 있다. 각 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 별개로 분비시키고, 이를 대상으로 하여 시험관 내에서 직접적인 화학적 커플링을 수행하여 이중-특이적 항체를 형성시켰다. 이로써 형성된 이중-특이적 항체는 인간 유방 종양 표적에 대항한 인간 세포독성 림프구의 용균 활성을 촉발시킬 뿐만 아니라 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포와 결합할 수 있었다. 재조합 세포 배양물로부터 이중-특이적 항체 단편을 직접적으로 제조 및 분리하기 위한 각종 기술이 또한 보고되었다. 예를 들어, 루이신 지퍼를 사용하여 이중-특이적 항체를 생성시켰다 [참고: Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 루이신 지퍼 웹티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종-이량체를 헌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성시킨 다음, 재산화시켜 항체 이종-이량체를 형성시켰다. 이러한 방법은 항체 동종-이량체를 생성시키기 위해 활용할 수도 있다. 문헌 [참고: Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아보디" 기술은 이중-특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대체 기전을 제공하였다. 이러한 단편은 동일한 쇄 상에서 두 도메인 간에 쌍을 형성시키기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 도메인을 또 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 형성시킴으로써, 2개의 항원-결합 부위를 형성시킨다. 단일 쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용함으로써 이중-특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다 [참고: Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)].

[0281] 2 원자가 이상을 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중 특이적 항체를 제조할 수 있다 [참고: Tutt et al. *J. Immunol.*, 147: 60 (1991)].

[0282] (vii) 기타 아미노산 서열 변형

[0283] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 돌연변이체 및 각종 이소형이, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 요망될 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적당한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내로 도입하거나 또는 웹티드 합성에 의해 제조한다. 이러한 변형에는, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환이 포함된다. 최종 구조물에 도달하기 위해 어떠한 결실, 삽입 및 치환 조합도 가능한데, 단 이러한 최종 구조물은 목적하는 특징을 보유해야 한다. 아미노산 변화는 항체의 해독 후 프로세스를 변경시킬 수도 있는데, 예를 들어 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.

[0284] 돌연변이 유발을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는데 유용한 방법은 문헌 [참고: Cunningham and Wells *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 소위 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"인데, 여기서는 특정 잔기, 또는 표적 잔기 군을 확인하고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu 등의 전하를 띤 잔기), 이를 중성 또는 음전하를 띤 아미노산 (가장 바람직하게는, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체 시켜, 상기 아미노산과 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이어서, 이러한 치환물에 대한 기능적 민감도를 입증하는 아미노산 위치는 치환 부위에 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되긴 하였지만, 돌연변이 자체의 특성이 예정될 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 변이체를 대상으로 하여 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0285] 아미노산 서열 삽입물에는 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물 뿐만 아니라 1개 잔기에서부터 수 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이의 아미노- 및/또는 카복실-말단 용합물이 포함된다. 말단 삽입물의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 수반한 항체, 또는 세포독성 폴리펩티드와 용합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 기타 삽입형 변이체에는 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 용합물 (예를 들어, ADEPT), 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 용합물이 포함된다.

[0286] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환형 변이체이다. 이들 변이체에서는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 상이한 잔기로 대체시켰다. 치환형 돌연변이 유발을 위한 가장 관심 있는 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 또는 Fc 영역 변경물도 또한 고려된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환물"이란 표제 하에 표 1에 나타나 있다. 이러한 치환으로 인해 생물학적 활성 상의 변화가 이루어진다면, 표 1에서 "예시 치환물"로 명명되거나 아미노산 부류와 관련하여 다음에 추가로 기재되는 바와 같은 보다 실재적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 1

본래의 잔기	예시 치환물	바람직한 치환물
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르루이신	Leu
Leu (L)	노르루이신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르루이신	Leu

[0287]

[0288] 항체의 생물학적 특성 면에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조를, 예를 들어 시트 또는 나선 입체 형태로서 유지시키는 데에 대한 그의 효과, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지시키는 데에 대한 그의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 데에 대한 그의 효과 측면에서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 아미노산은 그들의 측쇄 특성 면에서의 유사성에 따라서 분류될 수 있다 [참고: A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]:

[0289]

(1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0290]

(2) 전하를 띠지 않은 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

- [0291] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)
- [0292] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)
- [0293] 또 다른 한편, 천연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 나눌 수 있다:
- [0294] (1) 소수성: 노르루이신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0295] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0296] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0297] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0298] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [0299] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0300] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류의 구성원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다.
- [0301] 항체의 적당한 입체 형태를 유지하는데 관여하지 않는 시스테인 잔기는 일반적으로 세린으로 치환시켜 분자의 산화적 안정성을 개선시키고 이상한 가교결합을 방지할 수도 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합(들)을 항체에 가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편 등의 항체 단편인 경우).
- [0302] 특히 바람직한 유형의 치환형 변이체는 모 항체 (예: 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 이로써 생성된 추가의 개발을 위해 선택된 변이체(들)는, 이들을 생성시킨 모 항체와 비교해서 개선된 생물학적 특성을 지닐 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성시키기 위한 편리한 방식은 파아지 디스플레이를 이용하는 친화성 성숙 방법을 포함한다. 간략하게 언급하면, 몇 가지 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환물을 생성시킨다. 이로써 생성된 항체 변이체를, 각 입자 내에 폐키지된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 필라멘트상 파아지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이한다. 이어서, 이와 같이 파아지-디스플레이된 변이체를 대상으로 하여, 본원에 기재된 바와 같은 그들의 생물학적 활성 (예: 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형시키기 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행하여 항원 결합성에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 그의 항원 간의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이와 이웃하는 잔기는 본원에서 상세히 설명된 기술에 따라서 치환시키기 위한 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 대상으로 하여 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 지닌 항체를 추가 개발을 위해 선별할 수 있다.
- [0303] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 천연의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경시킨다는 것은 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 부분을 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.
- [0304] 항체의 글리코실화는 전형적으로, N-연결 또는 O-연결된다. N-연결된 이란 탄수화물 부분을 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시킨 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이다)은 탄수화물 부분을 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 어느 하나가 폴리펩티드에 존재하는 것은 잠재적 글리코실화 부위를 창출시켜 준다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈اكت오사이민, 갈اكت오스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시 아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.
- [0305] 글리코실화 부위를 항체에 부가하는 것은 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우에는) 상기 언급된 트리펩티드 서열 중의 하나 이상을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수행된다. 이러한 변경은 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 천연의 항체 서열에 부가하거나, 또는 이들 잔기에 의해 치환시킴으로써 만들 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [0306] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에는, 이에 부착된 탄수화물을 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙한 탄수화물 구조를 지닌 항체가 문헌 [참고: US 2003/0157108 A1 (Presta, L.)]에 기재되어 있다 [또한, US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)을 참고할 수 있다]. 항체의

Fc 영역에 부착된 탄수화물 내에 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 다음 문헌에 인용되었다 [참고: WO 03/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 제6,602,684호 (Umana et al.)]. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 문헌 [참고: WO97/30087 (Patel et al.)]에 보고되었다. 그의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 수반한 항체에 관해서 다음 문헌을 또한 참고할 수 있다 [참고: WO98/58964 (Raju, S.) 및 WO99/22764 (Raju, S.)]. Fc 영역에 부착된 상기 탄수화물 구조를 갖는 주요 종 항체를 포함하는 항체 조성물이 본원에 고려된다.

[0307] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 제조한다. 이들 방법에는 천연 공급원으로부터의 분리 방법 (천연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 항체의 비-변이체 버전을 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위-지시된) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발시킴으로써 제조하는 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0308] (viii) 목적하는 특성을 지닌 항체의 스크리닝

[0309] 항체를 생성시키는 기술이 상기 언급되었다. 경우에 따라, 특정의 생물학적 특징을 지닌 항체를 추가로 선별할 수 있다.

[0310] HER 수용체의 리간드 활성화를 차단시키는 항체를 확인하기 위해, (예를 들어, 관심있는 HER 수용체와 HER 이종-올리고머를 형성하는 또 다른 HER 수용체와 접합하여) HER 수용체를 발현하는 세포에 대한 HER 리간드 결합을 차단시킬 수 있는 항체의 능력을 결정할 수 있다. 예를 들어, HER 이종-올리고머의 HER 수용체를 천연적으로 발현하거나, 이를 발현하도록 형질전환시킨 세포를 항체와 함께 항온 배양한 다음, 표지된 HER 리간드에 노출시킬 수 있다. 이어서, HER 이종-올리고머에서 HER 수용체에 대한 리간드 결합을 차단시킬 수 있는 HER2 항체의 능력을 평가할 수 있다.

[0311] 예를 들어, HER2 항체에 의한, MCF7 유방 종양 세포주에 대한 HRG 결합 억제는 WO 01/00245에 본질적으로 기재된 바와 같은 24-웰-판 포맷으로 열음 상의 단층 MCF7 배양을 이용하여 수행할 수 있다. HER2 모노클로날 항체를 각 웰에 가하고 30분 동안 항온 배양할 수 있다. 이어서, ¹²⁵I-표지시킨 rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ (25 pm)을 가하고, 4 내지 16시간 동안 항온 배양을 지속할 수 있다. 용량 반응 곡선을 제조할 수 있고, 관심있는 항체에 대한 IC₅₀ 값을 계산할 수 있다. 한 양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단시키는 항체는 본 검정에서 MCF7 세포에 대한 HRG 결합을 억제시키는 것에 대한 IC₅₀이 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하일 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편인 경우, 본 검정에서 MCF7 세포에 대한 HRG 결합을 억제시키는 것에 대한 IC₅₀이, 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0312] 또 다른 한편, 또는 부가적으로, HER 이종-올리고머에 존재하는 HER 수용체의 HER 리간드-자극된 티로신 인산화를 차단시킬 수 있는 HER2 항체의 능력을 평가할 수 있다. 예를 들어, HER 수용체를 내적으로 발현하거나 또는 이러한 수용체를 발현하도록 형질감염시킨 세포를 상기 항체와 함께 항온 배양한 다음, 항-포스포티로신 모노클로날 항체 (이는 탐지 가능한 표지와 임의로 접합된다)를 사용하여 HER 리간드-의존성 티로신 인산화 활성에 대해 검정할 수 있다. 미국 특허 제5,766,863호에 기재된 키나제 수용체 활성화 검정이 또한, HER 수용체 활성화를 결정하고 항체에 의해 이러한 활성을 차단시키는데 이용 가능하다.

[0313] 한 양태에서는, 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같이 MCF7 세포에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, MCF7 세포를 24-웰 판에 도말할 수 있고, HER2에 대한 모노클로날 항체를 각 웰에 가할 수 있으며, 실온에서 30분 동안 항온 배양한 다음; rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄를 각 웰에 가하여 0.2 nM의 최종 농도로 만들 수 있고, 항온 배양을 8분 동안 지속시킬 수 있다. 배지를 각 웰로부터 흡인 시킬 수 있고, 100 μ l의 SDS 샘플 완충액 (5% SDS, 25 mM DTT, 및 25 mM 트리스-HCl, pH 6.8)을 부가함으로써 반응을 중지시킬 수 있다. 각 샘플 (25 μ l)을 4 내지 12% 구배 겔 (공급처: Novex) 상에서 전기영동시킨 다음, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막으로 전기영동적으로 전이시킬 수 있다. 항-포스포티로신 (1 μ g/ml) 면역블롯을 전개할 수 있고, M_r 대략 180,000에서 우세한 반응성 밴드 세기를 반사도 밀도측정에 의해 정량화할 수 있다. 선별된 항체는 바람직하게, p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 본 검정에서 대조군의 약 0 내지 35% 정도까지 상당히 억제할 것이다. 반사도 밀도측정에 의해 결정된 바와 같은, p180 티로신 인산화의 HRG 자극 억제에 대한 용량-반응 곡선을 만들 수 있고, 관심있는 항체에 대한 IC₅₀을 계산할 수 있다. 한 양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단시키는 항체는 본 검정에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제시키는 것에 대한 IC₅₀이

약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하일 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편인 경우, 본 검정에서 p180 티로신 인산화의 HRG 결합을 억제시키는 것에 대한 IC₅₀이, 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0314] 예를 들어, 다음 문헌에 본질적으로 기재된 바와 같은, MDA-MB-175 세포에 대한 항체의 성장 억제 효과를 평가할 수도 있다 [참고: Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]. 이러한 검정에 따라서, MDA-MB-175 세포를 4일 동안 HER2 모노클로날 항체 (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$)로 처리하고, 크리스털 바이올렛으로 염색시킬 수 있다. HER2 항체와 함께 항온 배양하면, 모노클로날 항체 2C4에 의해 디스플레이된 바와 유사한, 상기 세포주에 대한 성장 억제 효과가 나타날 수 있다. 추가 양태에서는, 외인성 HRG가 이러한 억제를 상당히 역전시키지 않을 것이다. 바람직하게는, 상기 항체가 외인성 HRG의 존재 및 부재하 둘 다에서, MDA-MB-175 세포의 세포 증식을 모노클로날 항체 4D5보다 더 큰 정도로 (및 임의로는, 모노클로날 항체 7F3보다 더 큰 정도로) 억제할 수 있을 것이다.

[0315] 한 양태에서, 관심있는 HER2 항체는 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 공동-면역침전 실험에서 측정된 바와 같이, MCF7 및 SK-BR-3 세포 둘 다에서 HER2과 HER3의 혜례콜린 의존성 연합을, 모노클로날 항체 4D5보다 실질적으로 더 효과적으로, 바람직하게는 모노클로날 항체 7F3보다 실질적으로 더 효과적으로 차단시킬 수 있다.

[0316] 성장 억제성 HER2 항체를 확인하기 위해, HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 항체에 대해 스크리닝 할 수 있다. 한 양태에서는, 선택된 성장 억제성 항체가 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도에서 세포 배양 중인 SK-BR-3 세포의 성장을 약 20 내지 100%, 바람직하게는 약 50 내지 100% 정도 억제할 수 있다. 이러한 항체를 확인하기 위해, 미국 특허 제5,677,171호에 기재된 바와 같은 SK-BR-3 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 따라서, SK-BR-3 세포를, 10% 태아 소 혈청, 글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신을 보충시킨 F12 배지와 DMEM 배지의 1:1 혼합물에서 성장시킨다. 상기 SK-BR-3 세포를 35 mm 세포 배양 디쉬에서 20,000개 세포로 도말하고 (2 $\text{mls}/35 \text{ mm}$ 디쉬), 디쉬당 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HER2 항체를 가한다. 6일 후, 전자 COULTER™ 세포계수기를 이용하여, 처리되지 않은 세포와 비교한 세포 수를 계수한다. SK-BR-3 세포의 성장을 약 20 내지 100% 또는 약 50 내지 100% 억제하는 항체를 성장 억제성 항체로서 선별할 수 있다. 성장 억제성 항체, 예를 들어 4D5 및 3E8를 스크리닝하기 위한 검정에 관한 미국 특허 제5,677,171호를 참고할 수 있다.

[0317] 세포소멸을 유도시키는 HER2 항체를 선별하기 위해, BT474 세포를 사용하는 아넥신-결합 검정을 이용할 수 있다. BT474 세포를 앞서 단락에서 논의된 바와 같이 디쉬에서 배양 및 시딩한다. 이어서, 배지를 꺼내고, 이를 신선한 배지 단독으로 대체시키거나 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모노클로날 항체를 함유하는 배지로 대체시킨다. 3일 동안 항온 배양한 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신 처리함으로써 박리시킨다. 그 다음, 상기 세포-사멸 검정에 대해 논의된 바와 같이, 세포를 원심분리시키고, Ca²⁺ 결합용 완충액에 재현탁시키고, 튜브 내로 등분한다. 이어서, 튜브에 표지시킨 아넥신 (예: 아넥신 V-FTIC) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 공급한다. FACSCAN™ 유동 세포계수기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (공급처: Becton Dickinson)를 사용하여 샘플을 분석할 수 있다. 대조군에 비해 통계상 유의적 수준의 아넥신 결합을 유도시키는 항체를 세포소멸 유도성 항체로서 선별한다. 아넥신 결합 검정 이외에도, BT474 세포를 사용하는 DNA 염색 검정을 이용할 수 있다. 이러한 검정을 수행하기 위해, 앞서 두 단락에서 기재된 바와 같은 관심있는 항체로 처리시킨 BT474 세포를 37°C에서 2시간 동안 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HOECHST 33342™과 함께 항온 배양한 다음, MODFIT LT™ 소프트웨어 (공급처: Verity Software House)를 사용하여 EPICS ELITE™ 유동 세포계수기 (공급처: Coulter Corporation) 상에서 분석하였다. 처리시키지 않은 세포 (세포소멸성 세포 100% 이하)보다 2배 이상 더 크게 (바람직하게는 3배 이상 더 크게) 세포소멸성 세포 비율 상의 변화를 유도시키는 항체를, 상기 검정을 이용하여 프로-세포소멸성 항체로서 선별할 수 있다. 세포소멸을 유도시키는 HER2 항체, 예를 들어 7C2 및 7F3를 스크리닝하는 검정에 관해서는 WO98/17797을 참고할 수 있다.

[0318] 관심있는 항체에 의해 결합된 HER2 상의 에피토프와 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [참고: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상적인 교차-차단성 검정을 수행하여, 상기 항체가 HER2에 대한 특정 항체, 예를 들어 2C4 또는 페르투주마브의 결합을 교차 차단시키는지를 평가할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 당해 분야에 공지된 방법에 의해 에피토프 지도화를 수행할 수 있고/있거나 HER2의 도메인(들)이 상기 항체에 의해 결합되는지를 알아보기 위해 항체-HER2 구조를 연구할 수 있다 [참고: Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].

[0319] (ix) 면역접합체

- [0320] 본 발명은 또한, 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 독소 [예: 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함)], 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.
- [0321] 이러한 면역접합체를 생성시키는데 유용한 화학요법제는 상기 언급되었다. 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 마이탄신 [참고: 미국 특허 제5,208,020호], 트리코텐 및 CC1065와의 접합체가 또한 본원에 고려된다.
- [0322] 본 발명의 한 가지 바람직한 양태에서는, 항체를 1개 이상의 마이탄신 분자와 접합시킨다 (예를 들어, 항체 분자당 약 1 내지 약 10개의 마이탄신 분자). 마이탄신은, 예를 들어 May-SS-Me로 전환시킬 수 있고, 이는 May-SH3로 환원시킬 수 있으며 변형된 항체와 반응시켜 [참고: Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992)] 마이탄시노이드-항체 면역접합체를 생성시킬 수 있다.
- [0323] 관심있는 또 다른 면역접합체는 1개 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 HER2 항체를 포함한다. 칼리케아미신 계열의 항생제는 이중 가닥 DNA 절단물을 피코몰 이하 농도로 생성시킬 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-아세틸- γ_1^1 , PSAG 및 Θ_1^1 이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 [참고: Hinman et al., *Cancer Research*, 53: 3336-3342 (1993), 및 Lode et al., *Cancer Research*, 58: 2925-2928 (1998)]. 또한, 본원에 참고로 도입된 미국 특허 제5,714,586호; 제5,712,374호; 제5,264,586호; 및 제5,773,001호를 참고할 수 있다.
- [0324] 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합성 활성 단편, 외독소 A 쇄 [슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨], 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신 (curcumin), 크로틴 (crotin), 사파오나리아 오피시날리스 (*Sapaponaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다 [참고: 예를 들어, WO 93/21232 (1993년 10월 28일자로 공개됨)].
- [0325] 본 발명은 추가로, 핵산분해 활성을 지닌 화합물 (예: 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase)과 항체 간에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.
- [0326] 각종 방사성 동위원소가 방사성접합된 HER2 항체 생성을 위해 이용 가능하다. 이의 예에는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다.
- [0327] 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로페오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미레이트 HC1), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소를 문헌 [참고: Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조 할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이, 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 퀼레이트제의 한 예이다 [참고: WO 94/11026]. 이러한 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시켜 주는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 웹 티다제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드 함유 링커 [참고: Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992)]를 사용할 수 있다.
- [0328] 또 다른 한편으로, HER2 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질을, 예를 들어 재조합 기술 또는 웹티드 합성에 의해 만들 수 있다.
- [0329] 또 다른 양태에서는, 항체를 중앙 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예: 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있는데, 이러한 항체-수용체 접합체를 대상체에게 투여한 다음, 제거제 (clearing agent)를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환시 제거하고, 이어서 세포독성제 (예: 방사성뉴클레오티드)와 접합되는 "리간드" (예: 아비딘)을 투여한다.

[0330] (x) 기타 항체 변형

[0331] 항체의 기타 변형이 본원에 고려된다. 예를 들어, 항체를 각종 비-단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중의 하나와 연결시킬 수 있다. 항체를, 예를 들어 액적형성 (coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐; 콜로이드상 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노-캡슐); 또는 매크로에멀션 내에 포착시킬 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [참고: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

[0332] 항체의 항원-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)를 증강시키도록 효과기 기능 측면에서 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 요망될 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환물을 도입함으로써 달성할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 시스테인 잔기를 Fc 영역 내로 도입함으로써, 이러한 영역 내에 쇄간 디설파이드 결합을 형성시킬 수 있다. 이로써 생성된 동종-이량체성 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개성 세포 사멸 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 지닐 수 있다 [참고: Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) 및 Shope, *B. J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)]. 항종양 활성이 증강된 동종-이량체성 항체는 다음 문헌에 기재된 바와 같이 이종-이관능성 가교 결합제를 사용하여 제조할 수도 있다 [참고: Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)]. 또 다른 한편, 이종 Fc 영역을 갖도록 항체를 공학적으로 처리함으로써, 증강된 보체 용해성과 ADCC 능력을 지니도록 할 수 있다 [참고: Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)].

[0333] WO 00/42072 (Presta, L.)에는 인간 효과기 세포의 존재 하에 개선된 ADCC 기능을 지닌 항체가 기재되어 있는데, 이러한 항체는 그의 Fc 영역에 아미노산 치환물을 포함한다. 바람직하게는, 개선된 ADCC를 수반한 항체가 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에 치환물을 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc 영역이, 이를 위치 중의 1개, 2개 또는 3개에서의 치환물을 포함하거나 이로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역이다.

[0334] 변경된 Clq 결합성 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 지닌 항체가 WO99/51642, 미국 특허 제6,194,551B1호, 제6,242,195B1호, 제6,528,624B1호 및 제6,538,124호 (Idusogie et al.)에 기재되어 있다. 이 항체는 그의 Fc 영역의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333, 및/또는 334 중의 하나 이상의 위치에 아미노산 치환물을 포함한다.

[0335] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이, 재이용 (salvage) 수용체 결합성 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편) 새로 혼입시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재이용 수용체 결합성 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는데 책임이 있는 IgG 분자 (예: IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다. 그의 Fc 영역에 치환물을 갖고 혈청 반감기가 증가된 항체가 또한 WO 00/42072 (Presta, L.)에 기재되어 있다.

[0336] 3개 이상 (바람직하게는, 4개)의 기능적 항원-결합 부위를 갖는, 공학적으로 처리시킨 항체가 또한 고려된다 [참고: US 2002/0004587 A1, Miller et al.].

[0337] 본원에 기재된 HER2 항체는 또한, 면역리포솜으로서 제형화할 수도 있다. 이러한 항체를 함유하는 리포솜은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 문헌 [참고: Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 WO97/38731 (1997년 10월 23일자로 공개됨)]에 기재된 방법에 의해 제조한다. 순환 시간이 증강된 리포솜이 미국 특허 제5,013,556호에 기재되어 있다.

[0338] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용하는 역상 증발 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 리포솜은 한정된 공극 크기의 필터를 통하여 압출시켜 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 디설파이드 쇄간 반응을 통하여 문헌 [참고: Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합시킬 수 있다. 화학요법제가 리포솜 내에 임의로 함유된다 [참고: Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484 (1989)].

[0339] (ix) 예시 항체

[0340] 본 발명에 따라서 제형화될 수 있는 항체의 예에는 다음이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다:

- [0341] 본원에 보다 상세히 기재된 바와 같은 항-ErbB 항체 (항-HER2 항체 포함);
- [0342] B-세포 표면 마커, 예를 들어 CD19, CD20과 결합하는 항체 [예를 들어, 리툭시마브 (Rituximab) (RITUXAN®) 및 인간화 2H7], CD22, CD40 또는 BR3과 결합하는 항체;
- [0343] IgE와 결합하는 항체, 예를 들어 오말리주마브 (Omalizumab) (XOLAIR®)) (공급처: Genentech), E26 (본원의 제 17A-B), HAE1 (본원의 17A-B), 그의 Fc 영역의 위치 265에서의 아미노산 치환을 수반한 IgE 항체 [참고: US 2004/0191244 A1], Hu-901 (본원의 17A-B), WO2004/070011에서와 같은 IgE 항체, 또는 이들 IgE 항체의 가변 도메인을 포함하는 항체 (항체 단편 및 전장의 항체 포함) [참고: Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993); 국제공개공보 WO 95/19181; 미국 특허 제5,714,338호 (1998년 2월 3일자로 허여됨); 미국 특허 제5,091,313호 (1992년 2월 25일자로 허여됨); WO 93/04173 (1993년 3월 4일자로 공개됨); WO 99/01556 (1999년 1월 14일자로 공개됨); 및 미국 특허 제5,714,338호];
- [0344] 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 또는 그의 수용체와 결합하는 항체, 예를 들어 베바시주마브 (AVASTIN™) [공급처: Genentech], 및 라니비주마브 (Ranibizumab) (LUCENTIS™);
- [0345] 항-IL-8 항체 [참고: St John et al., *Chest*, 103:932 (1993), 및 국제공개공보 WO 95/23865];
- [0346] 항-PSCA 항체 [참고: WO 01/40309];
- [0347] 항-CD40 항체, 예를 들어 S2C6 및 그의 인간화 변이체 [참고: WO 00/75348];
- [0348] 항-CD11a 항체, 예를 들어 에팔리주마브 (efalizumab) (RAPTIVA®)) [참고: 미국 특허 제5,622,700호, WO 98/23761, Steppe et al., *Transplant Int'l.* 4:3-7 (1991), 및 Hourmant et al., *Transplantation* 58:377-380 (1994)];
- [0349] 항-CD18 항체 [참고: 미국 특허 제5,622,700호 (1997년 4월 22일자로 허여됨), 또는 WO 97/26912 (1997년 7월 31일자로 공개됨)];
- [0350] 항-Apo-2 수용체 항체 [참고: WO 98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨)];
- [0351] 항-TNF-알파 항체, 예를 들어 cA2 (REMICADE®), CDP571 및 MAK-195 [참고: 미국 특허 제5,672,347호 (1997년 9월 30일자로 허여됨), Lorenz et al. *J. Immunol.* 156(4):1646-1653 (1996), 및 Dhainaut et al. *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995)];
- [0352] 항-조직 인자 (TF) [참고: 유럽 특허 제0 420 937 B1호 (1994년 11월 9일자로 허여됨);
- [0353] 항-인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린 [참고: WO 98/06248 (1998년 2월 19일자로 허여됨)];
- [0354] 항-EGFR 항체, 예를 들어 WO 96/40210 (1996년 12월 19일자로 공개됨)에서와 같은 키메라화 또는 인간화 225 항체;
- [0355] 항-CD3 항체, 예를 들어 OKT3 [참고: 미국 특허 제4,515,893호 (1985년 5월 7일자로 허여됨);
- [0356] 항-CD25 또는 항-tac 항체, 예를 들어 CHI-621 (SIMULECT®) 및 (ZENAPAX®)) [참고: 미국 특허 제5,693,762호 (1997년 12월 2일자로 허여됨)];
- [0357] 항-CD4 항체, 예를 들어 cM-7412 항체 [참고: Choy et al. *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)];
- [0358] 항-CD52 항체, 예를 들어 CAMPATH-IH [참고: Riechmann et al. *Nature* 332:323-337 (1988)];
- [0359] 항-Fc 수용체 항체, 예를 들어 Fc γ RI에 대항하여 유도된 M22 항체 [참고: Graziano et al. *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995)];
- [0360] 항-암배아성 항원 (CEA) 항체, 예를 들어 hMN-14 [참고: Sharkey et al. *Cancer Res.* 55 (23Suppl):5935s-5945s (1995)];

- [0361] 유방 상피 세포에 대항하여 유도된 항체 (huBrE-3, hu-Mc 3 및 CHL6 포함) [참고: Ceriani et al. *Cancer Res.* 55(23):5852s-5856s (1995); 및 Richman et al. *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5916s-5920s (1995)];
- [0362] 결장 암종 세포와 결합하는 항체, 예를 들어 C242 [참고: Litton et al. *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)];
- [0363] 항-CD38 항체, 예를 들어 AT 13/5 [참고: Ellis et al. *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)];
- [0364] 항-CD33 항체, 예를 들어 Hu M195 [참고: Jurcic et al. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)] 및 CMA-676 또는 CDP771;
- [0365] 항-CD22 항체, 예를 들어 LL2 또는 림포시드 (LymphoCide) [참고: Juweid et al. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)];
- [0366] 항-EpCAM 항체, 예를 들어 17-1A (PANOREX®);
- [0367] 항-GpIIb/IIIa 항체, 예를 들어 아브식시마브 (abciximab) 또는 c7E3 Fab (REOPRO®);
- [0368] 항-RSV 항체, 예를 들어 MEDI-493 (SYNAGIS®);
- [0369] 항-CMV 항체, 예를 들어 PROTOVTR® ;
- [0370] 항-HIV 항체, 예를 들어 PRO542;
- [0371] 항-간염 항체, 예를 들어 항-Hep B 항체 OSTAVIR® ;
- [0372] 항-CA 125 항체 OvaRex;
- [0373] 항-개체특이형 GD3 애피토프 항체 BEC2;
- [0374] 항- α v β 3 항체 VITAXIN® ;
- [0375] 항-인간 신 세포 암종 항체, 예를 들어 ch-G250; ING-1;
- [0376] 항-인간 17-1A 항체 (3622W94);
- [0377] 항-인간 결장직장 종양 항체 (A33);
- [0378] GD3 강글리오시드에 대항하여 유도된 항-인간 흑색종 항체 R24;
- [0379] 항-인간 편평 세포 암종 (SF-25); 및
- [0380] 항-인간 백혈구 항원 (HLA) 항체, 예를 들어 Smart ID10 및 항-HLA DR 항체 온콜림 (Oncolym) (Lym-1).
- [0381] (xi) 항체 변이체 조성물
- [0382] 본 발명은 적어도 한 국면에서, 주요 종 항체와 그의 하나 이상의 변이체의 혼합물을 포함하는 조성물을 포함하는 제형에 관한 것이다. 주요 종 항체가 HER2와 결합하는 경우, 바람직하게는 HER2 항체 (주요 종 HER2 항체 및 그의 항체 변이체 중의 어느 하나 또는 둘 다)가 HER2의 도메인 II와 결합하고/하거나, 트拉斯투주마브보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제시키고/시키거나 HER2의 이종-이량체성 결합 부위와 결합하는 것이다. 본원에서 주요 종 항체의 바람직한 양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 15 및 23 중에서 선택된 경쇄 아미노산 서열과, 서열 16 및 24 중에서 선택된 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것이다.

[0383]

한 양태에서는, 제형화된 HER2 항체 조성물이 주요 종 HER2 항체와, 아미노-말단 리더 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체의 혼합물을 포함한다. 바람직하게, 이러한 아미노-말단 리더 연장물은 항체 변이체의 경쇄 (예를 들어, 항체 변이체의 1개 또는 2개 경쇄) 상에 존재한다. 주요 종 HER2 항체 또는 항체 변이체는 전장의 항체 또는 항체 단편 (예: F(ab')₂ 단편의 Fab)일 수 있지만, 둘 다가 전장의 항체인 것이 바람직하다. 본원에서의 항체 변이체는 그의 경쇄 또는 경쇄 중의 어느 하나 이상 상에 아미노-말단 리더 연장물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 아미노-말단 리더 연장물이 항체의 1개 또는 2개 경쇄 상에 존재한다. 아미노-말단 리더 연장물은 바람직하게, VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다. 조성물 내에 아미노-말단 리더 연장물이 존재하는 것은 각종 분석 기술, 예를 들어 N-말단 서열 분석, 전하 불균일성에 대한 검정 (예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관대 전기영동), 질량 분광법 등에 의해 탐지할 수 있다. 조성물 중의 항체 변이체의 양은 일반적으로, 이러한 변이체를 탐지하기 위해 사용된 모든 검정 (바람직하게는 N-말단 서열 분석)의 탐지 한계치를 구성하는 양에서부터 주요 종 항체의 양보다 적은 양까지의 범위이다. 일반적으로, 조성물 중의 항체 분자의 약 20% 이하 (예를 들어, 약 1% 내지 약 15%, 예를 들면 약 5% 내지 약 15%)가 아미노-말단 리더 연장물을 포함한다. 이러한 % 양은 정량적 N-말단 서열 분석 또는 양이온 교환 분석 [바람직하게는, 고 해상, 약한 (weak) 양이온-교환 칼럼, 예를 들어 PROPAC WCX-10™ 양이온 교환 칼럼을 사용함]을 사용하여 결정하는 것이 바람직하다. 아미노-말단 리더 연장물 변이체 이외에도, 주요 종 항체 및/또는 변이체의 추가의 아미노산 서열 변형물이 고려되는데, 이에는 그의 1개 또는 둘 다의 경쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체, 탈아미드화 항체 변이체 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0384]

더우기, 주요 종 항체 또는 변이체는 글리코실화 변이물을 추가로 포함할 수 있는데, 그의 비-제한적 예에는 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 포함하는 HER2 항체, 그의 경쇄에 부착된 탄수화물 부분 (예를 들어, 항체의 1개 또는 2개 경쇄에 부착된 1개 또는 2개의 탄수화물 부분)을 포함하는 HER2 항체, 비-글리코실화 중쇄를 포함하는 HER2 항체가 포함된다.

[0385]

III. 제형의 제조

[0386]

본 발명은 제1 국면에서, pH 5.5 내지 6.5, 바람직하게는 pH 5.8 내지 6.2의 히스티딘-아세테이트 완충제 중에 모노클로날 항체, 바람직하게는 전장의 인간 또는 인간화 IgG1 항체를 포함하는 안정한 제약 제형을 제공한다. 그러나, 이러한 제형 중의 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편, 예를 들어 Fab 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다.

[0387]

또 다른 양태에서, 본 발명은 탈아미드화 또는 응집에 대해 감수성인 전장의 IgG1 항체 약 10 mg/mL 내지 약 250 mg/mL; pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제; 트레할로스 및 수크로스로 이루어진 군 중에서 선택된 당류 약 60 mM 내지 약 250 mM; 및 폴리소르베이트 20 약 0.01% 내지 약 0.1%를 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어진 제약 제형에 관한 것이다.

[0388]

추가의 양태에서, 본 발명은 pH 약 5.5 내지 약 6.5 하의 히스티딘 완충제, 당류 및 계면활성제 중의, HER2의 도메인 II과 결합하는 항체를 포함하는 제약 제형을 제공한다. 예를 들어, 이러한 제형은 페르투주마브 약 20 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 히스티딘-아세테이트 완충제, 수크로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함할 수 있는데, 이 제형의 pH는 약 5.5 내지 약 6.5이다.

[0389]

또 다른 국면에서, 본 발명은 pH 약 5.5 내지 약 6.5 하의 히스티딘 완충제, 당류 및 계면활성제 중의 DR5 항체를 포함하는 제약 제형을 제공한다. 이러한 제형은, 예를 들어 아포마브 약 10 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 히스티딘-아세테이트 완충제, 트레할로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함할 수 있는데, 이 제형의 pH는 약 5.5 내지 약 6.5이다.

[0390]

상기 제형은 상기 완충제가 그 내부에서 제형화된 항체의 탈아미드화 및/또는 응집 및/또는 단편화를 지연시킨다는 점에서, 탈아미드화 및/또는 응집 및/또는 단편화에 대해 감수성인 항체에 특히 유용하다. 또한, HCl을 사용하여 제조한 기타 히스티딘 완충제와는 달리, 히스티딘-아세테이트 완충제에는 클로라이드 이온이 결여되는 데, 이는 상기 완충제가 당류와 합한 경우에 항체에 대해 폴리소르베이트 20과 동일한 보호 효과를 나타내었고 스테인레스강 텅크 내에서의 저장시 안정하고 상용성이었다는 점에서 본원에 유리한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 탈아미드화 및/또는 응집 및/또는 단편화에 대해 감수성인 항체를 포함하는 제형 자체 외에도, 본 발명은 항체를 pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘-아세테이트 완충제에서 제형화하는 것을 포함하여, (예를 들어, 상이한 pH 또는 상이한 완충제 중의 조성물과 비교해서) 치료적 모노클로날 항체의 탈아미드화, 응집 및/또는 단편화를 저하시키는 방법을 제공한다. 이러한 양태에서는, 항체를 제형화시키기 전 및 후에 탈아미드화, 응집 및/또는 단편화

를 결정 또는 측정할 수 있는데, 이와 같이 제형화된 항체는 제형 중에 및 그의 저장시 허용 가능한 수준의 탈아미드화, 응집 및/또는 단편화를 나타내었다.

[0391] 상기 제형 중의 항체는 HER2, CD20, IgE, DR5, BR3 및 VEGF를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 항원과 결합할 수 있다.

[0392] 제형화된 항체가 HER2와 결합하는 경우, 이는 바람직하게, HER2의 도메인 II와 결합하고/하거나, 트라스투주마브보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제시키고/시키거나 HER2의 이종-이량체성 결합 부위와 결합하는 것이다. 본원에서 제형화된 HER2 항체의 바람직한 양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것이다 (페르투주마브).

[0393] 본원에서 제형화될 수 있는 CD20 항체의 예에는 현재 "리툭시마브" ("RITUXAN®

)로 불리우는 "C2B8" (공급처: Genentech) [참고: 미국 특허 제5,736,137호; 본원에 참고로 도입된다]; "Y2B8" 또는 "이브리투모마브 티وخ세탄 (Ibrutumomab Tiuxetan)" (ZEVALIN®

)로 명명된 이트롭-[90]-표지된 2B8 뮤린 항체 (공급처: Biogen-Idec) [참고: 미국 특허 제5,736,137호; 본원에 참고로 도입된다]; "131I-B1" 항체 [요오드 I131 토시투모마브 (tositumomab), BEXXAR™]를 생성시키기 위해 ¹³¹I로 임의로 표지시킨 뮤린 IgG2a "B1" (또한, "토시투모마브"로 불리우기도 한다) [참고: 미국 특허 제5,595,721호; 본원에 참고로 도입된다]; 뮤린 모노클로날 항체 "1F5" [참고: Press et al. *Blood* 69 (2): 584-591 (1987)] 및 그의 변이체 (이에는 "콜격 폐치되거나" 또는 인간화 1F5가 포함된다) [참고: WO 03/002607, Leung, S.; ATCC 기탁번호 HB-96450]; 뮤린 2H7 및 키메라 2H7 항체 [참고: Clark et al. *PNAS* 82:1766-1770 (1985); 미국 특허 제5,500,362호; 본원에 참고로 도입된다]; 인간화 2H7; huMax-CD20 [참고: WO 04/035607, Genmab, Denmark]; AME-133 (공급처: Applied Molecular Evolution); A20 항체 또는 그의 변이체, 예를 들어 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각 cA20, hA20) [참고: US 2003/0219433, Immunomedics]; 및 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 (공급처: International Leukocyte Typing Workshop) [참고: Valentine et al., In: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))]이 포함된다.

[0394] 제형화된 CD20 항체의 바람직한 양태에서는, CD20 항체가 인간화 2H7 항체이다. 본원에서 바람직한 인간화 2H7 항체는 2H7v16 및 2H7v511이다. 인간화 2H7v16은 도 18A-B의 가변 경쇄 서열과 가변 중쇄 서열 (서열 26 및 29)을 포함하는 본래의 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 인간화 2H7v16 항체가 전장의 항체인 경우, 이는 바람직하게, 서열 63 및 65를 수반한 경쇄 아미노산 서열 및 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0395] 항체가 VEGF와 결합하는 경우, 이는 바람직하게, 도 19에 도시된 바와 같은 가변 도메인 서열을 포함한다. 가장 바람직한 항-VEGF 항체는 전장의 인간화 IgG1 항체인 베바시주마브 (AVASTIN™) [공급처: Genentech]이다.

[0396] 제형화된 항체가 IgE와 결합하는 경우, 이는 바람직하게, E25, 오말리주마브 (XOLAIR®

) (공급처: Genentech) [참고: 도 17A-B], E26 (본원의 도 17A-B), HAE1 (본원의 17A-B), 그의 Fc 영역의 위치 265에서 아미노산 치환을 수반한 IgE 항체 [참고: US 2004/0191244 A1], Hu-901 (본원의 도 17A-B), WO2004/070011에서와 같은 IgE 항체, 또는 이를 IgE 항체의 가변 도메인을 포함하는 항체 (항체 단편 및 전장의 항체 포함)로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0397] 항체가 종양 과사 인자 (TNF) 초분자군 중의 수용체 또는 사멸 수용체와 결합하는 경우, 이는 바람직하게 DR5와 결합하고, 바람직하게는 아고니스트 항체이다. 이러한 분야의 공개 문헌에는 다음 문헌이 포함된다 [참고: Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997), Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997), WO98/51793 (1998년 11월 19일자로 공개됨); WO98/41629 (1998년 9월 24일자로 공개됨); Scream et al., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak et al., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu et al., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 (1998년 8월 20일자로 공개됨); EP870,827 (1998년 10월 14일자로 공개됨); WO98/46643 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO99/02653 (1999년 1월 21일자로 공개됨); WO99/09165 (1999년 2월 25일자로 공개됨); WO99/11791 (1999년 3월 11일자로 공개됨); US 2002/0072091 (2002년 8월 13일자로 공개됨); US 2002/0098550 (2001년 12월 7일자로 공개됨); US 6,313,269 (2001년 12월 6일자로 허여됨); US 2001/0010924 (2001년 8월 2일자로 공개됨); US 2003/01255540 (2003년 7월 3일자로 공개됨); US 2002/0160446 (2002년 10월 31일자로 공개됨); US 2002/0048785 (2002년 4월 25일자로 공개됨); US 6,342,369 (2002년 2월에 허여됨); US

6,569,642 (2003년 5월 27일자로 허여됨); US 6,072,047 (2000년 6월 6일자로 허여됨); US 6,642,358 (2003년 11월 4일자로 허여됨); US 6,743,625 (2004년 6월 1일자로 허여됨)]. 가장 바람직한 DR5 항체는 아포마브이다.

[0398] 상기 언급된 제형 각각은 완충제, 바람직하게는 히스티딘 완충제, 가장 바람직하게는, pH 5.5 내지 6.5, 바람직하게 5.8 내지 6.2, 예를 들어 대략 6.0 하의 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다. 완충제의 농도는 적어도 부분적으로는, 목적하는 pH에 의해 지시된다. 완충제에 대한 예시 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM, 바람직하게는 약 10 mM 내지 약 40 mM, 가장 바람직하게는 약 20 mM 범위이다.

[0399] 제형 중의 항체 농도는 바람직하게, 약 10 mg/mL 내지 약 250 mg/mL의 범위이다. 항체 농도는 제형의 의도한 용도 및 투여 방식에 근거하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 제형이 정맥내 (IV) 투여용인 경우 (예를 들어, HER2 항체), 이러한 제형 중의 항체 농도는 바람직하게 약 20 mg/mL 내지 약 40 mg/mL이다. 정맥내 (IV) 투여용으로 의도된 페르투주마브 예시 제형에서는, 항체 농도가 약 20 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 가장 바람직하게는 약 30 mg/mL이다.

[0400] 항체가 SQ 또는 IM 투여용인 경우에는 (예를 들어, 항-IgE 항체), 보다 고 농도의 항체가 요망될 수 있다. 이러한 실질적으로 높은 항체 농도는 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 또는 약 80 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 또는 약 100 mg/mL 내지 약 200 mg/mL일 수 있다.

[0401] 제형이 DR5 항체, 예를 들어 아포마브를 포함하는 경우, 예시되는 항체 농도는 약 10 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 예를 들어 약 20 mg/mL DR5 항체이고; 이러한 제형은 정맥내 투여용으로 유용하다.

[0402] 투여용 제형은 바람직하게, 수성 제형 (동결건조되지 않음)이고, 미리 동결건조시키지 않았다. 제형을 동결건조시킬 수는 있지만, 이렇게 하지 않는 것이 바람직하다. 그러나, 동결·건조 동안 발생하는 건조를 동시에 수반하지 않으면서 수성 제형을 동결시키는 것이 본원에서 구체적으로 고려되는데, 이는 예를 들어 스테인레스강 탱크 내에서 보다 장기간 저장할 수 있게 해준다.

[0403] 상기 제형이 당류, 가장 바람직하게는 이당류, 예를 들어 트레할로스 또는 수크로스를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 당류는 일반적으로, 동결/해동시 발생하는 바와 같은 가용성 응집체 형성을 저하시키는 양으로 포함된다. 예시되는 당류 농도는 HER2 항체 제형의 경우에는 약 10 mM 내지 약 1 M, 예를 들어 약 60 mM 내지 약 250 mM, 가장 바람직하게는 약 120 mM이고, DR5 항체 제형의 경우에는 약 240 mM이다.

[0404] 히스티딘-아세테이트 완충제와 당류를 포함하는 제형이 안정적인 것으로 본원에서 밝혀지긴 하였지만, 이러한 제형은 임의로 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트, 가장 바람직하게는 폴리소르베이트 20을 추가로 포함한다. 이러한 계면활성제는 일반적으로, 불용성 응집체 형성 (예를 들어, 진탕 또는 선적시 발생되는 바와 같음)을 저하시키는 양으로 포함된다. 계면활성제 농도는 바람직하게 약 0.0001% 내지 약 1.0%, 가장 바람직하게는 약 0.01% 내지 약 0.1%, 예를 들어 약 0.02%이다.

[0405] 임의로, 제형은 등장화량의 염 (예: 염화나트륨)을 함유하지 않는다.

[0406] 제형은 일반적으로 멸균 상태이고, 이는 인간 대상체에게 투여하기 적합한 멸균 제약 제형을 생성시키기 위해 당업자에게 공지된 과정, 예를 들어 제형을 제조하기에 앞서 또는 제조 후에 멸균 여과 막을 통하여 여과시키는 과정에 따라서 달성할 수 있다.

[0407] 더우기, 제형은 저장시 안정한 것으로 입증된 것이 요망된다. 제형의 안정성을 확인하기 위한 각종의 안정성 검정을 당업자가 이용할 수 있다. 예를 들어, 제형은 저장시 안정한 것으로 밝혀진 것일 수 있다: 약 40°C 하에 4주 이상; 약 5°C 또는 약 15°C 하에 3개월 이상 또는 1년 이상; 및/또는 -20°C 하에 3개월 이상. 안정성은 상기 언급된 온도 하에서의 저장 후 뿐만 아니라 대략 제형화 시점에서 제형 중의 항체의 물리적 안정성, 화학적 안정성, 및/또는 생물학적 활성을 평가함으로써 시험할 수 있다. 물리적 및/또는 화학적 안정성은 각종의 상이한 방식, 예를 들어 응집체 형성을 평가하거나 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하고/하거나 혼탁도를 측정하고/하거나 가시적을 검사함으로써 수행함); 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관대 전기영동을 사용하여 전하 불균일성을 평가하거나; 아미노-말단 또는 카복시-말단 서열을 분석하거나; 질량 분광법으로 분석하거나; 환원된 항체와 본래의 항체를 비교하기 위해 SDS-PAGE 분석하거나; 웹티드 지도 (예를 들어, 트립티 또는 LYS-C)를 분석하거나; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합성 기능을 평가함으로써 정성적 및/또는 정량적으로 평가할 수 있다. 불안정성으로 인해, 응집, 탈아미드화 (예: Asn 탈아미드화), 산화 (예: Met 산화), 이성체화 (예: Asp 이성체화), 클립핑/가수분해/단편화 (예: 헌지 영역 단편화), 석신이미드 형성, 쌍을 이루지 못한 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 프로세싱, 글리코실화 차이 등이 발생할 수 있다. 생물학적

활성 또는 항원 결합성 기능은 당업자에게 이용 가능한 각종 기술을 사용하여 평가할 수 있다.

[0408] 앞서 언급된 바와 같이, 제형을 동결시키는 것이 본원에서 구체적으로 고려된다. 따라서, 제형을 대상으로 하여 동결 및 해동시의 안정성을 시험할 수 있다.

[0409] 따라서, 본 발명은 또한, 본원에 기재된 바와 같은 제형을 제조하고, 이러한 제형 중의 모노클로날 항체의 물리적 안정성, 화학적 안정성, 또는 생물학적 활성을 평가하는 것을 포함하여, 제약 제형을 제조하는 방법을 제공한다.

[0410] 바람직한 양태에서, 제형은 주사기로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알 내부에 바람직하게는 수성 형태로 제공된다. 이러한 바이알은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되기 전까지 약 2 내지 8°C 하에 저장하는 것이 요망된다. 바이알은 20 cc 바이알 (예를 들어, 420 mg 용량의 경우) 또는 50 cc 바이알 (예를 들어, 1050 mg 용량의 경우)일 수 있다. DR5 항체, 예를 들어 아포마브의 경우에는, 제형이 5 cc 유리 바이알 (예를 들어, 5.5 ml 충진)에 제공될 수 있다.

[0411] 또 다른 양태에서는, 제형이 스테인레스강 탱크 내에 제공된다. 이러한 스테인레스강 탱크 내의 제형은 임의로 동결시키지만, 동결-견조시키지는 않는다.

[0412] 문헌 [참고: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재된 바와 같은 한 가지 이상의 기타 제약상 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제가 제형 내에 제공될 수 있는데, 단 이들은 제형의 목적하는 특징에 불리한 영향을 미치지 말아야 한다. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이에는 부가의 완충제; 조용매; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 칼레이트제, 예를 들어 EDTA; 금속 착물 (예: Zn-단백질 착물); 생분해성 중합체, 예를 들어 폴리에스테르; 방부제; 및/또는 엔-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨이 포함된다.

IV. 항체 제형을 이용한 치료

[0414] 한 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 제형을 특정 질병 또는 장애를 치료하는데 유효한 양으로 특정 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 이러한 대상체에게서 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0415] 제형 중의 항체가 HER2와 결합하는 경우, 이는 암을 치료하는데 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 암은 일반적으로, HER2-발현성 세포를 포함할 것으로, 본원에서의 HER2 항체는 암 세포와 결합할 수 있다. 따라서, 상기 양태에서의 본 발명은 HER2 항체 제약 제형을, 암을 치료하는데 유효한 양으로 특정 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 이러한 대상체에게서 HER2-발현성 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 이용하여 치료할 수 있는 각종 암이 상기 정의 섹션에 열거되어 있다.

[0416] HER2 항체 제형을 사용하여 각종 비-악성 질병 또는 장애, 예를 들어 자가면역 질환 (예: 건선); 자궁내막증; 피부 경화증; 재발 협착증; 폴립, 예를 들어 결장 폴립, 비내 폴립 또는 위장 폴립; 섬유선종; 호흡기 질환 (상기 정의 참고); 담낭염; 신경섬유종증; 다낭성 신장 질환; 염증 질환; 피부 장애, 예를 들어 건선 및 피부염; 혈관 질환 (상기 정의 참고); 혈관 상피 세포의 비정상적인 증식과 관련된 질환; 위장 궤양; 메네트리에병 (Menetrier's disease), 분비성 선종 또는 단백질 손실 증후군; 신 장애; 혈관형성성 장애; 안과 질환, 예를 들어 연령 관련 황반 변성, 추정 눈 히스토플라스마증, 증식성 당뇨병성 망막병증으로부터의 망막 신생혈관증식, 망막 혈관화, 당뇨병성 망막병증, 또는 연령 관련 황반 변성; 뼈 관련 병리 상태, 예를 들어 골관절염, 구루병 및 골다공증; 뇌 혀혈성 사건 후 외상; 섬유성 또는 부종 질환, 예를 들어 간경변증, 폐 섬유증, 카르코이드증 (carcoidosis), 갑상선염, 전신성 과점성 증후군, 오슬러 웨버-렌두병 (Osler Weber-Rendu disease), 만성 폐쇄성 폐 질환, 또는 화상, 외상, 방사선, 발작, 저산소증 또는 혀혈증 후의 부종; 피부의 과민 반응; 당뇨병성 망막병증 및 당뇨병성 신병증; 길랑-바레 증후군; 이식편 대 숙주 질환 또는 이식조직 거부; 파제트병 (Paget's disease); 뼈 또는 관절 염증; 광노화 (예를 들어, 인간 피부에 자외선을 조사함으로써 유발됨); 양성 전립선 비대증; 특정의 미생물 감염증 [아데노바이러스, 한타바이러스, 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 예르시니아 (*Yersinia*) 종 및 보르데텔라 페르투시스 (*Bordetella pertussis*) 중에서 선택된 미생물성 병원체 포함]; 혈소판 응집에 의해 유발된 혈전증; 생식기 질환, 예를 들어 자궁내막증, 난소 과자극 증후군, 자간전증, 기능이상 자궁 출혈 또는 불규칙 과다월경; 활막염; 죽종 (atheroma); 급성 및 만성 신병증 (증식성 사구체신염 및 당뇨병-유도된 신 질환 포함); 습진; 비대성 흉터 형성; 내독성 속 및 진균성 감염; 가족성 선종성 폴립증; 신경변성 질환 [예: 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축성 측삭 경화증, 색소성 망막염, 척수 근위축증 및 소뇌 변성]; 골수형성이상 증후군; 재생불량성 빈혈; 혀혈성 손상; 폐, 신장 또는 간의 섬유증; T-세포 매개된 과민증; 영아 비대성 유문 협착증; 뇌 폐쇄성 증후군;

건선성 관절염; 및 하시모토 갑상선염을 치료할 수 있는 것으로 또한 고려된다. 본원에서 치료하는데 바람직한 비-악성 적응증에는 건선, 자궁내막증, 피부 경화증, 혈관 질환 (예: 재발 협착증, 동맥경화증, 관상 동맥 질환 또는 고혈압), 결장 폴립, 섬유선종 또는 호흡기 질환 (예: 천식, 만성 기관지염, 기관지확장증 또는 낭포성 섬유증)이 포함된다.

[0417] 제형 중의 항체가 B-세포 표면 마커, 예를 들어 CD20 또는 BR3과 결합하는 경우, 이러한 제형을 사용하여 B-세포 악성 종양, 예를 들어 NHL 또는 CLL, 자가면역 질환, 이식편 거부를 치료할 수 있거나, 또는 외래 항원, 예를 들어 항체, 독소, 유전자 요법 바이러스성 벡터, 이식편, 감염체, 또는 동종항원에 대한 면역 반응을 차단시킬 수 있다 [참고: WO 01/03734, Grillo-Lopez et al.].

[0418] 제형 내의 항체가 IgE 항체인 경우, 이를 사용하여 IgE-매개된 장애 [참고: USSN 2004/0197324 A1, Liu and Shire], 예를 들어 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 위장병증, 과민증, 습진, 두드러기, 알레르기성 기관지폐증 아스페르길루스증, 기생충병, 고-IgE 증후군, 모세혈관화장성 운동실조, 비스 코트-알드리히 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 흉선 림프조직형성부전증, IgE 골수종, 및 이식편 대 숙주 반응을 치료할 수 있다.

[0419] TNF 초분자군 내의 수용체와 결합하거나 (예를 들어, DR5와 결합하거나) 또는 VEGF (또는 그의 수용체)와 결합하는 항체를 사용하여 암을 치료할 수 있는데, 그의 각종 형태가 상기 정의 색션에 기재되어 있다. 바람직하게, DR5 항체 제형을 이용하여 치료되는 암은 고형 종양 또는 NHL이다.

[0420] 적응증이 암인 경우, 항체 제형과 화학요법제를 병용하여 환자를 치료할 수 있다. 병용 투여에는 별개의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하여 동시-투여하는 것과, 어느 한 순서로 순차적으로 투여하는 것 [2가지 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요된다]이 포함된다. 따라서, 화학요법제는 본 발명의 조성물을 투여하기에 앞서 또는 투여 후에 투여할 수 있다. 이러한 양태에서, 화학요법제를 1회 이상 투여하는 시간과 조성물을 1회 이상 투여하는 시간 간격은 바람직하게 대략 1개월 이하, 가장 바람직하게는 대략 2주 이하이다. 또 다른 한편, 화학요법제와 조성물을 단일 제형 중에 및/또는 별개의 제형 중에서 환자에게 동시에 투여한다.

[0421] 제형을 이용한 치료로 인해, 암 또는 특정 질병 치료 또는 증상이 개선될 것이다. 예를 들어, 치료하고자 하는 질병이 암인 경우에는, 이러한 요법으로 인해 생존률 (전반적인 생존률 및/또는 질병 진행이 없는 생존률)이 개선될 수 있고/있거나 객관적인 임상 반응 (부분 또는 완전)이 야기될 수 있다. 더우기, 화학요법제와 항체 제형을 병용해서 치료하면, 환자에게 상승적이거나 부가적인 것보다 더 큰 치료 이점을 가져다 줄 수 있다.

[0422] 바람직하게는, 투여된 제형 중의 항체가 있는 그대로의 (노출된) 항체이다. 그러나, 투여되는 항체는 세포독성제와 접합시킬 수 있다. 바람직하게는, 이와 결합되는 면역접합체 및/또는 항원이 세포에 의해 내재화되면, 이와 결합하는 암 세포를 사멸시키는데 있어서의 면역접합체의 치료 효능이 증가된다. 바람직한 양태에서는, 세포독성제가 암 세포 중의 핵산을 표적으로 하거나 이를 방해한다. 이러한 세포독성제의 예에는 마이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제가 포함된다.

[0423] 제형은 공지된 방법에 따라서, 예를 들어 정맥내 투여, 예를 들면 거환으로서 또는 전 기간에 걸친 연속식 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 수막강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여한다. 항체 조성물을 정맥내, 근육내 또는 피하 투여하는 것이 바람직하고, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.

[0424] 피하 전달하는 경우에는, 제형을 주사기; 주사 장치 (예: INJECT-EASE™ 및 GENJECT™ 장치); 주사기 펜 (예: GENPEN™); 바늘없는 장치 (예: MEDIJECTOR™ 및 BIOJECTOR™); 또는 피하 패치 전달 시스템을 통하여 투여할 수 있다.

[0425] 질병을 예방 또는 치료하는데 적당한 항체 투여량은 상기 규정된 바와 같은 치료하고자 하는 질병 유형, 이러한 항체가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되든지 간에 질병의 중증도 및 과정, 기준의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 항체는 환자에게 1회 투여하거나 치료 전 기간에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 질병의 유형과 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속식 주입에 의해서든지 간에, 약 1 µg/체중 kg 내지 약 50 mg/kg (예를 들어, 0.1 내지 20 mg/kg)의 HER2 또는 DR5 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 항체 투여량은 일 반적으로, 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg일 것이다. 화학요법제를 투여하는 경우, 이는 통상적으로 이에 대해 공지된 투여량으로 투여하거나, 임의로는 화학요법제의 투여에 기인하는 불리한 부작용 또는 약물의 병용 작

용으로 인해 더 낮은 양으로 투여한다. 이러한 화학요법제에 대한 투여 스케줄 및 제조는 제조업자의 지시에 따라서 사용할 수 있거나, 또는 당업자에 의해 실험적으로 결정할 수 있다. 화학요법제에 대한 투여 스케줄 및 제조가 또한 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)].

[0426] 다음을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 기타 치료적 섭생을 항체와 병용할 수 있다: 제2 (제3, 제4 등) 화학요법제(들) (즉, 상이한 화학요법제의 "칵테일"); 또 다른 모노클로날 항체; 성장 억제제; 세포독성제; 화학요법제; EGFR-표적화 약물; 티로신 키나제 억제제; 항혈관형성제; 및/또는 사이토킨 등.

[0427] 상기 치료적 섭생 이외에도, 환자를 대상으로 하여 암 세포를 외과적으로 제거하고/하거나 방사선 요법을 수행 할 수도 있다.

V. 제조품

[0429] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 본 발명의 제약 제형을 함유하고 그의 사용에 관한 지시사항을 제공하는 제조품이 제공된다. 이러한 제조품은 용기를 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알 (예: 이중 챔버 바이알), 주사기 (예: 이중 챔버 주사기) 및 시험용 튜브가 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 본 발명의 제형을 보유하고 있고, 이러한 용기 상의 또는 용기에 부착된 라벨은 사용에 관한 지시사항을 표시할 수 있다. 제형을 보유하고 있는 용기는 재구성된 제형의 반복적인 투여 (예: 2 내지 6회 투여)를 허용해 주는, 반복-사용 바이알일 수 있다. 본 발명의 제조품은 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들어 기타 완충제, 희석제, 충진제, 바늘, 주사기, 및 앞서 섹션에 언급된 바와 같은 사용에 관한 지시사항을 수반한 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수도 있다.

[0430] 본 발명은 다음 실시예를 참고로 하여 보다 상세히 이해될 것이다. 그러나, 이를 실시예로써 본 발명의 범위가 제한되지 않는다. 모든 문헌 및 특허 인용 문헌이 본원에 참고로 도입된다.

실시예

안정한 페르투주마브 액상 제형

[0432] 다음 실시예는 약 10 mg/mL 내지 180 mg/mL 범위의 단백질 농도로 페르투주마브를 포함하는 안정한 액상 제형의 개발과 안정성 시험에 관해 기재하고 있다. 선택된 제형은 혼탁도가 낮고, 물리적 및 화학적으로 안정하였다. 이러한 제형으로부터 클로라이드 이온을 제거하여 부식 위험을 감소시켰다. 제형은 등장성이고, 피하 또는 근육내 전달용으로 적합하였다. 폴리소르베이트 20을 포함시킬 필요없이, 히스티딘-아세테이트과 수크로스 제형을 사용하여, 진탕 응력시 불용성 응집체가 형성되는 것을 방지하였다.

분석 방법

색상, 외관 및 투명도 (CAC)

[0435] 실온에서 백색 형광 하에 백색 및 검은색 배경에 대항하여 바이알을 가시적으로 검사함으로써, 샘플의 색상, 외관 및 투명도를 결정하였다.

UV 농도 측정

[0437] 액상 생성물 분취액을 먼저, 제형 완충제로 희석시켜 278 nm 근처에서의 A_{max} 가 0.5 내지 1.0 흡광 단위가 되도록 하였다. 이와 같이 희석시킨 샘플의 UV 흡광도를, HP 8453 분광광도계 상에서 폭 길이가 1 cm인 석영 쿠베트 (cuvette)로 측정하였다. 흡광도를 278 nm 및 320 nm 하에 측정하였다. 320 nm로부터의 흡광도를 사용하여 보다 큰 응집체, 버블 및 입자로 인한 배경 광 산란을 교정하였다. 이러한 측정치를 제형 완충제에 대항하여 블랭크하였다. $1.50 (\text{mg/mL})^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다.

pH 측정

[0439] RADIOMETER COPENHAGEN PHM82™ pH 측정기를 사용하여 실온에서 pH를 측정하였다. 사용된 프로브는 방사계 접속기가 부착된 복합 유리/기준 전극이었다 (Sigma, Cat# E-5759). pH 측정기를 조정하기 위해 pH 4.01 및 pH 7.00의 표준 용액 (공급처: EM Science)을 사용하였다.

이온-교환 크로마토그래피 (IEX)

[0441] 양이온 교환 크로마토그래프를 이용하여 전하 변이체 상의 변화를 측정하였다. 이러한 측정은 HP 1100™ HPLC

시스템 상의 DIONEX PROPAC WCX-10™ 칼럼을 활용한다. 샘플을 pH 6.0 하의 20 mM MES를 함유하는 이동 상 A를 이용하여 1 mg/mL으로 희석시켰다. 이어서, 이와 같이 희석시킨 샘플 50 mL를 주위 온도 하에 유지시킨 칼럼 상에 부하하였다. 20 mM MES, 250 mM NaCl (pH 6.0)을 함유하는 이동 상 B를 사용하여, 피크를 얇은 NaCl 구배로 용출시켰다. 이러한 용출액을 280 nm 하에 모니터링하였다. HP CHEMSTATION™ 소프트웨어 (Rev A08.03)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0442] 모세관대 전기영동 (CZE)

Fab 및 $F(ab')_2$ 단편의 순도를 CZE에 의해 결정하였다. 이 검정을 BIOCAP XL™ 모세관, 50 μm I.D., 총 길이 44.6 cm 및 탐지기까지의 길이 40 cm을 수반한 BIORAD BIOFOCUS™ 3000™ 모세관 전기영동 시스템 상에서 수행하였다.

[0444] 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)

크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 응집체와 단편을 정량화하였다. 본 검정은 TSK G3000 SWXL™, 7.8 x 300 mm 칼럼을 활용하고 HP 1100™ HPLC 시스템 상에서 수행하였다. 이동 상을 이용하여 샘플을 10 mg/mL으로 희석시켰고, 주사 용적은 20 μL 였다. 이러한 이동 상은 pH 6.8 하의 100 mM K_2HPO_4 이고, 단백질을 45분 동안 0.5 mL/min의 동용매 (isocratic) 구배로 용출시켰다. 용출액 흡광도를 280 nm 하에 모니터링하였다. HP CHEMSTATION™ 소프트웨어 (Rev A08.03)를 사용하여 통합을 수행하였다.

[0446] 생물학적 활성

인간 유방암 세포주 MDA-MB-175-VII의 증식을 억제시킬 수 있는 능력을 측정함으로써, 페르투주마브의 생물학적 활성을 결정하였다.

[0448] 실시예 1

페르투주마브 Fab 및 $F(ab')_2$ 항체 단편을 다음 완충제 조건 하에 1.0 mg/mL의 단백질 농도로 제형화하였다:

[0450] 10 mM 시트레이트, 140 mM NaCl (pH 4.0);

[0451] 10 mM 숙시네이트, 140 mM NaCl (pH 5.0);

[0452] 10 mM 숙시네이트, 140 mM NaCl (pH 6.0);

[0453] 10 mM 히스티딘, 140 mM NaCl (pH 7.0); 및

[0454] 10 mM 글리실글리신, 140 mM NaCl (pH 8.0).

[0455] 각 제형을 여과시킨 다음, TEFLON™ 회색 부틸 마개로 밀봉시킨 3 cc WHEATON™ USP 유형 I 유리 바이알 내로 등분하였다. 샘플을 40 ± 2°C 하에 저장하였다. 약물 생성물의 안정성을 분석한 결과, Fab 및 $F(ab')_2$ 가 pH 5.0 내지 6.0에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

표 2

40°C 하에 저장된 Fab 또는 $F(ab')_2$ 의 분해에 대한 pH의 효과

제형 pH	Fab		$F(ab')_2$	
	CZE % 주요 피크	SEC % 주요 피크	CZE % 주요 피크	SEC % 주요 피크
4.0	74.1	96.7	43.6	89.4
5.0	83.2	96.4	65.4	94.0
6.0	82.9	96.2	69.0	92.3
7.0	83.9	96.4	62.3	91.3
8.0	72.7	96.4	49.2	89.8

[0456]

[0457] 실시예 2

페르투주마브를 120 mM 수크로스 및 0.02% 폴리소르베이트 20을 수반한 20 mM 히스티딘-아세테이트 완충제 내로 제형화하였다. 아세트산을 이용하여 제형의 pH를 조정하여 최종 pH가 5.0 내지 7.0이 되도록 하였다. 단백질 농도는 30 mg/mL였다. 각 제형을 3 cc USP 유형 I 유리 바이알 내에 채우고, 안정성 분석을 위해 40°C 하에 저

장하였다. 그 결과, 페르투주마브가 대략 pH 6.0에서 가장 안정적인 것으로 밝혀졌다.

표 3

40°C 하에 저장된 페르투주마브의 분해에 대한 pH의 효과

제형 pH	온도 (°C)	저장 시간 (주)	SEC % 단량체	IEX % 주요 피크
5.0	40	2	99.4	57.4
5.5	40	2	99.4	59.2
6.0	40	2	99.4	60.6
6.5	40	2	99.3	60.5
7.0	40	2	99.1	54.0
5.0	40	4	97.3	48.1
5.5	40	4	99.1	50.5
6.0	40	4	99.1	53.3
6.5	40	4	99.0	52.3
7.0	40	4	98.6	42.3

[0459]

실시예 3

[0461]

단백질 농도 100 mg/mL 하의 페르투주마브 제형을 다음 부형제에서 제조하였다:

[0462]

(1) 10 mM 히스티딘-HCl, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0);

[0463]

(2) 10 mM 히스티딘-아세테이트, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0);

[0464]

(3) 10 mM 히스티딘-포스페이트, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0);

[0465]

(4) 10 mM 히스티딘-설페이트, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0).

[0466]

각 제형을 FLUROTEC™ 표면 처리한 부틸 고무 마개로 밀봉시킨 3 cc FORMA VITRUM™ USP 유형 I 유리 바이알 내로 충전시켰다. 샘플을 30°C 및 40°C 하에 저장하고, 질 (CAC) 및 순도 (SEC, IEC)를 알아보기 위해 안정성을 평가하였다. 안정성 결과, 히스티딘-포스페이트 완충제 중의 페르투주마브가 40°C 하의 저장시 기타 히스티딘 완충제에서 보다 훨씬 더 신속하게 분해된 것으로 밝혀졌다 (도 8 및 도 9).

[0467]

실시예 4

[0468]

페르투주마브를 한외여과/투석여과함으로써 다음 완충제에서 각종 농도로 농축시켰다:

[0469]

(1) 20 mM 히스티딘-아세테이트 (pH 6.0);

[0470]

(2) 10 mM 히스티딘-HCl (pH 6.0); 및

[0471]

(3) 10 mM 히스티딘-설페이트 (pH 6.0).

[0472]

여과시키기 전에 각 제형의 혼탁도를 측정하였다. 도 10에 도시된 바와 같은 결과는, 히스티딘-아세테이트 및 히스티딘-HCl에서 제형화시킨 페르투주마브 샘플이 히스티딘-설페이트 완충제에서 제형화시킨 페르투주마브 샘플보다 적은 양의 불용성 응집체를 지녔다는 것을 입증하였다.

[0473]

실시예 5

[0474]

페르투주마브를 20 mM 히스티딘-아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0) 중에서 30 mg/mL으로 제형화하였다. 페르투주마브를 316L 및 HASTELLOY™ 스테인레스강 소형 탱크에 충전시켰다. 모든 샘플을 -20°C 및 5°C 하에 저장하고, 질 (CAC), 순도 (SEC, IEC) 및 강도 (UV-Vis)를 알아보기 위해 평가하였다. 안정성 분석 결과, 페르투주마브가 -20°C 및 5°C 하에서 3개월 이상 동안 저장시 상기 제형에서 안정적인 것으로 밝혀졌다. 클로라이드가 없는 제형이 316L 및 HASTELLOY™ 스테인레스강 탱크와 상용성이다.

표 4

스텐레스 스틸 탱크 내에서의 페르투주마브의 안정성

탱크	온도 (°C)	시간 (개월)	CAC	UV 분광 (mg/mL)	SEC (% 단량체)	IEC (% 주요 피크)
		0	통과 ^a	29.0	99.8	67.9
316L	-20	3	통과	28.9	99.7	66.8
	5	3	통과	28.7	99.7	66.8
HASTELLOY™	-20	3	통과	29.1	99.7	66.8
	5	3	통과	28.8	99.7	67.7

[0475]

^a색상, 외관 및 투명도에 대한 통과: 청정하거나 약간 유백색, 무색 내지 담황색 용액.**실시예 6**

[0478] 접선 유동 여과 (TFF)를 이용하여 페르투주마브를 제형화하였다. 최종 제형은 30 mg/mL의 단백질 농도 하에, 20 mM 히스티딘-아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0)를 함유하였다. 샘플을, 20 mm FLUROTEC™ 표면 처리시킨 부틸 고무 마개로 캡핑하고 알루미늄 플립-상부 캡으로 밀봉시킨 20 M1 FORMA VITRUM™ USP 유형 I 유리 바이알 내로 충전시켰다. 모든 샘플을 -70°C, 5°C, 15°C 하에 저장하고, 질 (CAC), 순도 (SEC, IEC), 강도 (UV-Vis), 및 효력 (생물학적 검정)을 알아보기 위해 안정성을 평가하였다. 그 결과, 페르투주마브가 5°C 및 15°C 하에 3개월 이상 동안 저장시 상기 제형에서 안정적이란 사실이 밝혀졌다.

표 5

유리 바이알 내에서의 페르투주마브의 안정성

온도 (°C)	시간 (개월)	CAC	UV 분광 (mg/mL)	SEC (% 단량체)	IEC (% 주요 피크)	생물학적 검정 (% 고유 활성)
	0	통과	29.2	99.8	64.1	83
-70	1	통과	29.7	99.8	65.2	92
	3	통과	30.7	99.8	67.0	93
5	3	통과	30.4	99.7	67.2	90
15	1	통과	29.7	99.7	64.4	78
	3	통과	30.4	99.7	65.5	93

[0479]

실시예 7

[0480] 페르투주마브를 다음 완충제 조건 하에 100 mg/mL으로 제형화하였다:

[0482] (1) 10 mM 히스티딘-HCl (pH 6.0);

[0483] (2) 10 mM 히스티딘-HCl, 240 mM 수크로스 (pH 6.0);

[0484] (3) 20 mM 숙시네이트 (pH 6.0); 및

[0485] (4) 20 mM 숙시네이트, 240 mM 수크로스 (pH 6.0).

[0486] 각 제형에 상이한 농도의 폴리소르베이트 20을 부가하였다. 모든 샘플을 3 cc USP 유형 I 유리 바이알에 충전시키고, 실온 하에 7일 동안 70 rpm으로 좌우 방향으로 진탕시켰다. 혼탁도를 알아보기 위해 7일 시점에 각 샘플의 안정성을 평가하였다. 그 결과, 최종 제형 내에 폴리소르베이트 20을 사용하는 것이 불용성 응집체의 형성을 효과적으로 방지한 것으로 나타났다 (도 11 참고).

실시예 8

[0488] 페르투주마브를 다음 제형으로 제조하였다:

[0489] (1) 25 mg/mL 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl, 240 mM 수크로스 (pH 6.0);

[0490] (2) 50 mg/mL 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl, 240 mM 수크로스 (pH 6.0);

[0491] (3) 60 mg/mL 페르투주마브, 20 mM 히스티딘-아세테이트, 120 mM 수크로스 (pH 6.0).

[0492] 각종 양의 폴리소르베이트 20을 각 제형에 부가하였다. 모든 샘플을 3 cc USP 유형 I 유리 바이알에 충전시키고, 실온 하에 7일 동안 70 rpm으로 좌우 방향으로 진탕시켰다. 혼탁도를 알아보기 위해 7일 시점에 각 샘플의 물리적 안정성을 평가하였다. 그 결과, 히스티딘-HCl 및 수크로스 제형 내에 폴리소르베이트 20을 사용하는 것이 불용성 미립자의 형성을 효과적으로 방지한 것으로 나타났다. 히스티딘-아세테이트와 수크로스를 함유하는 제형이 단백질에 대해 폴리소르베이트 20과 동일한 보호 효과를 지닌 것으로 여겨졌다 (도 12 참고).

실시예 9

[0494] 페르투주마브를 다음과 같이 제형화하였다:

[0495] (1) 100 mg/mL 단백질, 10 mM 히스티딘-HCl (pH 6.0);

[0496] (2) 100 mg/mL 단백질, 20 mM 숙시네이트 (pH 6.0);

[0497] (3) 60 mg/mL 단백질, 20 mM 히스티딘-아세테이트 (pH 6.0).

[0498] 각 제형을 상이한 양의 수크로스와 혼합하였다. 모든 샘플을 3 cc USP 유형 I 유리 바이알 내에 무균적으로 충전시켰다. 이어서, 이들을 -70°C 하에 동결시키고 5°C 하에 해동시키는 것을 3회 수행하였다. 동결과 해동 3주기를 수행한 후에 각 샘플의 물리적 안정성을 결정하였다. 그 결과, 수크로스가 이러한 동결-해동 과정 동안 가용성 응집체 형성을 방지한 것으로 나타났다 (도 13 참고).

실시예 10

[0500] 치료용으로 사용하는데 바람직한 페르투주마브 제형은 본질적으로, 20 mM 히스티딘 아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0) 중의 30 mg/mL 페르투주마브로 이루어진다.

화합물	농도	양/L
페르투주마브	30 mg/mL	30 g
L-히스티딘 MW=155.16g/mol	20 mM	3.10 g
빙초산 MW=60.05g/mol 밀도=1.05g/cm ³	11.6 mM	0.66 mL
수크로스 MW=342.3g/mol	120 mM	41.1 g
폴리소르베이트 20 Density=1.012g/cm ³	0.02% (w/v)	0.2 mL

[0501]

[0502] MW: 분자량

[0503] 420 mg 용량 바이알 입체 배치:

[0504] 바이알: 20 cc 포말 비트룸 (Formal Vitrum) 유형 I 유리

[0505] 마개: 20 mm DAIKYO GREY™, 플루오로-수지 적층시킴

[0506] 캡: 20 mm 플립 상부 알루미늄

[0507] 충전 용적: 14.50 mL

[0508] 전달: 정상 식염수 IV 봉지 중의 14.0 mL 페르투주마브.

[0509] 1050 mg 용량 바이알 입체 배치:

[0510] 바이알: 50 cc 포말 비트룸 유형 I 유리

[0511] 마개: 20 mm DAIKYO GREY™, 플루오로-수지 적층시킴

[0512] 캡: 20 mm 플립 상부 알루미늄

[0513] 충전 용적: 36.0 mL

[0514] 전달: 정상 식염수 IV 봉지 중의 35.0 mL 페르투주마브.

실시예 11

[0516] 본 실시예는 제I상 및 제II상 임상 시험에서 사용한 또 다른 페르투주마브 제형에 관한 것이다. 이 조성물은 25 mg/ml 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl 완충제, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0)로 이루어진다.

성분	농도
페르투주마브	25 mg/ml
L-His HCl ₂ O (MW 209.6)	1.12 mg/ml (0.0125 M)
L-His (MW 155.2)	0.72 mg/ml (0.0099 M)
수크로스 (MW 342.3)	82.15 mg/ml (0.240 M)
폴리소르베이트 20	0.2 mg/ml (0.02%)

실시예 12

[0519] 세포성 세포소멸을 내적 및 외적 경로에 의해 매개하였다. 화학요법은 세포 손상을 유발시킬 수 있고, 세포성 손상에 반응하여 내적 경로에 의해 세포소멸을 촉발시킬 수 있다. 그러나, 암 세포에게는 종종, p53 종양 억제 인자 유전자 내에서의 돌연변이를 통하여 화학요법에 대한 내성이 발생한다 [참고: Ashkenazi A. Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumour-Necrosis Factor Superfamily. *Nature Reviews* 2:420-430 (2002)]. 세포 표면 상에 위치한 사멸 수용체, 예를 들어 DR4 및 DR5는 p53이 관여하지 않은 외적 경로를 통하여 세포소멸을 촉발시킨다. 작동성 분자, 예를 들어 Apo2L이 DR4 및 DR5 수용체와 결합하고, Fas-관련 사멸 도메인을 통하여 카스파제 8 및 10을 활성화시킨다. 이때, 카스파제 8 및 10은 카스파제 3, 6, 및 7을 활성화시켜 세포소멸을 유도시킨다. 종양 세포 상의 사멸 수용체의 분자상 신호 전달은 Apo2L과 같은 통상적인 요법과 분자에 대해 내성이 있는 암 세포를 제거하는데 있어 치료적 잠재력을 지니고 있고, 현재 임상 평가 중에 있다.

[0520] "아포마브"는 람다 경쇄를 이용하여 구축한 전장의 CHO 유래된 인간화 IgG1이다. 이는 각종 암 세포주의 세포소멸을 유도시키는 것으로 밝혀진 DR5에 대항한 아고니스트 항체이다. 뮤린 종양 이식체 모델을 이용한 예비 임상 연구 결과, 아포마브가 Apo2L과 비교해서 유사하거나 개선된 종양 감소를 나타낸다는 사실이 밝혀졌다. 아포마브는 진행성 고형 종양 및 비호지킨 림프종 (NHL) 적응증에서 항암제로서 평가되고 있다. 이를 실험에 사용된 아포마브의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열이 도 27 및 28에 도시되었다.

[0521] 항체 제형의 제조

[0522] 제조합적으로 생성된 아포마브는 극히 둗은 단백질 농도와 높은 pH를 나타내었다. 이 물질을 대략 20 mg/mL으로 농축시키고, MILLIPORE PELLICONTM XL, PLGCG10, 50 cm 막이 있는 밀리포어 (Millipore) 실험실규모 접선 유동 여과 (TFF) 시스템을 사용하여 pH 5.0의 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제로 교환하였다. 아포마브 샘플을, 10,000 Da 분자량 컷-오프 (cut-off) 막 (공급처: Pierce, Inc.)을 이용한 투석을 사용하여 트레할로스와 TWEEN 20®

을 수반하지 않으면서 나트륨 아세테이트, 히스티딘 아세테이트, 및 인산나트륨을 사용하여 pH 범위 4.0 내지 7.0의 각종 완충제 시스템 내로 제형화하였다. 240 mM 하의 트레할로스를 마지막 투석시 가하였다. 투석 후, 0.02% TWEEN 20TM을 상기 제형에 가하고, 샘플을 0.22 μm 필터 (공급처: Millipore, Inc.)로 여과시켰다. 0.5 mL 용적의 아포마브를 멸균 3 cc 유리 바이알 (공급처: Forma Vitrum, Inc.) 내로 충전시키고, 13 mm 마개 (공급처: Daikyo, Inc)로 밀봉하였다. 3개월 정도까지 저장하면서 단백질 안정성을 -70°C, 5°C, 30°C 및 40°C 하에 평가하였다.

[0523] 아포마브 제형의 안정성

[0524] 약물 생성물 안정성 시험을 위해, 5 cc FORMA VITRUM®

유리 바이알 내로 충전시킨 아포마브 제형화 별크를 제형화하였다. 바이알에 5.5 mL의 제형화 항체를 충전시키고, 20 mm DAIKYO®

마개를 장착시키며, 직립 위치에서 -70°C, 5°C, 30°C 및 40°C 하에 저장하였다.

[0525] 약물 물질 안정성 시험을 위해, 아포마브 제형화 별크를 0.22 μm 필터를 통하여 멸균 여과시키고, 10 mL를 오토 클레이빙된 20 cc 316L 스테인레스강 미니-탱크 내로 충전시켰다. 이 탱크를 -20°C 및 5°C 하에 직립으로 놓아 두었다. 1 mL 분취액을 명시된 시간 간격으로 상기 미니-탱크로부터 무균적으로 제거하여 단백질 질을 평가하였다. 대조군 바이알은 -20°C 하에 저장된 3 cc 유리 바이알 중의 1 mL 분취액이다.

[0526] 색상, 외관 및 투명도

[0527] 샘플의 투명도, 외관 및 색상을, 검은색 및 백색 배경이 있는 광 검사 스테이션을 사용하여 백색 형광 하에 가시적으로 평가하였다. 약물 물질을 분석하기 위해, 미니-탱크 샘플을 3 cc 유리 바이알로 옮겨 검사하였다.

[0528] pH

[0529] 완충제를 측정하기 위한 THERMO ORION SURE-FLOW ROSS™ 세미-마이크로 pH 전극을 사용하거나, 단백질 pH 스크리닝 샘플을 측정하기 위한 THERMO ORION GLS™ 복합 마이크로 pH 전극, 즉 독성학적 안정성 샘플을 측정하기 위한 벡크반 (Beckman) 마이크로전극을 사용하여, pH를 실온에서 측정하였다. pH 7 및 pH 4 하에 완충제 표준물 (공급처: EM Science)을 이용하여, METERLAB™ pHM240 pH/이온 측정기 (분석용 방사계)를 매일 조정하였다.

[0530] 농도

[0531] AGILENT 8453™ 분광광도계를 사용하여 자외선 흡광 분광법에 의해 단백질 농도를 결정하였다. 샘플을 적당한 제형 완충제 블랭크로 희석시켜 0.5 내지 1.0의 흡광도를 수득하였다. 기기를 희석제 용액으로 블랭크시키고 스펙트럼을 240 내지 500 nm으로 스캐닝하였다. 320 nm 하에서의 흡광도 값을 279 nm 하에서의 흡광도 값으로부터 공제하여 오프셋 (offset)과 광 산란을 교정하였다. 단백질 농도를 다음 방정식에 의해 계산하였다:

$$\text{농도 (mg/mL)} = \frac{(A_{279} - A_{320})}{\text{흡광 계수}} \times \text{희석 인자}$$

$$\text{흡광 계수 } [\text{cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}]$$

[0534] 서열에 근거한 흡광 계수가 초기에 $1.32 \text{ cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ 인 것으로 결정되었고, 이러한 값은 pH 스크리닝 연구를 위해 사용되었다. 아미노산 분석 및 단백질분해 방법에 의해 나중에 $1.7 \text{ cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ 값을 결정하였고, 이러한 값은 독성학 연구에 사용된 아포마브의 안정성 분석을 위해 사용하였다.

[0535] 이온-교환 크로마토그래피

[0536] 이온 교환 크로마토그래피를 다이오드 어레이 탐지기가 장착된 1100 시리즈 HPLC (공급처: Agilent

Technologies, Inc.) 상에서 수행하였다. 크로마토그래피를 0.5 mL/min의 유속 하 및 칼럼 온도 40°C 하에 PROPAC WCX-10™ (Dionex) 칼럼 (4 x 250 mm) 상에서 수행하였다. 이동 상 A는 25 mM 인산나트륨 (pH 6.5)였다. 이동 상 B는 이동 상 A와 동일한 완충제 중의 100 mM 염화나트륨이었다. 칼럼을 100% 이동 상 A로 평형시켰다. pH 스크리닝 샘플의 경우에는, 20 mg 양의 아포마브를 상기 칼럼 상에 부하하고, 214 nm 하에서의 흡광도를 모니터링하였다. 단백질을 다음 구배로 칼럼으로부터 용출시켰다:

[0537]	<u>시간 (분)</u>	% A	% B
[0538]	0	100	0
[0539]	50	0	100
[0540]	51	100	0
[0541]	70	100	0

[0542] 독성학 연구에 사용된 물질의 안정성을 분석하기 위해, 30 mg 양의 아포마브를 상기 칼럼 상에 부하하고, 280 nm 하에서의 흡광도를 모니터링하였다. 단백질을 다음 구배로 칼럼으로부터 용출시켰다:

[0543] 구배:

[0544]	<u>시간 (분)</u>	% A	% B
[0545]	0	100	0
[0546]	40.0	40	60
[0547]	41.0	0	100
[0548]	45.0	0	100
[0549]	45.1	100	0
[0550]	60.0	100	0

크기-배제 크로마토그래피

[0552] 크기 배제 크로마토그래피를 다이오드 어레이 탐지기가 장착된 1100 시리즈 HPLC (공급처: Agilent Technologies, Inc.) 상에서 수행하였다. 50 µg 양의 아포마브를 TSK 젤 3000SWXL™ (7.8 x 300 mm) 칼럼 상에 부하하고, pH 스크리닝 샘플의 경우에는 20분 동안 0.9 mL/min의 유속으로 수행하고, 이동 상으로서 0.20 M 인산칼륨, 0.25 M 염화칼륨 (pH 6.2)를 수반한 독성학적 안정성 샘플의 경우에는 30분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 수행하였다. 흡광도를 280 nm 하에 모니터링하였다.

효력

[0554] 효력 생물학적 검정의 목적은 ALAMARBLUE™을 사용하여 Colo205 세포를 사멸시킬 수 있는 아포마브의 능력을 측정하는 것이었다. Colo205는 DR5 사멸 수용체와 DR4 사멸 수용체 둘 다를 발현하는 결장 암종 세포주이다. 이러한 검정은 대사 활성 탐지에 기초하여 형광측정/열량측정 성장 지표기를 도입하고 있다. ALAMARBLUE™은 산화된 상태에서 비-형광성이고 청색인 레독스 염료이다. 세포내 대사 저하는 이를 적색 (이는 형광성이다)으로 전환시킨다. 색상과 형광 상의 변화는 대사 활성과 살아있는 세포 수에 비례한다. 세포가 사멸되면 신호가 감소하였다. 아포마브를 항-Fc 함유 매질에서 희석시킨 다음, Colo 205 세포를 아포마브 샘플에 부가하고 37°C 하에 48시간 동안 항온 배양하였다. ALAMARBLUE™을 마지막 2 내지 3시간 동안 부가하였다. 판을 530 nm 여기 및 590 nm 방출에서 판독하여 상대 형광 단위 (RFU)를 수득하였다. 이 데이터를 KALEIDAGRAPH™에 의해 분석하였다. 희석 시열곡선이 생성되었다.

결과

제형 pH 스크린 연구

[0557] 증폭시키지 않은 안정한 세포주로부터 생성된 아포마브를 사용하여, 항체 안정성에 대한 pH의 효과를 연구하였다. 이러한 분석을 위해, 아포마브를 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제 (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5); 20 mM 히스티딘 아세테이트 완충제 (pH 6.0 및 6.5); 및 20 mM 인산나트륨 완충제 (pH 7.0) 중의 20 mg/mL 항체로 제형화

하였다. 이들 제형 모두는 240 mM 트레할로스와 0.02% TWEEN 20®

을 함유하였다. 이들 제형을 -70°C, 5°C, 30°C 및 40°C 하에 3개월 정도까지 저장하고, 단백질 안정성을 각종 분석용 검정, 예를 들어 CAC, pH, 농도, SEC 및 IEC에 의해 결정하였다. 이들 샘플의 저장 동안 CAC, pH 또는 단백질 농도 상의 유의적 변화가 전혀 없었다.

[0558] 샘플을 SEC에 의해 분석한 결과, 5°C 및 -70°C 하의 저장 동안에는 유의적 변화가 전혀 일어나지 않은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 30°C 및 40°C 하의 저장 동안 항체 단량체가 형성됨에 따라 분해가 관찰되었다 (도 20). 제형들을 비교하기 위해, 저장 동안의 항체 단량체 역학을 모니터링하고, 1차 반응속도 상수를 계산하였다. 항체 단량체 상의 손실에 대해 수득된 pH 비율 프로파일이 도 21에 도시되었다. 항체 단량체의 안정성에 대한 최적의 조건은 pH 6.0의 히스티딘 아세테이트 완충제 중에서 제형화함으로써 획득되었다.

[0559] 아포마브 전하 불균일성을 IEC에 의해 모니터링하였다. 5°C 및 -70°C 하의 저장 동안에는 IEC 프로파일 상의 유의적 변화가 전혀 발생하지 않았다. 그러나, 제형에 따라서 산성 또는 염기성 변이체가 형성됨에 따라 분해가 관찰되었다 (도 22). 일반적으로, 염기성 변이체 증가는 보다 낮은 제형 pH에서 형성되었고, 보다 산성인 변이체는 보다 높은 제형 pH에서 형성되었다. 제형들을 비교하기 위해, 저장 동안 IEC 주요 피크 역학을 모니터링하고, 1차 반응속도 정수를 계산하였다. IEC 주요 피크 상의 손실에 대해 수득된 pH 비율 프로파일이 도 23에 도시되어 있다. IEC에 의해 관찰된 속도 정수는 SEC로부터 관찰된 속도 정수의 대략 10배 이상이었다 (도 21). 따라서, IEC 주요 피크 상의 손실은 항체의 일차 분해였는데, 이는 궁극적으로 생성물의 저장 수명을 제한할 것이다. 더우기, SEC에 의해 관찰된 바와 같이, IEC 주요 피크를 안정화시키는 최적의 항체 안정성은 pH 6.0의 히스티딘 아세테이트 완충제 중에서 제형화함으로써 획득되었다.

[0560] 상기 언급된 pH 스크리닝 데이터를 분석한 후, 20 mM 히스티딘 아세테이트, 240 mM 트레할로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0) 중의 20 mg/mL 항체를 포함하는 아포마브 제형을 선별하였다. 약물 생성물의 경우에는, 바이알 입체 배치가, 20 mM DAIKYOTM 웨스트 (West) 마개가 장착된 5 cc FORMA VITRUMTM 바이알 중의 5.5 mL 충전물로 이루어졌다. 아포마브를 스테인레스강 탱크에 저장하였다.

[0561] 상기 언급된 5 cc 유리 바이알 입체 배치에서 아포마브 약물 생성물의 안정성을 평가하였다. 바이알을 -70°C (대조군), 5°C, 30°C 및 40°C 하에 저장하였다. 샘플을 명시된 시간 간격으로 끌어당기고 다음 검정에 의해 분석하였다: 색상, 외관, 투명도 (CAC), pH, 단백질 농도, SEC, IEC, 및 효력. 이들 검정으로부터의 결과가 -70°C 및 5°C 하에 저장된 샘플의 경우에는 표 6에 제시되었고, 30°C 및 40°C 하에 저장된 샘플의 경우에는 표 7에 제시되었다.

표 6

-70°C 및 5°C 하에 저장된 아포마브에 대한 안정성 데이터

온도 (°C)	시점	투명도	색상	pH	농도 (mg/mL)	SEC	IEC	효력
						(% 단량체)	(% 주요 피크)	(% 고유 활성)
허용	기준:	보고	보고	6.0±0.3	20±2	≥ 95%	Report	60 - 140%
NA	T=0	청정함	무색	5.9	20.2	99.8	63	94
-70	1 개월	청정함	무색	6.0	20.5	99.8	63	86
-70	2 개월	청정함	무색	6.0	20.4	99.7	64	91
-70	3 개월	청정함	무색	6.0	20.5	99.7	63	83
-70	6 개월	청정함	무색	6.0	20.4	99.7	64	85
-70	9 개월	청정함	무색	6.0	20.4	99.8	65	89
-70	12 개월	청정함	무색	6.0	20.8	99.7	63	107
5	1 개월	청정함	무색	6.0	20.5	99.7	63	89
5	2 개월	청정함	무색	6.0	20.4	99.7	64	99
5	3 개월	청정함	무색	6.0	20.6	99.7	63	84
5	6 개월	청정함	무색	6.0	20.5	99.7	64	93
5	9 개월	청정함	무색	6.0	20.6	99.7	64	88
5	12 개월	청정함	무색	6.0	20.7	99.6	64	106

[0562]

표 7

30°C 및 40°C 하에 저장된 아포마브에 대한 안정성 데이터

온도 (°C)	시점	투명도	색상	pH	농도 (mg/mL)	% SEC (% 단량체)		IEC (% 주요 피크)	효력 (% 고유 활성)
						허용 기준 :	보고	보고	6.0 ± 0.3
30	1 개월	청정합	무색	6.0	20.6	98.2	59	59	91
30	2 개월	청정합	무색	6.0	20.3	97.4	54	54	80
30	3 개월	청정합	무색	6.0	20.6	97.2	49	49	74
30	6 개월	청정합	무색	6.0	20.2	94.1	37	37	51
30	9 개월	청정합	연황색	6.0	20.4	93.2	31	31	55
30	12 개월	청정합	연황색	6.0	20.6	91.6	25	25	59
40	1 개월	청정합	무색	6.0	20.4	96.6	44	44	79
40	2 개월	청정합	무색	6.0	20.0	93.7	31	31	64
40	3 개월	청정합	연황색	5.9	20.3	91.5	22	22	53
40	6 개월	청정합	연황색	6.0	20.2	83.9	NT	26	
40	9 개월	청정합	황색	5.9	20.3	78.8	NT	25	
40	12 개월	청정합	황색	5.9	20.5	71.4	NT	31	

[0563]

NT=정량화되지 않음

[0565]

-70°C 및 5°C 하에서 12개월 저장한 후에는 단백질 질상의 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 예를 들어, pH는 6.0 ± 0.3을 유지하였고, 아포마브는 청정한 무색 액상물 외관을 나타냈으며, 단백질 농도는 20.0 ± 2.0 mg/mL을 유지하였고, % 단량체는 변하지 않았다. 더우기, % IEC 주요 피크 상의 유의적 변화는 없었고, 세포-사멸 효력 검정에 의해 결정된 % 고유 활성은 60% 내지 140% 고유 활성의 검정 정밀도 내에 있었다. 그 결과, 5 cc 유리 바이알 내에 저장된 아포마브가 5°C 하에 12개월 이상 동안 안정한 것으로 나타났다.

[0566]

표 7은 단백질 질상의 변화가 30°C 및 40°C에서 발생하였다는 것을 보여준다. SEC는 % 단량체 상의 감소를 나타내었는데, 이는 주로 단편 종에서 상승되었다. 응집체는 보다 고온에서도 역시 증가하였지만, 그 속도는 훨씬 더 느렸다. 그러나, 40°C에서 6개월 동안 저장한 후에는 응집체가 상당히 증가하였다. IEC % 주요 피크는 산성 변이체가 상응하게 증가함에 따라 감소하였다. 염기성 피크는 40°C에서 2개월 후 및 30°C에서 9개월 후에 약간 감소하였다. 40°C에서 6개월 동안 저장한 후, IEC 주요 피크가 더 이상 통합될 수 없을 정도로 분해가 발생하였다. 세포 사멸 생물학적 검정은 보다 고온에서 보다 장기간 저장하면 % 고유 활성이 손실된다는 것을 보여주었다. 단백질 농도와 pH는 변하지 않았다. 용액은 40°C 하에 3개월 후 및 30°C 하에 9개월 후에 연황색되었고, 40°C 하에 9개월 후에는 황색이 되었다.

[0567]

약물 물질 안정성

[0568]

약물 물질에 대한 동결-해동 안정성 데이터가 표 8에 제시되었다.

표 8

소형 스텐레스 스틸 탱크 내에 충전된 아포마브에 대한 동결-해동 안정성 데이터

온도 (°C) (동결/해동)	동결-해동 주기수	투명도	색상	pH	농도 (mg/mL)	SEC (% 단량체)
허용 기준 :	기준	기준	기준	6.0 ± 0.3	20.0 ± 2.0	≥ 95%
대조군 (동결되지 않음)	0	청정합	무색	6.0	20.9	99.6
-20/25	1	청정합	무색	6.0	20.8	99.6
-20/25	2	청정합	무색	6.0	20.8	99.6
-20/25	3	청정합	무색	6.0	20.9	99.6

[0569]

표 9

소형 스텐레스 스틸 탱크 내에 충전된 아포마브에 대한 안정성 데이터

온도 (°C)	시점	투명도	색상	pH	농도 (mg/mL)	SEC (% 단량체)	IEC (% 주요 피크)	효력 (% 고유 활성)
허용	기준 :	보고	보고	6.0 ± 0.3	20 ± 2	$\geq 95\%$	Report	60 - 140%
NA	T=0	청정함	무색	5.9	20.0	99.7	63	88
-20	1 개월	청정함	무색	6.0	20.6	99.7	63	107
-20	3 개월	청정함	무색	6.0	20.6	99.7	63	82
-20	6 개월	청정함	무색	6.0	20.3	99.7	64	92
-20	9 개월	청정함	무색	6.0	20.6	99.7	64	92
-20	12 개월	청정함	무색	6.0	21.2	99.7	65	94
5	1 개월	청정함	무색	6.0	20.5	99.7	62	95
5	3 개월	청정함	무색	6.0	20.7	99.6	62	71
5	6 개월	청정함	무색	6.0	20.4	99.5	62	84
5	9 개월	청정함	무색	6.0	20.8	99.4	61	84
5	12 개월	청정함	무색	6.0	21.3	99.2	59	82

[0570]

[0571] -20°C 하에 15시간 이상 동안 동결시키고 주위 온도 하에 해동시키는 것을 3회 수행한 후에도, 단백질의 화학적 특징 상의 유의적 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 예를 들어, 아포마브는 청정한 무색 액상을 외관을 나타내었고, pH는 6.0 ± 0.3 를 유지하였으며 SEC 단량체 피크 비율은 변하지 않았다.

[0572]

스테인레스강 용기 내에서의 아포마브 안정성을 -20°C 및 5°C 하에 평가하였다 (표 9).

[0573]

샘플을 명시된 간격 하에 미니-탱크로부터 무균적으로 끌어당겼고 이를 분석하였다. 아포마브는 pH, CAC, 단백질 농도 및 IEC에 의한 % 주요 피크에 의해서는 5°C 하에서의 단백질 질상의 변화를 나타내지 않았지만, 3개월마다 SEC에 의한 0.1% 단량체 손실을 나타내었다. 5°C 하에 3개월 동안 저장하는 동안 효력 저하가 관찰되었다. 그러나, 샘플의 효력은 6개월 및 9개월 시점에서 다시 증가하였다. 따라서, 3개월 시점에서 관찰된 효력 차이는 검정 변동에 따른 것이었다. 아포마브는 pH, CAC, 단백질 농도, SEC에 의한 % 단량체, 및 IEC에 의한 % 주요 피크에 의해서는 -20°C 하에서의 단백질 질상의 변화를 전혀 나타내지 않았고, 효력 상의 유의적인 변화도 없었다. 안정성 데이터는 아포마브가 -20°C 에서 1년 이상 동안 안정하고 5°C 에서 3개월 동안 안정하다는 사실을 나타낸다.

[0574]

결론

[0575]

제형 스크리닝 연구를 수행하여 아포마브에 대한 제형을 선별하였다. 240 mM 트레할로스 이수화물 및 0.02% 폴리소르베이트 20을 수반한 완충제로서 나트륨 아세테이트, 히스티딘 아세테이트 및 인산나트륨을 사용하여 pH 범위 4.0 내지 7.0에 걸친 pH 스크린은, 아포마브가 pH 6.0 하의 용액에서 가장 안정하다는 사실을 나타내었다. 따라서, 20 mM 히스티딘 아세테이트, 240 mM 트레할로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0)으로 이루어진 제형을 개발하였고, 이는 실험상 안정한 것으로 입증되었다. 이러한 제형을 사용하여, 아포마브가 5°C 에서 12개월 이상 동안 안정한 것으로 밝혀졌다. 더우기, 아포마브는 316L 스테인레스강 용기에서 저장한 경우에도 -20°C 하에 12개월 이상 동안 안정하였고 5°C 하에서도 3개월 동안 안정한 것으로 밝혀졌다. 아포마브는 또한, 3주기 이하의 동결/해동 하에서도 안정한 것으로 밝혀졌다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 HER2의 세포외 도메인의 도메인 I 내지 IV (각각 서열 19 내지 22)를 도시한 것이다.

[0059]

도 2A 및 2B는 뮤린 모노글로불 항체 2C4의 가변 경쇄 (V_L) (도 2A) 및 가변 중쇄 (V_H) (도 2B) 도메인의 아미노산 서열 (각각 서열 1 및 2); 인간화 2C4 버전 574의 V_L 및 V_H 도메인의 아미노산 서열 (각각 서열 3 및 4); 및 인간 V_L 및 V_H 컨센서스 골격 (hum κ1, 경쇄 카파 아군 I; humIII, 중쇄 아군 III)의 아미노산 서열 (각각 서열 5 및 6)을 정렬하여 도시한 것이다. 별표는 인간화 2C4 버전 574와 뮤린 모노글로불 항체 2C4 간의 차이, 또는 인간화 2C4 버전 574와 인간 골격 간의 차이를 표시한 것이다. 상보성 결정 영역 (CDR)이 사각 팔호 ([])

안에 있다.

- [0060] 도 3A 및 3B는 페르투주마브 경쇄의 아미노산 서열과 중쇄의 아미노산 서열 (각각 서열 15 및 16)을 도시한 것이다. CDR이 진하게 표시되었다. 상기 경쇄와 중쇄의 분자량 계산치는 23,526.22 Da 및 49,216.56 Da이다 (환원된 형태의 시스테인). 탄수화물 부분이 중쇄의 Asn 299에 부착된다.
- [0061] 도 4A 및 4B는 각각 본래 아미노 말단 신호 펩티드 서열을 포함한, 페르투주마브 경쇄의 아미노산 서열과 중쇄의 아미노산 서열 (각각 서열 17 및 18)을 도시한 것이다.
- [0062] 도 5는 HER2의 이종-이랑체성 결합 부위에 2C4가 결합함으로써, 활성화된 EGFR 또는 HER3과의 이종-이랑체화를 방지시킨다는 것을 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0063] 도 6은 MAPK 및 Akt 경로에 대한 HER2/HER3의 커플링을 도시한 것이다.
- [0064] 도 7은 트拉斯투주마브의 활성과 페르투주마브의 활성을 비교한 것이다.
- [0065] 도 8은 이온 교환 (IEX) 분석에 의한 페르투주마브 제형의 안정성을 도시한 것이다.
- [0066] 도 9는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 분석에 의한 페르투주마브 제형의 안정성을 도시한 것이다.
- [0067] 도 10은 상이한 제형 중에서의 페르투주마브의 물리적 안정성을 반영한 것이다.
- [0068] 도 11은 페르투주마브 액상 제형의 교반 연구로부터의 결과이다.
- [0069] 도 12는 페르투주마브 액상 제형의 또 다른 교반 연구로부터의 결과이다.
- [0070] 도 13은 페르투주마브 제형의 동결-해동 연구로부터의 결과이다.
- [0071] 도 14A 및 14B는 트拉斯투주마브 경쇄의 아미노산 서열 (서열 13) 및 중쇄의 아미노산 서열 (서열 14)을 도시한 것이다.
- [0072] 도 15A 및 15B는 변이체 페르투주마브 경쇄 서열 (서열 23) 및 변이체 페르투주마브 중쇄 서열 (서열 24)을 도시한 것이다.
- [0073] 도 16A 및 16B는 IgG 항체에서 흔히 관찰되는 올리고당류 구조를 도시한 것이다.
- [0074] 도 17A 및 17B는 특이적 항-IgE 항체 E25, E26, HAE1 및 Hu-901의 경쇄 및 중쇄의 서열 (서열 37 내지 44)을 도시한 것이다. 도 17A에서는, 가변 경쇄 도메인이 잔기 VEIK, 잔기 111에서 종결된다. 도 17B에서는, 가변 중쇄 도메인이 잔기 VTVSS, 잔기 120 근처에서 종결된다.
- [0075] 도 18A는 뮤린 2H7의 가변 경쇄 도메인 (V_L)의 아미노산 서열 (서열 25), 인간화 2H7v16 변이체의 가변 경쇄 도메인 (V_L)의 아미노산 서열 (서열 26), 및 인간 카파 경쇄 아군 I의 아미노산 서열 (서열 27)을 비교한 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7v16의 V_L 의 CDR은 다음과 같다: CDR1 (서열 57), CDR2 (서열 58), 및 CDR3 (서열 59).
- [0076] 도 18B는 뮤린 2H7의 가변 중쇄 도메인 (V_H)의 아미노산 서열 (서열 28), 인간화 2H7v16 변이체의 가변 중쇄 도메인 (V_H)의 아미노산 서열 (서열 29), 및 중쇄 아군 III의 인간 컨센서스 서열 (서열 30)을 비교한 서열 정렬이다. 2H7 및 hu2H7v16의 V_H 의 CDR은 다음과 같다: CDR1 (서열 60), CDR2 (서열 61), 및 CDR3 (서열 62).
- [0077] 도 18A 및 도 18B에서, 각 쇄 중의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 표시된 바와 같이 골격 영역 FR1 내지 FR4에 의해 플랭킹되어, 사각 팔호 안에 봉입되어 있다. 2H7은 뮤린 2H7 항체를 지칭한다. 두 서열 열 사이의 별표는 두 서열 간의 상이한 위치를 나타낸다. 잔기 넘버링은 문헌 [참고: Kabat et al. *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 따르고, 삽입물은 a, b, c, d, 및 e로서 제시된다.
- [0078] 도 19는 서열 31 내지 36을 수반한 3가지 상이한 VEGF 항체의 가변 도메인 서열을 도시한 것이다.
- [0079] 도 20은 다음 아포마브 샘플의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 용출 프로파일을 도시한 것이다: (a) 대조군, (b) pH 4.0에서 제조된 제형, (c) pH 5.0에서 제조된 제형, (d) pH 6.0에서 제조된 제형 및 (e) pH 7.0에서 제조된 제형. 제형화된 샘플은 분석에 앞서 40°C 하에 2개월 동안 저장하였다.
- [0080] 도 21은 저장 동안 아포마브 항체 단량체 상의 손실에 대한 pH 비율 프로파일을 도시한 것이다. SEC에 의한 단

량체 역학을 30°C 및 40°C 하에서의 저장 동안 모니터링하였고, 1차 반응속도 정수를 계산하였다.

[0081] 도 22는 다음과 같은 아포마브 샘플의 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) 용출 프로파일을 제공한다: (a) 대조군, (b) pH 4.0에서 제조된 제형, (c) pH 5.0에서 제조된 제형, (d) pH 6.0에서 제조된 제형 및 (e) pH 7.0에서 제조된 제형. 제형화된 샘플은 분석에 앞서 40°C 하에 2개월 동안 저장하였다.

[0082] 도 23은 저장 동안 IEC 주요 피크 상의 손실에 대한 pH 비율 프로파일을 도시한 것이다. IEC에 의한 주요 피크 역학을 30°C 및 40°C 하에서의 저장 동안 모니터링하였고, 1차 반응속도 정수를 계산하였다.

[0083] 도 24는 인간 Apo-2 리간드 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 45) 및 그의 유래된 아미노산 서열 (서열 46)을 도시한 것이다. (서열 45 중의) 뉴클레오티드 위치 447에서의 "N"은 뉴클레오티드 염기가 "T" 또는 "G"일 수 있다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0084] 도 25A 및 25B는 1998년 11월 19일자로 WO 98/51793에 공개된 바와 같은, 인간 DR5 수용체의 411개 아미노산 서열 (서열 47), 및 코딩 뉴클레오티드 서열 (서열 48)을 도시한 것이다.

[0085] 도 26A 및 26B는 1998년 8월 20일자로 WO 98/35986에 공개된 바와 같은, 인간 DR5 수용체의 440개 아미노산 서열 (서열 49), 및 코딩 뉴클레오티드 서열 (서열 50)을 도시한 것이다.

[0086] 도 27은 아포마브 7.3 중쇄 아미노산 서열 (서열 51)을 도시한 것이다.

[0087] 도 28은 아포마브 7.3 경쇄 아미노산 서열 (서열 52)을 도시한 것이다.

[0088] 도 29는 16E2 중쇄 아미노산 서열 (서열 53)과 아포마브 7.3 중쇄 아미노산 서열 (서열 51)을 정렬한 것이다.

[0089] 도 30은 16E2 경쇄 아미노산 서열 (서열 54)과 아포마브 7.3 경쇄 아미노산 서열 (서열 52)을 정렬한 것이다.

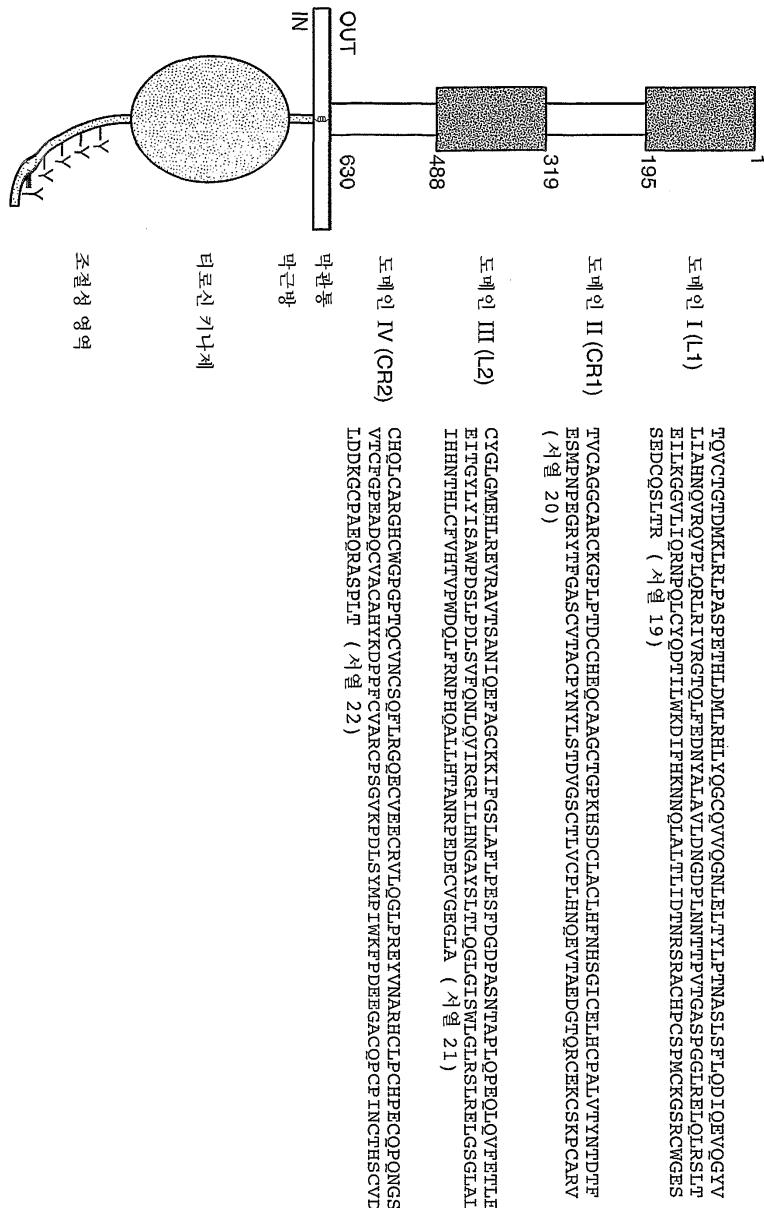
[0090] 도 31A 및 31B는 아포마브 7.3의 가변 중쇄 아미노산 서열 (도 31A; 서열 55) 및 가변 경쇄 아미노산 서열 (도 31B; 서열 56)을 도시한 것이다. CDR 잔기가 진하게 표시되었다.

[0091] 도 32는 성숙한 2H7v16 경쇄와 2H7v511 경쇄 (각각 서열 63 및 64)를 정렬한 것이다. 서열은 카바트 (Kabat) 가변 도메인 잔기 넘버링과 Eu 불변 도메인 잔기 넘버링을 이용하여 나타내었다.

[0092] 도 33은 성숙한 2H7v16 중쇄와 2H7v511 중쇄 (각각 서열 65 및 66)를 정렬한 것이다. 서열은 카바트 가변 도메인 잔기 넘버링과 Eu 불변 도메인 잔기 넘버링을 이용하여 나타내었다.

도면

도면1



도면2A**가변 경쇄**

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQRP	*
	** * *** *	*		
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQKP	*
		*	***	
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC	[RASQSISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLI Y [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDF TFISSVQA		
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLI Y [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDF TLISSLQP		
	*	*****		
hum kI	GKAPKLLI Y [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDF TLISSLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK	(서열 1)	
	* *	*	*	
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(서열 3)	
	*** *			
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(서열 5)	

도면2B**가변 중쇄**

	10	20	30	40
2C4	EVQLQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTD YTM D]	WVKQS	*
	** * * * * *			*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTD YTM D]	WVRQA	** * *
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * * * *	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** * * * * *	*	** *	
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLT FED TAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTT LTVSS	(서열 2)
	*** *		**	
574	QMNSLRAED TAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTLVT VSS	(서열 4)

hum III	QMNSLRAED TAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTLVT VSS	(서열 6)

도면3A**페르투주마브 경쇄에 대한 아미노산 서열**

1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC	KASQDV SIGVA	WYQQRP				
	SQDV SIGVA	WYQQRP				
	20	30	40	50	60	
	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC	KASQDV SIGVA	WYQQRP			
	70	80	90	100	110	120
	RFSGSGSGTDF TLT ISSLQ	PEDF ATYYC	QQYYIYPYT	FGQGTKVE	I KRTVAAPS	VIFPP
	130	140	150	160	170	180
	SDEQLKSGTASVVCLNNF	PREAKVQWKVDNAL	QSGNSQESVTE	QDSKDSTY	SLSTLT	
	190	200	210			
	LSKADYEKHKVYACEVTH	QGLSSPVTKSFNR	GEC			

도면3B

페르투주마브 중쇄에 대한 아미노산 서열

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFTDYTEMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNPGGSIY
 10
 20
 30
 40
 50
 60
 70 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSPF YFDYWQGTLTVSSA
 80
 90
 100
 110
 120
 130 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDLYFPEPVTVSNSGAL TSGVHTFP
 140 A
 150 L
 160 V
 170 T
 180 Q
 190 S
 200 S
 210 V
 220 C
 230 P
 240 E
 250 F
 260 P
 270 K
 280 D
 290 K
 300 *
 310 R
 320 V
 330 N
 340 Q
 350 P
 360 E
 370 T
 380 K
 390 P
 400 V
 410 L
 420 S
 430 C
 440 M
 448 S

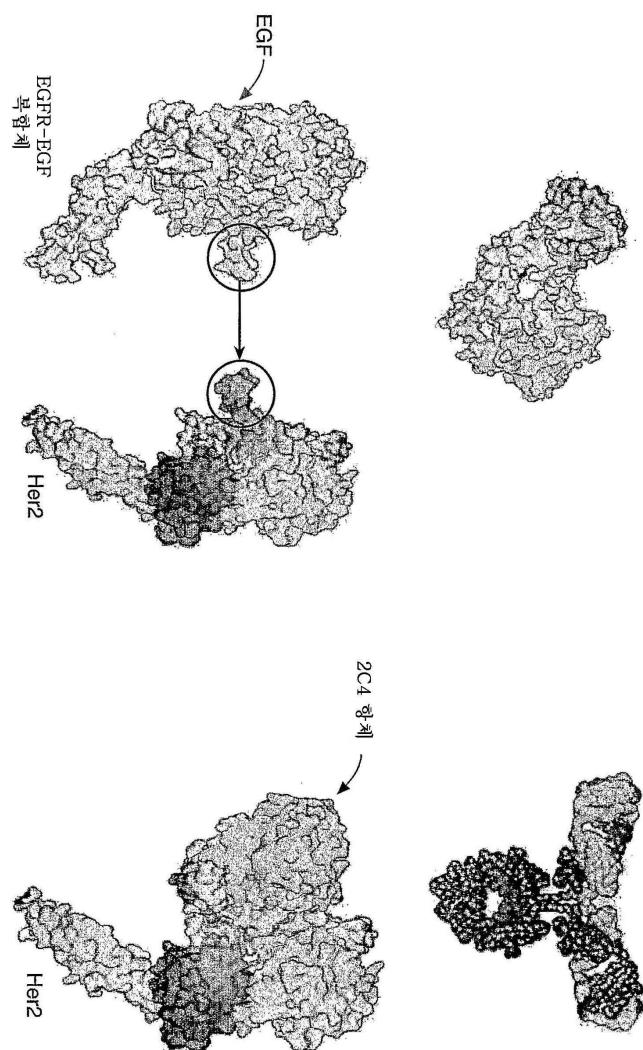
도면4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C K A S
 46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I V S A S V R V T G V P S R F S G S G S G T D F
 91 T L T I S S I L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F
 136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
 181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V V A C E V T H Q G L S S P V T
 226 K S F N R G E C 233 (서설 17)

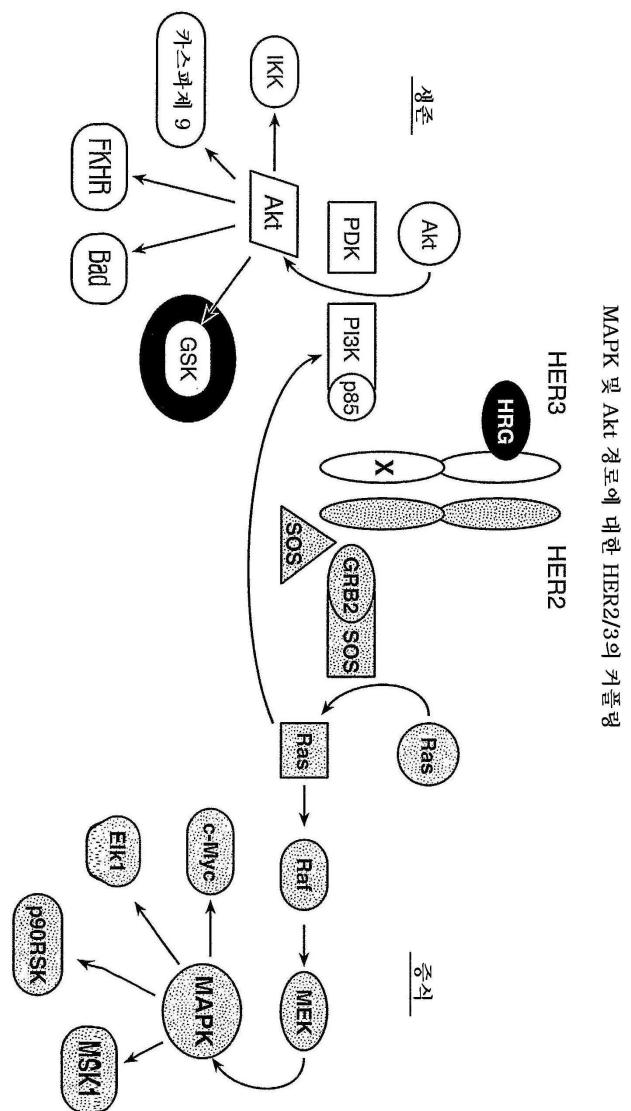
도면4B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 90
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 135
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L I L G G P S V F L F P P K P K D 225
 271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 270
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 315
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 360
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H 405
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G 450 (x) 18 455

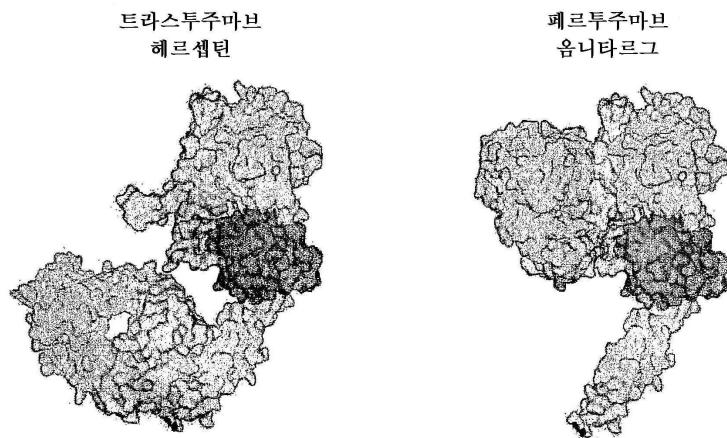
도면5



도면6

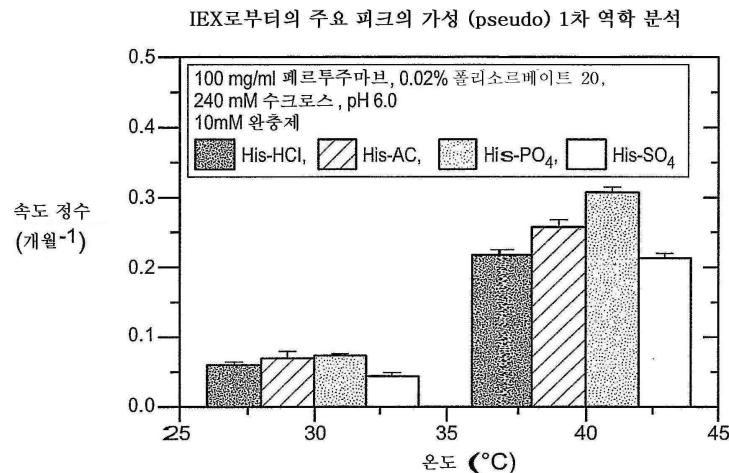


도면7

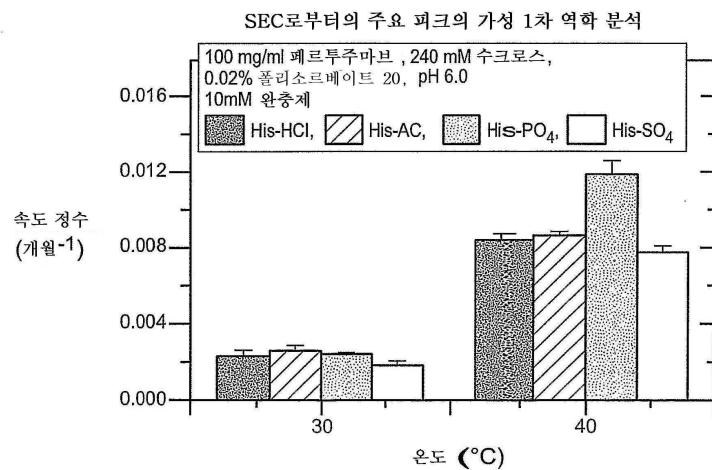


- JM 근처에서 IV 내에 결합한다.
- 수용체 쉐딩에 대항하여 보호한다.
- 수용체 하향 조정에 적당히 영향을 미친다.
- 보조-수용체로서의 HER2의 역할에 대한 약간의 효과를 나타낸다.
- 이량체화 계면에서 II 내에 결합한다.
- 수용체 쉐딩을 방지하지 않는다.
- 수용체 하향 조정에 적당히 영향을 미친다.
- 보조-수용체로서의 HER2의 역할에 대한 주요 효과를 나타낸다.

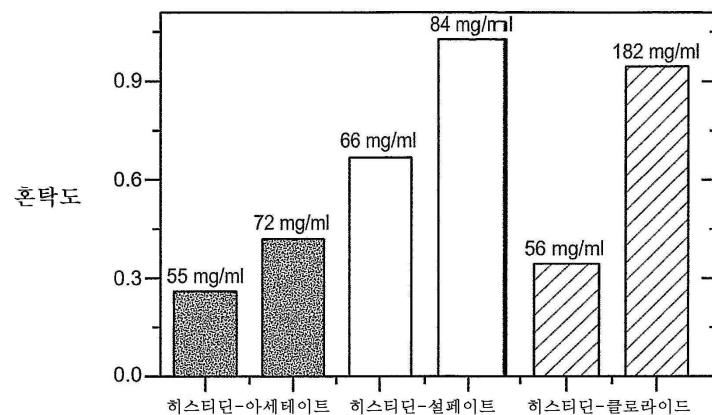
도면8



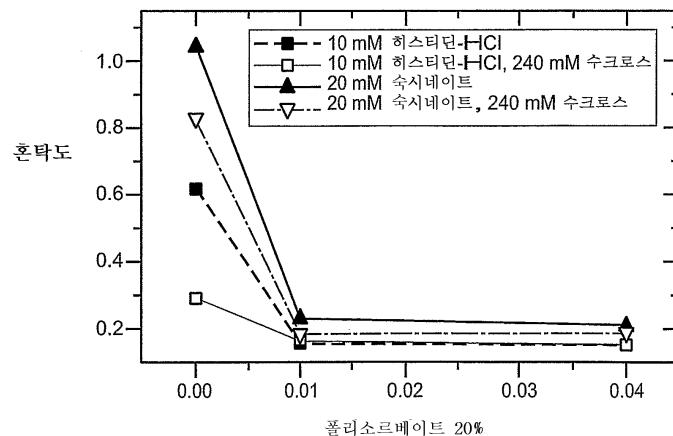
도면9



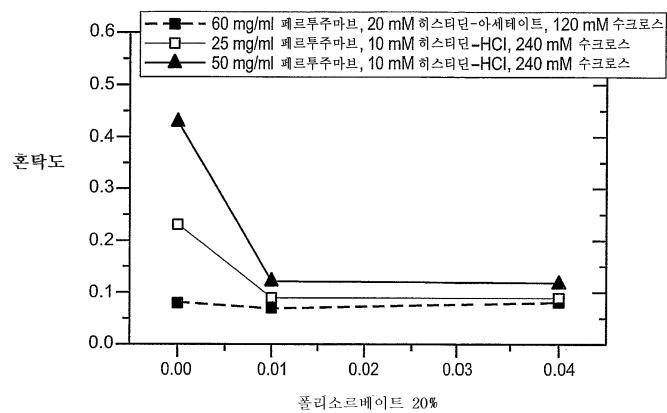
도면10



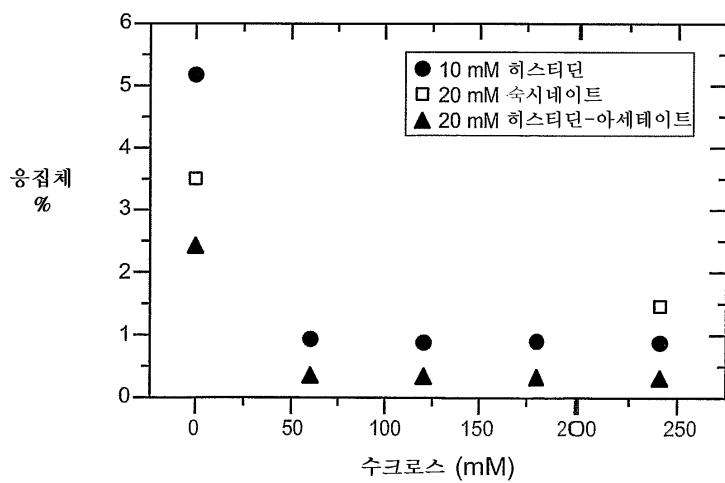
도면11



도면12



도면13



도면14A

정체

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K
 46 L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 91 H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 136 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
 195 210 214
 195 210 214

도면14B

증례

1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L	15	30	45
46	E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D	60	75	90
91	T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S	105	120	135
136	K S T S G G T A A L G C L V K D Y P P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S	150	165	180
181	G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K	195	210	225
226	T H T C P P C P A P E L L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S	240	255	270
271	H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y <u>N</u> S T Y R V V S V L T V L H Q D	285	300	315
316	W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E	330	345	360
361	M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G	375	390	405
406	S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G	420	435	449

도면15A

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K
 15
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
 60
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q I K S G T A S V
 105
 136 V C I L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
 150
 181 T L T L S K A D V E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
 195
 210
 217
 180
 165
 120
 90
 75
 45
 30
 135
 180
 217
 (서열 23)

도면15B

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
 46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
 91 T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K R K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E R Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 315 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449
 420 435
 (서열 24)

도면16A

IgG 항체에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조			
구조	약식	질량	
$\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$	$\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$	$\text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2) \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3) \end{array} \right\} > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	$\text{Man}5$	1235
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	$\text{G}-1$	1260
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	$\text{G}0-\text{F}$		1317
$\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$	$\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$	$\text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	
	$\text{Man}6$		1398

도면16B

LG 홍채에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조		
구조	질량	원인
$\text{Fluc}\alpha(1\rightarrow 6)$		
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\left\{\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3) \end{array}\right\} > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	1423	G1-1
$\text{Fluc}\alpha(1\rightarrow 6)$		
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	1463	G0
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$		
$\text{Fluc}\alpha(1\rightarrow 6)$		
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	1626	G1 (1-6)
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$		
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$		
$\text{Fluc}\alpha(1\rightarrow 6)$		
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	1788	G2
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 3)$		
도면 16B에 나타난 질량은 $(\text{M}+\text{Na})^+$ 값에 상응한다		

도면17A

항-IgE 항체: 경 쇄 (V_L 및 C_L 도메인)

10	20	30	40	50	60	70	80
D[Q]LIGSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASOSV]	YDGDSMMWY	QQPKGKAPL	LIV[AASVIES]	GVP[SRFGSG]	SGTDFLTIS
D[Q]LIGSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASKED]	[EGGSYIN]WY	QQPKGKAPL	LIV[AASVIES]	GVP[SRFGSG]	SGTDFLTIS
HAE1	D[Q]LIGSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASKPD]	[EGGSYIN]WY	QQPKGKAPL	LIV[AASVIES]	GVP[SRFGSG]
Hu-901	D[Q]LIGSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASOSIG]	[ENIHD---]	WY	QQPKGKAPRL	LIV[YASESIS]

GTFSRFGSG SGTFILTLIS

90	100	110	C_L [개념]		
SLOPEDFATY	YC[QOSHEDPY	TFGGCTKVEI	KRT	VAAPSVFIRPPSDEQIKSGTASVCLNNYPREAKVQVKDNALQSGNSOESVTEQD	
E25	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 37			
E26	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 38			
HAE1	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 39			
Hu-901	R[LE]PEDFATY	YC QQSDDSWP[T	FGGCTKVEI	KRT	VAAPSVFIRPPSDEQIKSGTASVCLNNYPREAKVQVKDNALQSGNSOESVTEQD

E25	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 37
E26	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 38
HAE1	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 39
Hu-901	SKDSTYSLSLTTISKADYKHKVYACEVTHQGJSSPVKSFNRGEC	서열 : 40

도면17B

형-IgE 형-제: 중쇄 (V_H 및 C_H 도메인)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
E25	EVOLVESGGG	IYQPGGSLRL	SCAVGVSIT	SIGYSNNW	IRO	AEGKGLEWA	[SITYDGSTNW	NPSVKG]	RITI
E26	EVOLVESGGG	IYQPGGSLRL	SCAVGVSIT	SIGYSNNW	IRO	AEGKGLEWA	[SITYDGSTNW	NPSVKG]	RITI
HAE1	EVOLVESGGG	IYQPGGSLRL	SCAVGVSIT	SIGYSNNW	IRO	AEGKGLEWA	[SITYDGSTNW	NPSVKG]	RITI
Hu-901	E VOLVESGGAE	VVKPQEPSSVVKY	SCAVGVSIT-	S M	MILEW	YFQ	AEGKGLEWA	E ISPCTFTNY	NEKEKA
	100	110ab	120	C _H	개시				
E25	TAVYYCAR [GS HYFGHMHFAV]	WGCGTLTVSS	ASTKGPSVTPLAPSSK	STSGGA	ALGCLVKDYEPEPVTVWSN	GALTSGVHTTPAVI	LOSSGLY	LSS	
E26	TAVYYCAR [GS HYFGHMHFAV]	WGCGTLTVSS	ASTKGPSVTPLAPSSK	STSGGA	ALGCLVKDYEPEPVTVWSN	GALTSGVHTTPAVI	LOSSGLY	LSS	
HAE1	TAVYYCAR [GS HYFGHMHFAV]	WGCGTLTVSS	ASTKGPSVTPLAPSSK	STSGGA	ALGCLVKDYEPEPVTVWSN	GALTSGVHTTPAVI	LOSSGLY	LSS	
Hu-901	TAVYYCAR	ES HFSGSNSYDFY	WGCGTLTVSS	ASTKGPSVTPLAPSSK	STSGGA	ALGCLVKDYEPEPVTVWSN	GALTSGVHTTPAVI	LOSSGLY	LSS
E25	VVTVVPSSSLGQPTTICVNHHKPNSNTIKVDDKKVEPKSCDKH	TCPCPAELIGAPS	VTHPPPKPDTMISRTPEV	TCVVWDV	SHEDEPEKFNWV	DGE			
E26	VVTVVPSSSLGQPTTICVNHHKPNSNTIKVDDKKVEPKSCDKH	TCPCPAELIGAPS	VTHPPPKPDTMISRTPEV	TCVVWDV	SHEDEPEKFNWV	DGE			
HAE1	VVTVVPSSSLGQPTTICVNHHKPNSNTIKVDDKKVEPKSCDKH	TCPCPAELIGAPS	VTHPPPKPDTMISRTPEV	TCVVWDV	SHEDEPEKFNWV	DGE			
Hu-901	VVTVVPSSSLGQPTTICVNHHKPNSNTIKVDDKKVEPKSCDKH	TCPCPAELIGAPS	VTHPPPKPDTMISRTPEV	TCVVWDV	SHEDEPEKFNWV	DGE			
E25	VHNAKTKPREFEQYNSTRYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTI	SKAGQPREPVQVTLPS	REEMTKNGVSILCIVK	KFYPDI	AVEME				
E26	VHNAKTKPREFEQYNSTRYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTI	SKAGQPREPVQVTLPS	REEMTKNGVSILCIVK	KFYPDI	AVEME				
HAE1	VHNAKTKPREFEQYNSTRYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTI	SKAGQPREPVQVTLPS	REEMTKNGVSILCIVK	KFYPDI	AVEME				
Hu-901	VHNAKTKPREFEQYNSTRYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTI	SKAGQPREPVQVTLPS	REEMTKNGVSILCIVK	KFYPDI	AVEME				
E25	SNGQPENNYYKTPPPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRSWQOGNFTCS	VMSVMHALNH	HYTO	QSLSLSPGK	서열 :	41			
E26	SNGQPENNYYKTPPPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRSWQOGNFTCS	VMSVMHALNH	HYTO	QSLSLSPGK	서열 :	42			
HAE1	SNGQPENNYYKTPPPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRSWQOGNFTCS	VMSVMHALNH	HYTO	QSLSLSPGK	서열 :	43			
Hu-901	SNGQPENNYYKTPPPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRSWQOGNFTCS	VMSVMHALNH	HYTO	QSLSLSPGK	서열 :	44			

도면18A

가변 경쇄 도메인의 서열 정렬

	FR1		CDR1	
	10	20	30	40
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVMTMC [RASSSVS-YMH] WYQQKP * * * * * * * *			
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASSSVS-YMH] WYQQKP * * * * *			
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSIISNYLA] WYQQKP			
	FR2	CDR2	FR3	
	50	60	70	80
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA * * * * * * * *** ****			
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP * * * * *			
hum kI	GKAPKLLIY [AAASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP			
	CDR3		FR4	
	90		100	
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPPT] FGAGTKLELKR * * * * *			
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPPT] FGQGTKVEIKR * * * * *			
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR			

도면18B

가변 중쇄 도메인의 서열 정렬

	FR1		CDR1		
	10	20	30	40	
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS [GYTFTSYNMH] WVQQT *** * * * * * * * * * *				
hu2H7.v16	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNMH] WVRQA * * * * *				
hum III	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA				
	FR2	CDR2	FR3		
	50	a	60	70	80
2H7	PROGLEWIG [AIYPNGDTSYNQKFKG] KATLTVDKSSSTAYM ** * * * * * * * * * *				
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPNGDTSYNQKFKG] RFTISVDKSKNTLYL * * * * * * * * * * *				
hum III	PGKGLEWVA [VI SGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNSKNTLYL				
	CDR3		FR4		
	abc	90	100abcde	110	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVVYSNSYWYFDV] WGTGTTVTVSS ** * * * * * * * * *				
hu2H7.v16	QMNSLRRAEDTAVYFCAR [VVVYSNSYWYFDV] WGQGTLVTVSS ***** * * * *				
hum III	QMNSLRRAEDTAVYFCAR [GRVGYSLY---DY] WGQGTLVTVSS				

도면19항-VEGF 항체 가변 도메인 서열

항-VEGF 가변 경쇄 서열:

DIQMTQTTSSLASALGDRVIITCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGS
 GSGTDXSLTISNLEPEDIATYYCQQYSTVPWTFGGGTKLEIK
 (서열 31)

항-VEGF 가변 중쇄 서열:

EIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKOAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFK
 RRFTFSLETSASTAYLQISNLKNDDTATYFCAKYPHYGGSSHWYFDVWGAGTTVIVSS
 (서열 32)

항-VEGF 항체 가변 경쇄 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
 (서열 33)

항-VEGF 항체 가변 중쇄 서열:

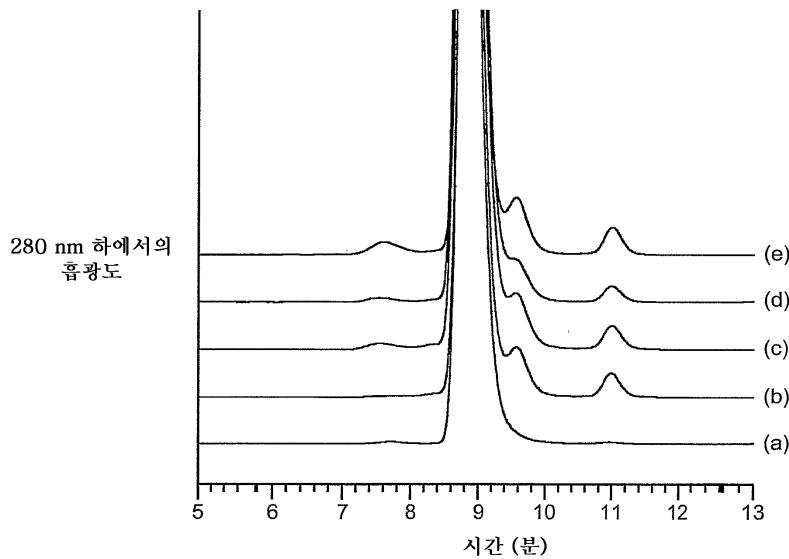
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFK
 RRFTFSLETSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGTLVIVSS
 (서열 34)

항-VEGF 항체 가변 경쇄 서열:

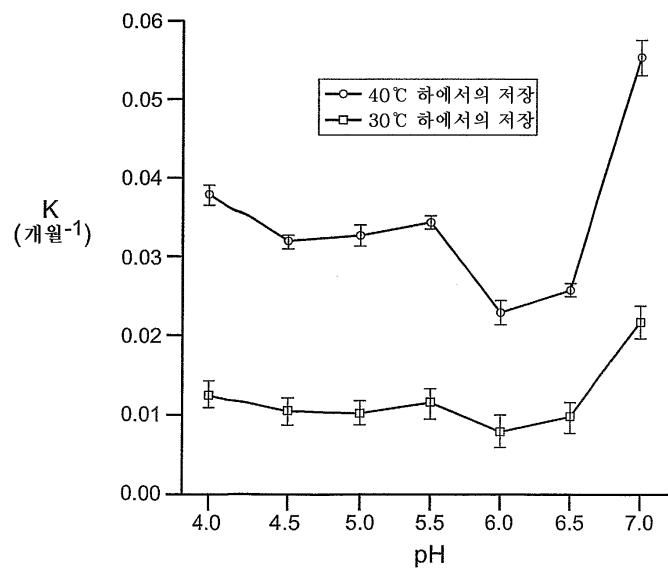
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
 (서열 35)

항-VEGF 항체 가변 중쇄 서열:

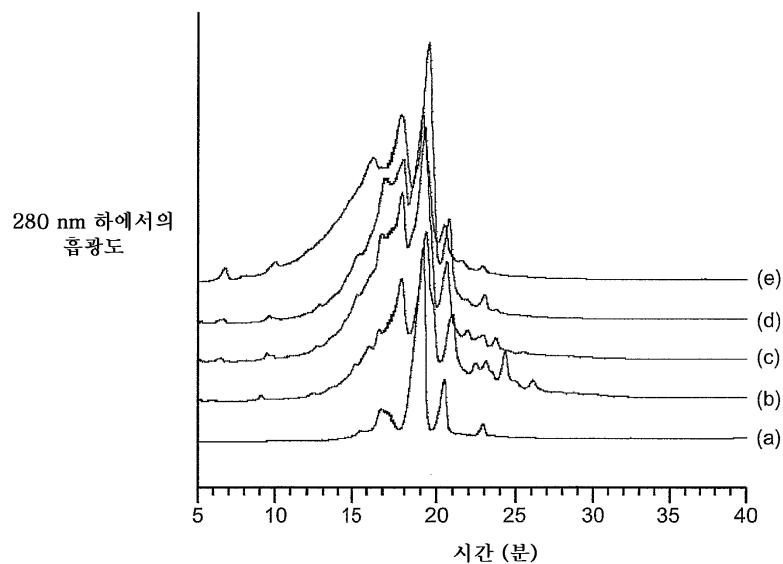
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFK
 RRFTFSLETSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVIVSS
 (서열 36)

도면20

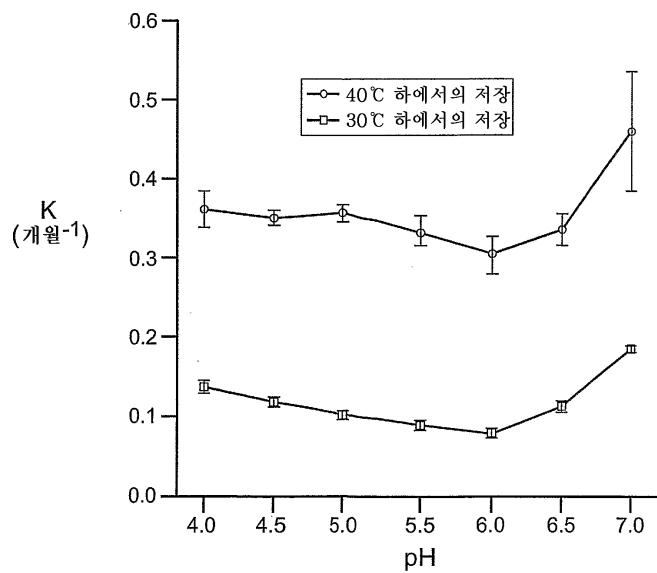
도면21



도면22



도면23



도면24

도면25A

1 CCCCACGCCG OCCATTAATC ASCACCGCC CGAGAACCC CGAATCTT GCACCCCAA AATACACGA CTAACCGCA TCTTAA GGGCTGAAC
 GGGTGGCGAG GGTATTATAG TCTGGCCG GCCTTGGG GCGTAGAGA CGGGGTTGCT ATTAAGGCT AGATCAATC CCGACTTG
 101 CCACGGCTT GGAGGACTAT AACAGGTTT CCTACGCCA TGCACACAG GGAGCACAC GCGGAGCG GCTGGGGC CTGGGGG CCGGAGG
 GGTGCCGGA CTCCTGATA TTCTCGAA GGATGGGGT ACCTGTGTC CCTGGGGC CGGGCGG GGCCTTTCG GTGCCGGTC
 1 GACCCCGG AAACCCCG AGCTTGGG CTCCTGGG M etglgylasn M etglgylasn Alparalaa laSGlylaln aarglysarg Hisgyproyg
 201 GACCCGGGA GCGGGGGG GCGAGGCTG GCTGGGGT CCCAACACC CTCAGGAGCCT CTCAGGAGC GGTCTGAG TGCTCTGAG CTGAGCTCC
 22 PROArg1 ualaArg1y AlaArgProg lyleArgVa 1ProlySthr LeuValleu alvalalai avalleuleu LeuValsera lagluseura
 301 TCTGATCACC CAAACAGCC TACCTCCA CGAGAGCC GGCACACAC AACAGAGTC CAGCCCTCA GAGGATTG CTCACCTG ACACCATC
 AGACTGAGTG GGTGTTGTTGG ATCGAAGGGT CGTCCTGG CCGGTGTTG TTTCCTGAG GTCGGGGAGT CTCCTACA CAGGGAGC TTTCATAG
 55 LeuIleThr GlngIlaaspl euIal-ProG1 nlgmAla AlArgIleG1 lyleArgSe ISeProSer GluIyleLeu ysProProIle YhsIle
 401 TCAGBAGG GAGAGGCTG CTCCTGG AACATGAC AACATGAG CTCCTGG AACCTGG CTCCTGGG AACCTGGCCTT GCGGCTCC AGGTGATT
 AGTCCTGCTG CTCCTGAC GTGAGACCG TTTCATGCTG TTCTGAGTC TTACGGGG AAAAGCCCA CGGGGGGG TCACTGGGCTC AGATGGCC
 88 SerGluAspG lylAlgAspCy sIesSerCys LysTrgLyg lnsAspTse ThrhIstP AsnAspIleu EuphCysle uArgCysIle ArgCysAspSer
 501 CAGGTTAATG GAGCTAATG CCTGGACCA CGACAGAA CACAGTTG CAGTCGGAG AGGGACCTT CGGGAGAA GATTCCTG AGATGGCC
 GNCACCTCA CCTGATCA GCGACGTTG GCGGTTTT GTCACACA GTCACGGTC TTCCGTGAA GGCCCTTTT CTAAGAGGC TCTAACGCG
 122 GlyIleIa 1GlnIleSer ProGlyThr hIrrhAg sIleValcys llyGlyIleG1 lyleArgIleIaAspSerProg lumeCysArg
 601 GAGCTGGCG AGAGGAGTC CGAGGGAT GTGGAAGTC CACCTGGG TGAATCAA TGTGTCACA AGAGTCAGG CTCACATA
 CTTCAGGGG TTTCAGCTG AGCTCTCA CGCTGTCAG CCACATACAT GTGGAGCTC ACTGTTCTC AGCTGCTG TTCTAGTCG TGTGAGAT
 155 LysGlySarg ThrlGlyCysP roArgLysIle tValIleVal GluAspPst hrProIlePse RasIleGlu CystIleHsl YsgluerG1 YleIleIle
 701 GGAGTCACAG TCTGACCGT AGCTTCAATT GTGGCTGTT GTGTTGAA GTCTTACTG TGGAGAAAG TCCTCTCTA CCTGAAAGC ATCTCTCG
 CCTCTAGTC AACGGTGGCA TCGAAGTAA CACGACACA AACAGGTT CAGAATGAC ACCUTCTTC AGGAGGAAT GGACTTTCG TAGAGGAGC
 188 GlyValThr alalalalava IvalleuIle ValIalalvaIlp heIvallySly ssarleuIle TriplIlySlyv allelproTy IleIlySlygIle
 801 GTGGGGTGG GACCTGGAG CGAGTCACA AGCAGTCACA TGTGTCACA TGTGTCATA TGTGTCAGC TGTAGTCAGC TGTAGTCAG
 CACCAACCC CGCTGACTGT CTTCAGCTG TGTGTCAGG CAGCTGCGT ATCGTACCTG ACTGTTCTCAG TGTAGTCAGC TGTAGTCAG
 222 GlyGlyG1 YasProGlu ArgValAlpa rgsserSrgI nlgProGly AlAgluAspA smIleLeus nglIleIal SerIleIag InProIrgIn

도면25B

901 GGTGCTCTAG CAGGAATG AAGTCAGGA GCAACAGAG CCAACGGTG TCAACATGTT GTCGCCCGGG GACTCAGAGG ATCTGCTGA ACCGGAGAG
 CCAGGAGCTC GTCCGTTTAC TTCAGCTCTC CGCTGTTCTC GTCCTTCAC AGTTCGAA CAGGGGGCC CTCAGCTCTG TAGAACGCTT TGGCGCTT
 255 ValProIu GluGluMet IuValGlnIu ValProIu ProThrGly alaSmethe uSerProGly GluSerGlu IleLeuGlu IuProAlGlu
 1001 GCTGAAAGGT CTGAGGAGG GAGGTGCTG GTCAGGAGA ATGAGGAGTA TCCACTGAG ACTCTAGAC AGTCAGTGA TGACTTGCA GACTGTTGCG
 CACTTCCA GAGTCCTC CTCCGAGC CAAAGCTGT TACTCCAT AGGTGTCGCT TAGACTCTG AGCTGAGCT AGCTAAACT CTGAAACCG
 288 AlaGluGlu ArgLysArg GargLeu ValProAla singlelys ProProAlu ThrLeuArg IncySheas paspheala AspIeuPrc
 1101 CCTTGGTACTC CTGGAGCG CTCACTAGA AGTTGGCT CTCAGCAAT GAGAAAGG TGCCTAACG TGCAGGCG GGCACAGG ACATGCTGA
 GGAACCTGAG GACCTCGCG GAGTCTCT TCAACCGCA GTCACGTTA CTCAGCTTC ACCGCTTG ACTCCTGCG CGCTGRCG TCTGACAT
 322 PheAspE RTProIuPro LeuMetArgIu ysLysGlyLeu MetAspAsn GluIleLysV alaIalysAla GlyHisArga SpinLeuYr
 1201 CAGCATCTG ATAAGTGGG TCAACAAAC CGGGGAGAT GCTCTGCTC AGACCTGT GCTATCTG GAGACCTGG GAGAGGACT TGCCAGCAG
 GTGCTACAC TATTCAAC AGTTCTTG GCCCCTCA CGAACGAGG TGTGGAGCA CTACGAACT CTCGGACC CTCCTCTGA AGCTTGTC
 355 ThrMetIeu IleLySrpV alaLysIstn rGlyArgAsp AlasLeuValIu isGlyIeuLeu uSpaIaLeu GluThrLeuGly LysIuArgle uAlaLysGln
 1301 AACATGAGG ACCACTGT GAGCTCTGA AAGTCATGT ATCTAGAGG TATGGAGC TCTGGCTGT CCTAAGTGT ATCTCTCA GGAGTGGAGA
 TTCTTAATCC TGGAAATAA CTGGAGCT TTCAGTACA TGTAGTTC ATTACCTG AGCGGAACT GATTCACAC TAAGGAGT CCTTCACT
 388 LysIeGluA sphIleIle userSergly LysPheMetIu LysIeuLysIu YasnIaAsp SerAlaxAs serOC*
 1401 CCTTCCTCTGG TTAACTTTT TTCTGGAAA AGCCAACTG GACTCTGAG ACTAGGAAAG TGCACATGAC CGTACTGGA AGAACTCTC
 GGAGGGAGC AAATGGAAA AGAGCTTTT TCGGTGTCG CTGAGCTCG TCACTCTTC AGCGTGTAA CAGTGTACTG GCCTGACT TCTTGAGAG
 1501 CCTTCACACA TCACCCAGTG GATGGACAT CCTGTAACCTT TCACTGCACT TTGGCTTAT TTATTAAGC TGAATGAT AATAGACA CTAAAGGAAT
 GGTAGCTGT AGTGGCTAC CTACCTGTA GGACATGAA AAGTGTACG AACCGATAA AAATATCG ACTTAACTA TTATCTGTG TATACCTTA
 1601 GTCCTGATCA TTCCGTTGTG GGTGTTCTG AGATGTTGGT TGGGTGTCG TTGTGTTCTG ACCACATT TATCTCTAATG TAAATGTTT ATTATTTAT
 CAGACCTGT AAGCCAAACA CGCATGAAAC TCTAAACCA ACCCTACGT AACAAAGTG TGTGAAAA ATAGGATTAC ATTACGAA TAATATAATA
 1701 TTGGGCTACA TTGTAGAGTC CATCACAA AAAAAGAA AAAAAGAG GCGGCGCGC AGCTCTGAGT CCACTGCTG AGCTTGCG GCATGGCC
 AACCCGATGT AACCTCTG GTAGTGTGTTT TTGTGTTT CCGCCGCGC TGAAGCTCA GTGAGGCTC TTGGAACCGG CGGIAACCG

도면26A

ATG GAA CAA CGG GGA CAG AAC GCC CCG GCC GCT TCG GGG GCC CGG AAA Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys 1 5 10 15	48
AGG CAC GGC CCA GGA CCC AGG GAG GCG CGG GGA GCC AGG CCT GGG CCC Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro 20 25 30	96
CGG GTC CCC AAG ACC CTT GTG CTC GTT GTC GCC GCG GTC CTG CTG TTG Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu 35 40 45	144
GTC TCA GCT GAG TCT GCT CTG ATC ACC CAA CAA GAC CTA GCT CCC CAG Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln 50 55 60	192
CAG AGA GCG GCC CCA CAA CAA AAG AGG TCC AGC CCC TCA GAG GGA TTG Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu 65 70 75 80	240
TGT CCA CCT GGA CAC CAT ATC TCA GAA GAC GGT AGA GAT TGC ATC TCC Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser 85 90 95	288
TGC AAA TAT GGA CAG GAC TAT AGC ACT CAC TGG ATT GAC CTC CTT TTC Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe 100 105 110	336
TGC TTG CGC TGC ACC AGG TGT GAT TCA GGT GAA GTG GAG CTA AGT CCG Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro 115 120 125	384
TGC ACC ACG ACC AGA AAC ACA GTG TGT CAG TGC GAA GAA GGC ACC TTC Cys Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe 130 135 140	432
CGG GAA GAA GAT TCT CCT GAG ATG TGC CGG AAG TGC CGC ACA GGG TGT Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys 145 150 155 160	480
CCC AGA GGG ATG GTC AAG GTC GGT GAT TGT ACA CCC TGG AGT GAC ATC Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile 165 170 175	528
GAA TGT GTC CAC AAA GAA TCA GGT ACA AAG CAC AGT GGG GAA GCC CCA Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro 180 185 190	576
GCT GTG GAG GAG ACG GTG ACC TCC AGC CCA GGG ACT CCT GCC TCT CCC Ala Val Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro 195 200 205	624
TGT TCT CTC TCA GGC ATC ATC ATA GGA GTC ACA GTT GCA GCC GTA GTC Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val 210 215 220	672

도면26B

TTG ATT GTG GCT GTG TTT GTT TGC AAG TCT TTA CTG TGG AAG AAA GTC Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val 225 230 235 240	720
CTT CCT TAC CTG AAA GGC ATC TGC TCA GGT GGT GGT GGG GAC CCT GAG Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Asp Pro Glu 245 250 255	768
CGT GTG GAC AGA AGC TCA CAA CGA CCT GGG GCT GAG GAC AAT GTC CTC Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu 260 265 270	816
AAT GAG ATC GTG AGT ATC TTG CAG CCC ACC CAG GTC CCT GAG CAG GAA Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu 275 280 285	864
ATG GAA GTC CAG GAG CCA GCA GAG CCA ACA GGT GTC AAC ATG TTG TCC Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser 290 295 300	912
CCC GGG GAG TCA GAG CAT CTG CTG GAA CCG GCA GAA GCT GAA AGG TCT Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser 305 310 315 320	960
CAG AGG AGG AGG CTG CTG GTT CCA GCA AAT GAA GGT GAT CCC ACT GAG Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu 325 330 335	1008
ACT CTG AGA CAG TGC TTC GAT GAC TTT GCA GAC TTG GTG CCC TTT GAC Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp 340 345 350	1056
TCC TGG GAG CCG CTC ATG AGG AAG TTG GGC CTC ATG GAC AAT GAG ATA Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile 355 360 365	1104
AAG GTG GCT AAA GCT GAG GCA GCG GGC CAC AGG GAC ACC TTG TAC ACG Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr 370 375 380	1152
ATG CTG ATA AAG TGG GTC AAC AAA ACC GGG CGA GAT GCC TCT GTC CAC Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His 385 390 395 400	1200
ACC CTG CTG GAT GCC TTG GAG ACG CTG GGA GAG AGA CTT GCC AAG CAG Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln 405 410 415	1248
AAG ATT GAG GAC CAC TTG TTG AGC TCT GGA AAG TTC ATG TAT CTA GAA Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu 420 425 430	1296
GGT AAT GCA GAC TCT GCC ATG TCC TAA Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser *	1323
435 440	

도면27

EVQLVQSGGGVERPGGLSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGY
 ADSVKGRVTISRDNAKNSLYIQLMNSLRAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREGQVYTLPSSRE
 EMTKNQVSITCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<451개 잔기; 0 정지; 분자량: 49167.50

도면28

SELTQDPAVSVALGOTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGANNRPS GIPDRF
 SGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSADSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFP
 PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYA ASSYLS
 LTPEOWKSHKSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

<213개 잔기; 0 정지; 분자량: 22400.70

도면29

정렬, 16E2 및 아포마브 7.3 중쇄

16E2	1 EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYGM SW *
아포마브 7.3	1 EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAM SW
16E2	37 VRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRVTISRDNA KNSLYLQMNSL *
아포마브 7.3	37 VRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDNA KNSLYLQMNSL
16E2	87 RAEDTAVYYCAKILGAGR GWYFDLWGKGTTTVSSASTKGPSVFPLAPSS *
아포마브 7.3	87 RAEDTAVYYCAKILGAGR GWYFDYWGKGTTTVSSASTKGPSVFPLAPSS
16E2	137 KSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFEPAVLQSSGLYSL 아포마브 7.3 137 KSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFEPAVLQSSGLYSL
16E2	187 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP 아포마브 7.3 187 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
16E2	237 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV 아포마브 7.3 237 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
16E2	287 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI 아포마브 7.3 287 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
16E2	337 EKTISKAKGQP REPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE 아포마브 7.3 337 EKTISKAKGQP REPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE
16E2	387 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL 아포마브 7.3 387 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
16E2.huIgG1	437 HNHYTQKSLSLSPGK 아포마브 7.3 437 HNHYTQKSLSLSPGK

도면30

정렬, 16E2 및 아포마브 7.3 경쇄

16E2	1 SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKN * * *
아포마브 7.3	1 SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGAN
16E2	51 NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYCNSRDSSGNHVVFGG * *
아포마브 7.3	51 NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYCNSADSSGNHVVFGG
16E2	101 GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
아포마브 7.3	101 GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
16E2	151 ADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
아포마브 7.3	151 ADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
16E2	201 STVEKTVAPTECS
아포마브 7.3	201 STVEKTVAPTECS

도면31A

아포마브 가변 중쇄 도메인 서열

CDR H1
EVQLVQSGGGVERPGGLRLSCAASGFTFDDYAMWVRQAPGKGLEWV

CDR H2
SGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

CDR H3
ILGAGRHWYFDYWKGTTVTVSSASTKGP

도면31B

아포마브 가변 경쇄 도메인 서열

CDR L1
SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY

CDR L2
GANNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYCNSADSSGNHVV

CDR L3
FGGGTKLTVLG

도면32

경쇄 정렬

hu2H7.v16	1	32
	DIQMTQSPESSLASAVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
hu2H7.v511	*****	
hu2H7.v16	52	
	SNLASGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFQOG	
hu2H7.v511	*****	
hu2H7.v16	102	
	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD	
hu2H7.v511	*****	
hu2H7.v16	152	
	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL	
hu2H7.v511	*****	
hu2H7.v16	202	214
	SSPVTKSFNRGEC	
hu2H7.v511	*****	
	SSPVTKSFNRGEC	

도면33

증쇄 정렬

hu2H7.v16	1 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW ***** EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	37 VRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSL ***** VRQAPGKGLEWVGAIYPNGATSYNQFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSL
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	83 RAEDTAVYYCARVYYYNSNSYWFDWGQGTLVTVSS ***** RAEDTAVYYCARVYYYNSYWFDWGQGTLVTVSS
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	118 ASTKGPSVFPLAPS ***** ASTKGPSVFPLAPS
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	132 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS ***** SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	182 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA ***** LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	232 PELLGGPSVFLFPPPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG ***** PELLGGPSVFLFPPPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	282 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP ***** VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	332 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAREW * ***** IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAREW
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	382 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA ***** ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
hu2H7.v511	
hu2H7.v16	432 LHNHYTQKSLSLSPGK ***** LHNHYTQKSLSLSPGK
hu2H7.v511	

서 열 목 록

<110> GENENTECH, INC.

ANDYA, JAMES

GWEE, SHIANG C.

LIU, JUN

SHEN, YE

<120> ANTIBODY FORMULATIONS

<130> P2104R1 PCT

<140> PCT/US2005/037471

<141> 2005-10-19

<150> US 60/620,413
 <151> 2004-10-20

<160> 74

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
 1 5 10 15

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

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

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

Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
 65 70 75

Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 3

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

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

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 4

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

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

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 6

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

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

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

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

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65				70				75		

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80				85				90		

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu
				95				100				105		

Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
							110			115			

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa is preferably D or S

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 5 10

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

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 8
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

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

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 9
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 10
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is preferably R or L.

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is preferably Y or E.

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is preferably T or S.

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 ²⁵ ⁵⁵ ⁸⁵

Arg Gly Glu Cys

<210> 14
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

```

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
          1           5           10          15

```

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

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65	70	75
----	----	----

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	80	85	90
---	----	----	----

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	95	100	105
---	----	-----	-----

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro	110	115	120
---	-----	-----	-----

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	125	130	135
---	-----	-----	-----

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	140	145	150
---	-----	-----	-----

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu	155	160	165
---	-----	-----	-----

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr	170	175	180
---	-----	-----	-----

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu	185	190	195
---	-----	-----	-----

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn	200	205	210
---	-----	-----	-----

Arg Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

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

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
125 130 135

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 140 145 150

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 155 160 165

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
170 175 180

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
185 190 195

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
200 205 210

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
215	220	225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
320	325	330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
335	340	345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
350	355	360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
365	370	375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
380	385	390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
395	400	405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
410	415	420

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 17
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 17
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 65 70 75

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 80 85 90

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 95 100 105

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 110 115 120

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

125	130	135
-----	-----	-----

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser	140	145
---	-----	-----

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val	155	160
---	-----	-----

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	170	175
---	-----	-----

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	185	190
---	-----	-----

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	200	205
---	-----	-----

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	215	220
---	-----	-----

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	230	
---------------------------------	-----	--

<210> 18

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr	1	5
---	---	---

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu	20	25
---	----	----

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	35	40
---	----	----

Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly		
65	70	75

Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser		
80	85	90

Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu		
95	100	105

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly		
110	115	120

Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
125	130	135

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
140	145	150

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
155	160	165

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
170	175	180

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
185	190	195

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
200	205	210

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
215	220	225

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
230	235	240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
245	250	255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
320 325 330

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
335 340 345

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
350 355 360

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
365 370 375

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
380 385 390

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
395 400 405

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
410 415 420

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
425 430 435

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
440 445 450

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
455 460 465

Pro Gly

<210> 19
<211> 195
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
20 25 30

Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
35 40 45

Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
50 55 60

Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
65 70 75

Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
80 85 90

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
95 100 105

Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
110 115 120

Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
125 130 135

Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
140 145 150

Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn

155	160	165
-----	-----	-----

Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser	170	175
	180	

Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg	185	190
	195	

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro	1	5
	10	15

Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro	20	25
	30	

Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly	35	40
	45	

Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp	50	55
	60	

Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly	65	70
	75	

Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp	80	85
	90	

Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val	95	100
	105	

Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro	110	115
	120	

Cys Ala Arg Val

<210> 21

<211> 169
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
1 5 10 15

Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
20 25 30

Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
35 40 45

Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
50 55 60

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

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
80 85 90

Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
95 100 105

Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
110 115 120

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
125 130 135

Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
140 145 150

Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
155 160 165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro
1														
														15

Thr	Gln	Cys	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys
														30

Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val
														45

Asn	Ala	Arg	His	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln
														60

Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val
														75

Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys
														90

Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys
														105

Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys
														120

Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu
														135

Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr								
														140

<210> 23

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 23

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

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

Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
						35			40			45		

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly
						50			55			60		

Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
						65			70			75		

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
						80			85			90		

Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
						95			100			105		

Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
						110			115			120		

Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
							125		130			135		

Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
						140			145			150		

Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
						155			160			165		

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
						170			175			180		

Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
						185			190			195		

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 200 205 210

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 24
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 125 130 135

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 140 145 150

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 155 160 165

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 170 175 180

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 185 190 195

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 200 205 210

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 215 220 225

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 320 325 330

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 335 340 345

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
 35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

65	70	75
----	----	----

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	80	85	90
---	----	----	----

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu	95	100	105
---	----	-----	-----

Lys Arg

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 26

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser	20	25	30
---	----	----	----

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro	35	40	45
---	----	----	----

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg	50	55	60
---	----	----	----

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	65	70	75
---	----	----	----

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	80	85	90
---	----	----	----

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	95	100	105
---	----	-----	-----

Lys Arg

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 29

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35	40	45
----	----	----

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr	50	55	60
---	----	----	----

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser	65	70	75
---	----	----	----

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
---	----	----	----

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Ser Asn Ser	95	100	105
---	----	-----	-----

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	110	115	120
---	-----	-----	-----

Ser Ser

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 30

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

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

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45
---	----	----	----

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

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

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 32
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Gln Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

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

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser
65 70 75

Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Asp Asp
80 85 90

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 33

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

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

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

Val	Leu	Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
														60
			50			55								

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
														75
			65			70								

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
														90
			80			85								

Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
														105
			95			100								

Ile Lys

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 34

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20	25	30
----	----	----

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

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr	50	55	60
---	----	----	----

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser	65	70	75
---	----	----	----

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
---	----	----	----

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser	95	100	105
---	----	-----	-----

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	110	115	120
---	-----	-----	-----

Val Ser Ser

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 35

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

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

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

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50	55	60
----	----	----

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
80	85	90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		
95	100	105

Ile Lys

<210> 36

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 36

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

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

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

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr		
50	55	60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser		
65	70	75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr

95	100	105
----	-----	-----

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	110	115
		120

Val Ser Ser

<210> 37

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 37

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

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	35	40
		45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser	50	55
		60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	65	70
		75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr	80	85
		90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly	95	100
		105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe	110	115
		120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

125	130	135
-----	-----	-----

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val	140	145
---	-----	-----

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	155	160
---	-----	-----

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	170	175
---	-----	-----

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	185	190
---	-----	-----

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	200	205
---	-----	-----

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	215	
---------------------------------	-----	--

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 38

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	1	5
---	---	---

15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp	20	25
---	----	----

30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	35	40
---	----	----

45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser	50	55
---	----	----

60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 125 130 135

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
140 145 150

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 155 160 165

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 170 175 180

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
185 190 195

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
200 205 210

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
215

<210> 39
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 39
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 40
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30

Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 41

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 41

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

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

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

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405

Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

<210> 42
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 42

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
									20				30	
										25				

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

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

Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
									65				75	
										70				

Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
									80				90	
										85				

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
									95				105	
										100				

Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
									110				120	
										115				

Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
									125				135	
										130				

Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
									140				150	
										145				

Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
									155				165	
										160				

Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
									170				180	
										175				

Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
									185				195	
										190				

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395 400 405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

<210> 43

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 43

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

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

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

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His

95	100	105
----	-----	-----

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
110	115	120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		
125	130	135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
140	145	150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
155	160	165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
170	175	180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
185	190	195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
200	205	210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
215	220	225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
230	235	240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
290	295	300

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
					305				310				315	

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395 400 405

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 44
<211> 453
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 44

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr
 50 55 60

Asn Glu Lys Phe Lys Ala Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser
 95 100 105

Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 125 130 135

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 140 145 150

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 155 160 165

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175 180

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 185 190 195

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 200 205 210

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 215 220 225

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 350 355 360

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 395 400 405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

410	415	420
-----	-----	-----

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
425	430	435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
440	445	450

Pro Gly Lys

<210> 45

<211> 1042

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Unsure

<222> 447

<223> N is T or G

<400> 45

tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaaggcgt cagtgaccgg 50

ctgcctggct gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100

tggagggtcca ggggggaccc agcctggac agacctgcgt gctgatcgta 150

atcttacag tgcctctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200

ctttaccaac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250

ttgcttgaaa cttaaaagaa gatgacagt attggacccc caatgacgaa 300

gagagtatga acagccccgt ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350

cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc 400

aagaaaaagca acaaaatatt tctcccttag tgagagaaaag aggtccncag 450

agagtagcag ctcacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500

ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550

gsgaatcatc aaggagtggg cattcatcc tgagcaactt gcacttgagg 600

aatggtaaac tggcatcca tgaaaaaggg ttttactaca tctattcca 650

aacatactt cgatttcagg aggaataaaa agaaaacaca aagaacgaca 700

aacaaatggt ccaatatatt tacaaataca caagttatcc tgaccctata 750

ttgttgatga aaagtgcgt aaatagttgt tggctaaag atgcagaata 800

tggactctat tccatctatc aagggggat attttagctt aaggaaaatg 850

acagaatttt tgttctgta acaaatacgac acttgataga catggaccat 900

gaagccagtt ttgcgggc cttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950

aaaagcaata acctcaaagt gactattcag tttcaggat gatacactat 1000

gaagatgttt caaaaaatct gaccaaaaca aacaaacaga aa 1042

<210> 46

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr
1														15

Cys	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys
														30

Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met
														45

Gln	Asp	Lys	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu
														60

Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser
65 70 75

Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys
80 85 90

Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu
95 100 105

Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln
110 115 120

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
125 130 135

Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
140 145 150

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser
155 160 165

Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly
170 175 180

Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
185 190 195

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
200 205 210

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
215 220 225

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
245 250 255

Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His

260	265	270
-----	-----	-----

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly	275	280
---	-----	-----

<210> 47
<211> 411
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Xaa
<222> 410
<223> Xaa is L or M.

<400> 47
Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
1 5 10 15

Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro	20	25	30
---	----	----	----

Gly Leu Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val	35	40	45
---	----	----	----

Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp	50	55	60
---	----	----	----

Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser	65	70	75
---	----	----	----

Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp	80	85	90
---	----	----	----

Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr	95	100	105
---	----	-----	-----

His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp	110	115	120
---	-----	-----	-----

Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr	125	130	135
---	-----	-----	-----

Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro
140 145 150

Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
155 160 165

Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
170 175 180

Lys Glu Ser Gly Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
185 190 195

Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys
200 205 210

Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Asp
215 220 225

Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp
230 235 240

Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val
245 250 255

Pro Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly
260 265 270

Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro
275 280 285

Ala Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala
290 295 300

Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp
305 310 315

Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg
320 325 330

Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu

335	340	345
-----	-----	-----

Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp	350	355
---	-----	-----

Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp	365	370
---	-----	-----

Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu	380	385
---	-----	-----

Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn	395	400
---	-----	-----

Ala Asp Ser Ala Xaa Ser	410	
-------------------------	-----	--

<210> 48

<211> 1799

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

cccacgcgtc cgcataaattc agcacgcggc cggagaaccc cgcaatctct 50

gcgcccacaa aatacaccga cgatgccgta tctactttaa gggctgaaac 100

ccacggccct gagagactat aagagcgttc cctaccgcca tggaacaacg 150

gggacagaac gcccgcccg ctgcggggc ccggaaaagg cacggccag 200

gacctcaggga ggccggggga gccaggcctg ggctccgggt ccccaagacc 250

cttgtgctcg ttgtcgccgc ggtcctgctg ttggtctcag ctgagtcgtc 300

tctgtatcacc caacaagacc tagtccccca gcagagagcg gccccacaac 350

aaaagaggta cagccctca gagggattgt gtccacctgg acaccatatac 400

tcagaagacg gttagagattt catctcctgc aaatatggac aggactatag 450

cactcactgg aatgacacctcc ttttctgctt gcgctgcacc aggtgtgatt 500

caggtgaagt ggagctaagt ccctgcacca cgaccagaaa cacagtgtgt 550

cagtgcgaag aaggcacctt ccgggaagaa gattctcctg agatgtgccg 600

gaagtgccgc acagggtgtc ccagaggat ggtcaaggtc ggtgattgta 650

caccctggag tgacatcgaa tgtgtccaca aagaatcagg catcatcata 700

ggagtacag ttgcagccgt agtcttgatt gtggctgtgt ttgttgcaa 750

gtcttactg tggaagaaag tccttcctta cctgaaaggc atctgctcag 800

gtggtggtgg ggacccttag cgtgtggaca gaagtcaca acgacctggg 850

gctgaggaca atgtcctcaa tgagatcgtg agtatctgc agcccaccca 900

ggtcccttag cagaaatgg aagtccagga gccagcagag ccaacaggtg 950

tcaacatgtt gtccccggg gagtcagagc atctgctgga accggcagaa 1000

gctgaaaggt ctcagaggag gaggctgctg gttccagcaa atgaaggtga 1050

tcccacttag actctgagac agtgcttcga tgactttgca gacttggcgc 1100

ccttigactc ctgggagccg ctcatgagga agttggcct catggacaat 1150

gagataaagg tggctaaagc tgaggcagcg ggccacaggg acacccgtta 1200

cacgatgctg ataaagtgg tcaacaaaac cggcggagat gcctctgtcc 1250

acaccctgct ggatgccttg gagacgctgg gagagagact tgccaaaggc 1300

aagattgagg accacttgtt gagctctgga aagttcatgt atctagaagg 1350

taatgcagac tctgccwtgt cctaagtgtg attctcttca ggaagtgaga 1400

cctccctgg ttaccccttt ttctggaaaa agcccaactg gactccagtc 1450

agttagaaag tgccacaatt gtcacatgac cggtaactgga agaaactctc 1500

ccatccaaca tcacccagtg gatggaacat ccgttaactt ttcaactgcac 1550

ttggcattat tttataagg tgaatgtat aataaggaca ctatggaaat 1600

gtctggatca ttccgttgt gcgtacttg agatgggtt tggatgtca 1650

ttgtttcac agcactttt tatcctaatt taaatgcctt atttatttt 1700

ttgggctaca ttgttaagatc catctacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag 1750

ggcgcccgcg actctagagt cgacctgcag aagcttggcc gccatggcc 1799

<210> 49

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg
1														

Lys	Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro
20														

Gly	Pro	Arg	Val	Pro	Lys	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val
35														

Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Gln	Gln	Asp
50														

Leu	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser
65														

Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp
80														

Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr
95														

His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp
110 115 120

Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Arg Asn Thr
125 130 135

Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro
140 145 150

Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
155 160 165

Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
170 175 180

Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu
185 190 195

Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro Cys Ser
200 205 210

Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val Leu
215 220 225

Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
230 235 240

Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Asp Pro
245 250 255

Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn
260 265 270

Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro
275 280 285

Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val
290 295 300

Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala

305	310	315
-----	-----	-----

Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn	320	325
		330

Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe	335	340
		345

Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys	350	355
		360

Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala	365	370
		375

Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val	380	385
		390

Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala	395	400
		405

Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp	410	415
		420

His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn Ala	425	430
		435

Asp Ser Ala Met Ser	440	
---------------------	-----	--

<210> 50

<211> 1323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

atgaaacaac gggcacagaa cgcccccggc gttcgaaaa 50

gcacggcca ggaccagg aggcgcggg agccaggct gggccccggg 100

tcccaagac ctttgctc gttgtcgccg cggtcctgct gttggctca 150

gctgagtctg ctctgatcac ccaacaagac ctagctccc agcagagagc 200

ggccccacaa caaaagaggt ccagccctc agagggattt tgtccacact 250

gacaccatat ctcagaagac ggttagagatt gcatctcctg caaatatgga 300

caggactata gcactcactg gaatgacctc ctttctgct tgcgctgcac 350

caggtgtat tcaggtgaag tggagctaag tccgtgcacc acgaccagaa 400

acacagtgtg tcagtgcgaa gaaggcacct tccggaaaga agattctct 450

gagatgtgcc ggaagtgccg cacagggtt cccagaggta tggtaaggt 500

cggtgattgt acaccctgga gtgacatcg atgtgtccac aaagaatcg 550

gtacaaagca cagtgggaa gcccccagctg tggaggagac ggtgacctcc 600

agcccaggaa ctcctgcctc tccctgttct ctctcaggca tcatcatagg 650

agtacagtt gcagccgtag tcttgattgt ggctgtgtt gtttcaagt 700

cttactgtg gaagaaagtc cttccttacc taaaaggcat ctgctcagg 750

gggtggggg accctgagcg tgtggacaga agctacaaac gacctggggc 800

tgaggacaat gtcctcaatg agatcgtgag tatcttcag cccacccagg 850

tccctgagca ggaaatggaa gtcaggaggc cagcagagcc aacagggtgc 900

aacatgttgt ccccccggga gtcagagcat ctgtggaaac cggcagaagc 950

tgaaaggctc cagaggagga ggctgttgt tccagcaat gaagggtatc 1000

ccactgagac tctgagacag tgcttcgatg actttgcaga cttgggtcccc 1050

tttgactcct gggagccgct catgaggaag ttggccctca tggacaatga 1100

gataaagggtg gctaaagctg aggcaaggcc ccacaggac accttgtaca 1150

cgatgtat aaagtggtc aacaaaaccg ggcgagatgc ctctgtccac 1200

accctgctgg atgccttggaa gacgctggaa gagagacttg ccaaggcaga 1250

gattgaggac cacttgttga gctctggaaa gttcatgtat ctagaaggta 1300

atgcagactc tgccatgtcc taa 1323

<210> 51

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 51

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Arg	Pro	Gly
1														
														15

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

Asp	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
														35
														40
														45

Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Gln	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr
														50
														55
														60

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
														65
														70
														75

Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
														80
														85
														90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly
														95
														100
														105

Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
														110
														115
														120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

320	325	330
-----	-----	-----

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
335	340	345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu		
350	355	360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
365	370	375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
380	385	390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
395	400	405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
410	415	420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
425	430	435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	450

Lys

<210> 52
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 52
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr

20	25	30
----	----	----

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val	35	40
---	----	----

Ile Tyr Gly Ala Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe	50	55
---	----	----

Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly	65	70
---	----	----

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ala Asp	80	85
---	----	----

Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr	95	100
---	----	-----

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro	110	115
---	-----	-----

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys	125	130
---	-----	-----

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys	140	145
---	-----	-----

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro	155	160
---	-----	-----

Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser	170	175
---	-----	-----

Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln	185	190
---	-----	-----

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr	200	205
---	-----	-----

Glu Cys Ser

<210> 53
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 53
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

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

Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
65 70 75

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly
95 100 105

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 54
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 54
 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly

65 70 75

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp
80 85 90

Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 95 100 105

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
110 115 120

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
 125 130 135

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
 140 145 150

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
155 160 165

Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser
170 175 180

Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln
185 190 195

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
200 205 210

Glu Cys Ser

<210> 55
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly

1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp			
20		25	30
Asp Tyr Ala Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35		40	45
Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Gln Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala			
50		55	60
Asp Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys			
65		70	75
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
80		85	90
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp			
95		100	105
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
110		115	120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
125			

<210> 56
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 56
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val

35	40	45
----	----	----

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

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

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ala Asp		
80	85	90

Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr		
95	100	105

Val Leu Gly

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 57

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His	
5	10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 58

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser	
5	

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 59

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 60

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 61

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 62

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

<210> 63
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 63
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195

Thr His Gln Gln Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 64
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 65
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 65
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

440 445 450

Gly Lys

<210> 66
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

140	145	150
-----	-----	-----

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
155	160	165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
170	175	180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
185	190	195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
200	205	210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
215	220	225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
230	235	240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300

Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
320	325	330

Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<220>
<221> Xaa
<222> 9
<223> Xaa is M or L.

<400> 67
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
 5 10

<210> 68
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<220>

<221> Xaa

<222> 4

<223> Xaa is S or A.

<400> 68

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> Xaa is D or A.

<400> 69

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is N, A, Y, W or D.

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa is S or R.

<400> 70
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

<210> 71
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

320	325	330
-----	-----	-----

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340
---	-----	-----

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355
---	-----	-----

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370
---	-----	-----

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385
---	-----	-----

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400
---	-----	-----

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	410	415
---	-----	-----

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	425	430
---	-----	-----

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	440	445
---	-----	-----

Gly

<210> 72
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20	25	30
----	----	----

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

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330

Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly

<210> 73
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 73
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

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

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

<210> 74
 <211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 74

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

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

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

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
					50			55			60			

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
					65			70			75			

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80				85			90		

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg
					95				100			105		

Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
					110			115			120			

Ser Ser