



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월30일

(11) 등록번호 10-1862832

(24) 등록일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7013561

(22) 출원일자(국제) 2011년10월31일

심사청구일자 2016년10월31일

(85) 번역문제출일자 2013년05월27일

(65) 공개번호 10-2014-0026337

(43) 공개일자 2014년03월05일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2011/054834

(87) 국제공개번호 WO 2012/059857

국제공개일자 2012년05월10일

(30) 우선권주장

61/408,782 2010년11월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010022736 A2

(73) 특허권자

심포젠 에이/에스

덴마크 발레루프 페데르스트루프베즈 93 (우: 2750)

(72) 발명자

페데르센, 미켈, 완달

덴마크 디케이-3450 알레로드 포렐베즈 17

크리스텐센, 아이다, 케이.

덴마크 디케이-2100 코펜하겐 1티브 하일드루가드

7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 P A N - H E R 항체 조성물

(57) 요 약

본 발명은 HER 패밀리의 다수의 멤버를 보다 넓게 방해하는 (pan-HER 억제) EGFR/ErbB/HER 패밀리내 수용체에 대한 개선된 치료제에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 인간 암 치료를 위한 항체 조성물의 용도에 관한 것이다. 시험관내 연구는, 다수의 HER 패밀리 수용체를 표적화하는 본 발명의 항체 조성물이 단 하나의 HER 패밀리 수용체를 표적화하는 항체 조성물보다 우수하였음을 나타내었다.

(72) 발명자

란토, 조한

스웨덴 에스-227 룬드 36 브리가레가텐 4

자콥센, 헬레

덴마크 디케이-2830 비룸 프루그테그넷 66

크라그, 마이클

덴마크 디케이-2200 코펜하겐 5티브 라소에가드 1

에이

(30) 우선권주장

61/531,407 2011년09월06일 미국(US)

PA 2010 00988 2010년11월01일 덴마크(DK)

PA 2011 00672 2011년09월05일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

하나 또는 둘의 별개의 항-EGFR 항체 분자, 하나 또는 둘의 별개의 항-HER2 항체 분자 및 하나 또는 둘의 별개의 항-HER3 항체 분자를 포함하는 환자에서 암을 치료하기 위한 약제학적 항체 조성물로서,

- a) 하나 또는 둘의 별개의 항-EGFR 항체 분자 각각은 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내; 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내; 또는 각각 SEQ ID NO: 14 및 16 내의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 (V_H 및 V_L) 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있거나;
- b) 하나 또는 둘의 별개의 항-HER2 항체 분자 각각은 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내; 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내; 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내; 또는 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있거나;
- c) 하나 또는 둘의 별개의 항-HER3 항체 분자 각각은 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내; 또는 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는, 약제학적 항체 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과

동일한 에피토프에 결합할 수 있는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 억제할 수 있거나 이들과 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은

- a) i) 각각 SEQ ID NOs: 18 및 20,
- ii) 각각 SEQ ID NOs: 22 및 24, 또는
- iii) 각각 SEQ ID NOs: 14 및 16 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 항-EGFR 항체 분자;
- b) i) 각각 SEQ ID NOs: 30 및 32,
- ii) 각각 SEQ ID NOs: 34 및 36,
- iii) 각각 SEQ ID NOs: 38 및 40, 또는
- iv) 각각 SEQ ID NOs: 42 및 44 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 항-HER2 항체 분자; 및
- c) i) 각각 SEQ ID NOs: 50 및 52, 또는
- ii) 각각 SEQ ID NOs: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미

노산 서열을 포함하는 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열; 또는 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 조성물은

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-EGFR 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-EGFR 항체 분자;
- b) 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-HER2 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-HER2 항체 분자; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 제1 항-HER3 항체 분자; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하는 별개의 제2 항-HER3 항체 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 분자 중 하나 이상이 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체이고, 인간 IgG₁ 또는 IgG₂ 중쇄 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 분자 중 하나 이상이 항암제에 컨쥬게이션된 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트 (immunoconjugate)인, 조성물.

청구항 13

- i) SEQ ID NO: 18 내의 중쇄 가변 도메인 (V_H) 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 20 내의 경쇄 (LC) 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- ii) SEQ ID NO: 22 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 24 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,

- iii) SEQ ID NO: 30 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 32 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- iv) SEQ ID NO: 38 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 40 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- v) SEQ ID NO: 50 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 52 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및
- vi) SEQ ID NO: 54 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 56 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

- i) SEQ ID NO: 18 내의 중쇄 가변 도메인 (V_H) 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 20 내의 경쇄 (LC) 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- ii) SEQ ID NO: 22 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 24 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- iii) SEQ ID NO: 34 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 36 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- iv) SEQ ID NO: 42 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 44 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- v) SEQ ID NO: 50 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 52 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및
- vi) SEQ ID NO: 54 내의 V_H 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 56 내의 LC 아미노산 서열을 포함하는 항체를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 항체 각각은 인간 IgG 중쇄 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 항체 각각은 인간 IgG₁ 중쇄 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제10항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 EGFR, HER2 또는 HER3 의존성임을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제10항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 인간인, 조성물.

청구항 19

- a) i) 각각 SEQ ID Nos: 18 및 20,
- ii) 각각 SEQ ID Nos: 22 및 24, 또는
- iii) 각각 SEQ ID Nos: 14 및 16 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 인간화 항-EGFR 항체;
- b) i) 각각 SEQ ID Nos: 30 및 32,
- ii) 각각 SEQ ID Nos: 34 및 36,
- iii) 각각 SEQ ID Nos: 38 및 40, 또는
- iv) 각각 SEQ ID Nos: 42 및 44 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 인간화 항-HER2 항체; 및
- c) i) 각각 SEQ ID Nos: 50 및 52, 또는
- ii) 각각 SEQ ID Nos: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 인간화 항-HER3 항체를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 약제학적 항체 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서,

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제1 인간화 항-EGFR 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-EGFR 항체;
- b) 각각 SEQ ID NO: 30 및 32 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 인간화 항-HER2 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 38 및 40 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-HER2 항체; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 인간화 항-HER3 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-HER3 항체를 포함하는, 조성물.

청구항 21

제 19항에 있어서,

- a) 각각 SEQ ID NO: 18 및 20 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제1 인간화 항-EGFR 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 22 및 24 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-EGFR 항체;
- b) 각각 SEQ ID NO: 34 및 36 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 인간화 항-HER2 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 42 및 44 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-HER2 항체; 및
- c) 각각 SEQ ID NO: 50 및 52 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-CDR3을 포함하는 제1 인간화 항-HER3 항체; 및 각각 SEQ ID NO: 54 및 56 내의 중쇄 및 경쇄 CDR1-3을 포함하는 제2 인간화 항-HER3 항체를 포함하는, 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제10항, 제13항, 제14항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 대장암 또는 췌장암인, 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제10항, 제13항, 제14항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 항-EGFR, 항-HER2 또는 항-HER3 항체 또는 티로신 키나제 억제제를 이용한 치료에 획득 저항성(acquired resistance)을 지니는, 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제10항, 제13항, 제14항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 한가지 이상의 추가의 치료적 처치로 치료되는, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 한가지 이상의 추가의 치료적 처치는 화학요법 또는 방사선인, 조성물.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 패밀리를 표적으로 하는 신규한 재조합 항체 및 이러한 항체들 중 두 개 이상을 포함하는 인간암 치료에 사용되는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

표피 성장 인자 수용체 패밀리 (EGFR 또는 ErbB/HER 패밀리로도 알려짐)는 수용체 티로신 키나제 (RTK)의 서브 그룹이고 하기 4개의 멤버로 구성된다: EGFR/ErbB, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 및 HER4/ErbB4. EGFR 패밀리의 멤버는 세포외 리간드 결합 영역, 단일 막통과(transmembrane) 도메인 및 세포내 티로신 키나제를 갖는 밀접하게 관련된 단일-쇄 모듈의 당단백질이다. 정상적인 생리적 환경에서 ErbB 패밀리는 세포 성장, 분화 및 이동의 조정에 있어서 중요한 사건을 조절한다. EGFR, HER2 및 HER3은 정상 세포의 악성 전환 및 암세포의 지속 성장에서 중대한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. EGFR 및 HER2는 다수의 상피암에 의해 과발현되는 것이 발견되었다. EGFR 및 HER2의 과발현은 게다가 여러 인간 상피암에서 질환 진행, 생존 감소, 반응 부족 및 화학요법 내성과 관련되었다. 악성 전환 및 암 진행에서 HER4의 역할은 논쟁의 대상이며 본원에서 추가로 논의되지 않을 것이다.

[0003]

EGFR 및 HER2는 암 표적으로 확인되었고 이들의 티로신 키나제의 모노클로날 항체 및 소분자 억제제 둘 모두는 다양한 암의 치료를 위해 승인되었다. HER3은 잠재적인 치료 표적으로서 현재 연구되고 있다. 그러나, 초기에 이러한 요법에 반응한 환자들은 종종 획득 저항성(acquired resistance)의 전개로 인해 재발한다. 전임상 연구는 저항성 발생에 비표적 수용체들 중 하나 또는 둘 모두가 연루됨을 지적한다. 이에 따라, ErbB 수용체는 서로 대체되는 능력을 지녀서 성장 자극 신호전달 및 악성 표현형을 유지하는 것으로 보인다. 따라서, 2개의 수용체 또는 3개 모두의 수용체의 동시 표적화는 ErbB 패밀리 의존성을 지니는 암세포를 억제하는 더욱 효율적인 방식이 될 수 있었다.

[0004]

EGFR는 인간 외음 암종 세포주로부터의 인간 cDNA의 클로닝 및 서열분석에 의해 본래 측정되고 기재된 대로 1186개 아미노산 잔기의 단일 폴리펩티드 사슬로 구성되는 170kDa 세포 표면 당단백질이다. EGFR은 하기 3개의 주요 도메인을 함유한다: 티로신 키나제를 함유하는 세포내 도메인, 막통과 도메인 및 세포외 도메인. EGFR 잔기의 총매 활성은 티로신 키나제 도메인에 있으며 (잔기 685-953) 리간드 결합시에 활성화된다.

[0005]

EGFR은 2개의 상이한 형태, 즉 계류(tethered) 형태 (폐쇄) 및 연장된 형태 (개방)로 존재한다. 수용체는 2개의 형태 사이에서 변화된다. 계류 형태에서 EGFR의 세포외 영역의 도메인 II 및 IV는 상호작용하여 자가억제된 상태의 수용체를 남긴다. 더욱이, 도메인 III은 도메인 I로부터 상당한 거리에 유지됨으로써 2개의 도메인 모두에 EGF가 동시에 결합할 수 없게 한다. EGFR의 연장된 형태에서, 도메인 I, II 및 III은 입체적으로 C 형상으로 배열되어 EGF 결합을 위한 공간을 제공한다. 또한, 입체형태적 변화는 "이합체화 아암"으로도 알려진, 도메인 II에 있는 20개 잔기 영역으로 구성된 β-헤어핀의 노출을 유도한다. EGFR의 도메인 II로부터 연장된 이

합체화 아암은 또 다른 EGFR의 도메인 II와 광범하게 접촉하여 EGFR 호모이합체를 형성한다.

[0006] 이합체화는 수용체의 활성 세포질 티로신 키나제 도메인이 수용체의 조절 영역에 있는 티로신 잔기의 인산화에 충분할 만큼 가까워 지게 한다. 게다가, 2개 수용체의 인접막(juxtamembrane) 영역은 티로신 키나제 이합체를 안정화시키는데 중요한 것으로 밝혀진 역평행 이합체를 형성한다. "수용체-매개" 이합체화 메커니즘은 "리간드-매개" 이합체화가 더욱 일반적인 근거인 다른 티로신 키나제 수용체에 비해 ErbB 패밀리에 유일한 것이다.

[0007] EGFR의 세포내 티로신 키나제 도메인의 다수의 활성화 방식이 제안되었다. 그 밖의 수용체 티로신 키나제와 달리, 디폴트(default)에 의한 EGFR 티로신 키나제 도메인은 인산화되고 활성화된 키나제에서만 보통 관찰되는 형태를 채용한다. 이는 EGFR의 키나제 도메인이 항시적으로 활성임을 나타낸다. 이에 따라 항시적인 티로신 키나제의 조절은 트랜스-인산화를 위한 이합체화 파트너의 C-말단 조절기 영역의 전달을 통해 일어났을 것이다. 또 다른 가능성은, 티로신 키나제 도메인의 활성화가 결정학상 연구에서 가시화되지 않았던 억제 상호작용의 범위를 포함한다는 것이다. 그러나, EGFR의 인접막 및 티로신 키나제의 결정 구조 분석은 2개 EGFR의 이합체화시에 형성된 티로신 키나제의 비대칭 이합체가 티로신 키나제 활성의 조절에 중요함을 드러내었다. 이러한 비대칭 호모이합체에서 티로신 키나제 중 하나는 수용기의 역할을 하는 한편 다른 티로신 키나제는 제공자로 기능한다. 수용기 키나제 도메인만이 촉매 활성을 지니고 수용체의 C-말단 테일에서 티로신 잔기의 인산화를 속행시킨다 (시스 또는 트랜스인지, 둘 다 알려져 있지 않든지 간에).

[0008] 클라트린-매개 세포내이입은 EGFR의 하향 조절에 가장 중요한 메커니즘이다. EGFR의 운명은 리간드-수용체 복합체의 안정성에 의존적이다. EGFR에 EGF가 결합할 때 EGFR 호모이합체는 클라트린-코팅된 오복부(pit)에 신속하게 표적화되어 리간드-유도 세포내이입을 통해 내재화된다. 동시에 EGFR은 모노유비퀴틴과 폴리유비퀴틴 둘 모두의 부착에 의해 크게 유비퀴틴화된다. 유비퀴틴 라이가제 Cbl은 EGFR의 유비퀴틴화의 원인이다. Cbl은 Grb2와 같은 연결기 단백질을 통해 EGFR의 조절 영역에서 인산화된 티로신 잔기에 직접 또는 간접적으로 결합한다. Grb2를 통한 EGFR로의 Cbl의 결합은 수용체 내재화에 필수적이다. Esp15가 또한 EGFR 내재화에서 역할을 담당한다. 그러나 Esp15의 정확한 역할에 관해서는 아직 논쟁의 여지가 있다. 유비퀴틴화는 EGFR의 세포내이입 하향조절 및 리소좀으로의 EGFR의 엔도솜 분류(endosomal sorting)에 수반된다. 유비퀴틴 사슬은 수송에 요구되는 엔도솜 분류 복합체 (ESCRT) 및 초기 엔도솜의 막에 유비퀴틴화된 단백질을 보유하는 Hrs/STAM에 의해 인지됨으로써 EGFR의 순환을 방해한다. 후속하여 EGFR을 관내 소포 (ILV)로 분류하는데, 이는 후기 엔도솜으로 EGFR을 전달하고 결국 리소좀에서 분해시킨다.

[0009] EGF에 결합할 때 EGFR의 분해와 대조적으로, TGF- α 결합은 수용체 순환을 허용한다. TGF- α 리간드는 산성 환경으로 인해 초기 엔도솜에서 EGFR로부터 신속하게 분리되는데, 이는 수용체 탈인산화, 탈-유비퀴틴화를 발생시켜 수용체를 세포 표면으로 역순환시킨다. EGFR에 대한 EPR 결합은 EGFR의 세포내이입 분류에 대해 TGF- α 와 동일한 효과를 갖는다. HB-EGF 및 BTC 둘 모두는 리소좀 분해를 위해 모든 EGFR을 표적화하는 한편, AR은 빠를 뿐 아니라 느리기도 한 EGFR 순환을 야기한다.

[0010] 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2, Erbb2 또는 Neu)는 Schechter 등에 의해 1984년에 처음 기재되었다. HER2는 1234개 아미노산으로 구성되며, 4개의 서브도메인 I-IV, 즉 막통과 도메인, 인접막 도메인, 세포내 세포질 티로신 키나제 및 조절 C-말단 도메인으로 구성되는 세포외 도메인을 지니는 EGFR과 구조적으로 유사하다.

[0011] HER2에는 계류 EGFR에서 도메인 배열을 제한하는 도메인 II-IV 접촉이 존재하지 않는다. 비활성화된 EGFR에서 계류를 안정화하는데 중요한 7개의 보존된 잔기들 중 3개가 HER2에서 상이하다. 따라서 HER2는 수용체-수용체 상호작용을 유도하도록 노출되고 명백하게 태세를 갖춘 이합체화 아암을 지니는 연장된 (개방) 형태의 EGFR과 비슷하다. 계류된 HER2 형태의 부재는, 수용체에 ErbB 패밀리의 다른 멤버에서 보여진 자가억제가 결여되었음을 나타낸다. 서브도메인 I-III의 안정한 계면들이 EGFR-EGF 복합체의 연장된 형태와 유사한 연장된 형태의 HER2를 유지하는 것처럼 보인다. 도메인 I 및 III 간의 상호작용은 EGFR의 도메인 I 및 III에 있는 리간드-결합 부위에 해당하는 영역을 수반하여 리간드에 대한 어떠한 입체적인 공간도 남기지 않으며 HER2가 결합할 수 없는 리간드가 되게 한다. 도메인 II 및 IV는 HER2와 ErbB 패밀리의 또 다른 멤버의 혜택으로 이합체 형성을 안정화시키는 2개의 별개의 계면을 형성한다.

[0012] 생물물리학 연구는 용액 또는 결정에서 현저한 HER2 호모이합체화를 검출하지 못했다. EGFR 및 HER2의 도메인 II의 잔기는 유사하다. 그러나, 이합체 계면에 있는 Arg285가 EGFR 및 HER2 사이에서 보존되지 않는다. HER2에서 잔기 285는 Leu이다. 돌연변이 연구는, 이러한 위치에 있는 Leu가 용액 중 HER2 호모이합체의 부재의 부분적인 원인임을 나타낸다. 생체내 무손상 HER2의 이합체화는 HER2의 막통과 도메인에서 부위들의 추가적인 상호작용을 요구할 수 있다.

- [0013] HER2는 공지된 리간드에 결합하지 않는 ErbB 패밀리의 유일한 멤버이다. HER2는 대신 다른 ErbB 패밀리 멤버와의 혜테로이 복합체의 형성을 통해 활성화되어 EGFR 및 HER3 리간드에 의해 간접적으로 조절된다. HER2는 3개의 다른 ErbB 수용체의 바람직한 혜테로이합체화 파트너이다. HER2는 리간드-수용체 복합체의 분리 속도를 느리게 함으로써 그 리간드에 대한 그 밖의 ErbB 수용체의 친화성을 향상시키고, 이에 의해 HER2는 신호전달을 향상시키고 연장시킨다. 다른 ErbB 수용체의 리간드 친화성을 향상시키는 HER2의 능력은 혜테로이합체화 파트너로서의 HER2의 불규칙한 거동을 반영할 수 있다. HER2 및 ErbB 패밀리의 또 다른 리간드-결합된 수용체의 혜테로이합체화는 크로스-인산화를 유도하여, C-말단 티로신 잔기의 인산화를 발생시킨다. 가장 활성인 HER2 혜테로이합체는 HER2-HER3 복합체이다. HER2는 활성 키나제를 제공함에 의해 키나제-의존성 HER3을 보완한다.
- [0014] HER2는 EGFR과 대조적으로 과발현될 때 내재화 저항성이다. HER2의 과발현은 다른 ErbB 패밀리 멤버의 세포내 이입을 억제한다고 추가로 보고되었다. HER2가 리소좀 분해를 모면함으로써 원형질막에 남게 되는 두 가지 메커니즘이 제안되었다. HER2는 내재화를 회피하거나 엔도솜으로부터 원형질막으로 효율적으로 역순환된다. 표지된 항체를 이용한 연구는, HER2가 끊임없이 내재화되고 순환됨을 나타내었다. 반대로 그 밖의 연구는 순환을 억제하는 것으로 알려진 화합물로 처리된 세포에서 세포내 HER2를 동정하지 못했다.
- [0015] HER2의 카르복실 말단은 내재화에 요구되는 모든 신호를 지니는 것은 아니거나 이것은 클라트린-매개된 세포내 이입에 필수적인 억제 신호를 함유한다고 제안되었다. 추가로, 연구들은 HER2 혜테로이합체가 엔도솜에 전달되지 않는다고 지적하였다. EGFR 상에서 발견된 것과 같은 Cb1 도킹 부위가 또한 HER2 (Y1112) 상에서 확인되었다. 이에 따라 Cb1는 HER2에 동원될 수 있고, 이는 HER2의 유비퀴틴화를 일으키나, Cb1의 실제 결합 효율은 명확하지 않다. HER2는 막 돌출부와 이의 결합으로 인해 내재화 저항성인 것으로 제안되었다. 마지막으로, 그 밖의 연구는, HER2-EGFR 혜테로이합체의 세포내이입 저항성이 클라트린-코팅된 오목부의 비능률적인 EGF-유도 형성과 관련됨을 나타내었다.
- [0016] 인간 표피 성장 인자 수용체 3 (HER3, ErbB3)으로 알려진 ErbB 패밀리의 세 번째 멤버는 1989년에 Kraus M.H. 등에 의해 확인되었다. HER3 유전자는 EGFR 및 HER2와 현저한 구조적 유사성을 지니는 1342개 아미노산의 단백질을 엔코딩한다. 전체 크기, 2개의 시스테인 클러스터(도메인 II 및 IV)를 갖는 4개의 세포외 서브도메인 (I-IV), 및 티로신 키나제 도메인과 같은 특징은 EGFR 및 HER2와 구조적 유사성을 나타낸다. HER3의 티로신 키나제 도메인은 EGFR의 티로신 키나제 도메인과 59%의 서열 상동성을 나타낸다.
- [0017] 마치 EGFR과 같이, HER3은 계류 형태 및 연장된 형태로 존재한다. 계류 형태에서 이합체화 아암(arm)은 도메인 I과 III을 능률적인 리간드 결합부와 매우 멀리 떨어지게 두면서, 도메인 IV와의 상호작용에 의해 숨겨진다. 세포외 도메인 I 및 III에 대한 리간드 결합은 HER3의 연장된 형태에서 발생하여 ErbB 패밀리의 다른 멤버와의 혜테로이합체화를 야기한다. 리간드 결합시에 어떠한 HER3 호모이합체도 형성되지 않는다. 연장되고 리간드-결합된 HER3 분자는 HER2와 우선적으로 혜테로이합체화된다.
- [0018] EGFR 및 HER2와 대조적으로, HER3의 티로신 키나제는 어떠한 검출가능한 생물학적 반응에 충분치 않은 손상된 촉매 활성을 지닌다. 단백질 키나제의 촉매 도메인에서 고도로 보존된 2개의 아미노산 잔기가 HER3의 촉매 도메인에서 변경된다. 이것은 잔기 815에서 아스파르트산 대신 아스파라긴의 치환 및 잔기 740에서 글루타메이트 대신 히스타민의 치환이다. 2개의 아미노산 치환은 HER3에서 이의 티로신 키나제 도메인의 촉매 활성이 결여될 이유일 수 있다. HER3의 손상된 본질적인 키나제 활성으로 인해, 수용체는 그 고유의 리간드 결합에 반응하기 위해 또 다른 ErbB 패밀리 멤버와 혜테로이합체화될 필요가 있다.
- [0019] HER3의 세포내이입에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 더욱이, 여러 연구들은 HER3이 HER2와 동일한 정도로 세포내이입 손상된다고 제안하였다. 이와 일치하여 HER3-NRG1 복합체는 EGFR-EGF 복합체보다 덜 효율적으로 느리게 내재화되는 것이 발견되었는데, 이는 HER3이 EGFR만큼 효율적으로 세포내이입되지 않는다는 견해를 시사한다. 그러나, EGFR의 C-말단 테일이 HER3의 C-말단 테일로 대체되었을 때, EGFR은 세포내이입 손상되었는데, 이는 HER3의 C-말단에 있는 영역이 내재화에 대해 수용체를 보호함을 시사하는 것이다. 또한 NRG1은, EGF가 TGF α에 의해 활성화될 때 관찰된 바와 같이, 엔도솜에서 리간드-수용체 복합체의 분리로 인해 분해되도록 HER3을 효율적으로 표적화하지 않음이 제안되었다.
- [0020] ErbB 패밀리를 표적화하는 것은 암 치료 전략으로서 지난 10년간 광범하게 수행되어 왔다. 티로신 키나제 억제제 (TKI), 모노클로날 항체 (mAb) 및 리간드-트랩과 같은 다양한 치료 양상이 연구되었다. 암 치료에 있어서 모노클로날 항체의 이점은 통상적인 세포독성 암 화학요법에 비해 낮은 독성을 보장하는 표적 특이성에 있다. 모노클로날 항체는 비정상적으로 높은 수준의 EGFR 또는 HER2를 지니는 고형암의 치료를 위해 승인되었고, EGFR 또는 HER2를 표적화하는 다수의 mAb가 임상 시험중에 있다. TKI는 EGFR 및 HER2의 티로신 키나제 도메인에서

ATP-결합 부위에 결합함에 의해 수용체 신호전달을 억제한다. 에를로티닙(Erlotinib)/타세바(Tarceva)®는 EGFR의 티로신 키나제를 억제하는 한편, 라파티닙(lapatinib)/타이커브(Tykerb)®는 EGFR과 HER2 둘 모두의 티로신 키나제를 억제한다. 에를로티닙과 라파티닙 둘 모두는 비소세포폐암 (NSCLC) 및 HER2 과발현 전이성 유방암의 치료에 각각 사용하기 위해 FDA 승인된 TKI이다.

[0021] 그러나, 모노클로날 항체 요법 및 TKI의 임상적 유용성에도 불구하고, 치료에 대한 획득 저항성의 발생에 대한 문제가 증가하고 있다. mAb 및 통상적인 세포독성 화학요법의 조합 치료는 치료 효능을 증가시키기 위해 수행되는 접근법 중 하나이다. 또한, 효과기 기능의 향상, 및 방사성핵종 또는 독소와 함께 항체의 직접 및 간접적 아밍(ariming)을 포함하는, 모노클로날 항체의 효능을 증가시키기 위한 여러 전략들이 연구 중이다. 또 다른 전략은 상이한 표적에 대한 mAb들의 조합이다.

[0022] ErbB 수용체의 이중 억제를 위한 과학적 해석은 단일 수용체 표적화라기 보다 이중 ErbB 접근법을 이용하여 양호한 항종양 활성을 발생시킨 다수의 전임상 시험관내 및 생체내 연구에 기반한다. 모노클로날 항체 혼합물에 의한 EGFR 및 HER2 상의 다수의 에피토프의 동시 표적화는 시험관내 및 생체내에서 mAb (Friedman et al., PNAS 2005, 102:1915-20) 및 TKI 계페티닙들 간의 조합물보다 양호함이 입증되었고 2개의 mAb인 트라스트주맙 및 퍼투주맙은 HER2-과발현 유방암 세포의 이중이식 종양을 지니는 마우스에서 어떠한 단일 작용제에 비해 현저하게 개선된 항종양 효능을 제공하였다 (Arpino et al., J Natl Cancer Inst 2007, 99:694-705).

[0023] ErbB 수용체 패밀리에서 수용체 티로신 키나제의 공동-활성화의 능력은 시험관내 종양발생 형질전환 동안 발생하는 것으로 관찰되었고 이러한 능력은 인간 일차 종양의 발생 및 진행에 있어서 필수적인 역할을 담당하는 것으로 보인다. 또한 ErbB 패밀리 멤버들의 협력적 역할이 시험관내 및 생체내 연구에서 제안되었는데, 이는 ErbB 과발현 암세포에서 mAb 및 TKI에 대한 저항성이 다른 ErbB 패밀리 멤버의 증가된 활성과 관련됨을 나타낸다. RTK 공동-활성화는 암세포가 2개 이상의 RTK를 동시에 활성화시킬 수 있게 하여 네트워크 강건성을 달성하고 신호전달 성과의 다양성을 증가시킨다. RTK 공동-활성화는, 특히 TKI에 대한 획득 저항성에 관해, 다수의 암 유형에서 재현되었는데, 이는 RTK 공동-활성화의 결과인 종양유전자 스위칭이 암세포가 다운스트림 신호전달 분자의 지속된 활성을 통해 화학저항성을 달성하는 일반적인 메커니즘일 수 있음을 시사하는 것이다. RTK 공동-활성화는 활성화된 수용체 티로신 키나제의 체계(hierarchy)를 입증하고, 이에 따라 지배적인 RTK의 비활성화 이후에 이차 RTK의 신속한 보상을 허용하는 문헌[Pillay et al, Neplasia 2009; 11: 448-58, 2]에 기재된 연구에서 추가로 기재되었다. 이차 RTK의 공동-활성화는 자가분비-주변분비 성장 인자 분비, 지배적인 RTK에 의한 직접 트랜스인산화, Src와 같은 신호전달 중간체를 통한 간접 인산화, 또는 전사적 조절을 통해 일어날 수 있다. 지배적인 RTK의 예는 EGFR 및 HER2를 포함하는 반면, 이차 RTK는 HER3을 포함할 수 있다.

[0024] 높은 수준의 ErbB 패밀리 수용체를 지니는 암의 치료에 이용되는 mAb 및 TKI에 대한 저항성을 극복하기 위한 가능한 전략은 종양발생 RTK 신호전달을 중단시키고 보상 메커니즘을 극복하기 위해 다수의 ErbB 수용체를 동시에 표적화하는 것을 포함할 수 있다. 그러한 전략은 강건한 ErbB 신호전달 네트워크에 보기 드문 동요를 유발시켜 바라건대 저항성의 발생을 극복할 것이다.

발명의 내용

발명의 개요

[0025] 본 발명은 HER 패밀리의 다수의 멤버를 보다 넓게 방해하는 (pan-HER 억제) HER 패밀리내 수용체에 대한 개선된 치료제에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 유방암, 난소암, 위암, 폐암, 및 수용체 EGFR, HER2 및 HER3 중 하나 이상에 의존적인 그 밖의 암을 치료하는 것과 같은, 인간 암 치료를 위한 항체 조성물의 용도에 관한 것이다. HER 패밀리의 수용체에 대해 유도된 이용가능한 모노클로날 항체 및 항체의 조합물뿐 아니라 소분자를 포함하는, 그러한 암에 대해 현재 이용가능한 치료에 비해, 본 발명의 항체 조성물은 단독으로 또는, 임의로 화학요법과 같은 그 밖의 치료와 병용하여 양호한 임상 반응을 제공할 수 있을 것으로 고려된다.

[0026] 일 양태에서, 본 발명은 재조합 항체 조성물에 관한 것이고, 여기서 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자는 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하고 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자는 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합한다.

[0027] 추가의 양태에서, 본 발명은 재조합 항체 조성물에 관한 것이고, 여기서 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자는 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하고 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자는 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하며, 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자는 제 3 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합한다.

- [0029] 바람직하게는, 본 발명은 재조합 항체 조성물에 관한 것이고, 여기서 조성물은 1254, 1277 또는 1565로부터의 CDR을 지니는 하나 이상의 항-EGFR 항체, 또는 1254, 1277 또는 1565의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-EGFR 항체; 4384, 4385, 4517 또는 4518로부터의 CDR을 지니는 하나 이상의 항-HER2 항체, 또는 4384, 4385, 4517 또는 4518의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-HER2 항체; 및 5038 또는 5082로부터의 CDR을 지니는 하나 이상의 항-HER3 항체, 또는 5038 또는 5082의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-HER3 항체를 포함한다. 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서, 항체 조성물은 항체 1277+1565+4384+4517+5038+5082의 CDR을 지니는 항체, 또는 상기 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 대표적인 항체 조성물은 대표적인 암 세포주의 종식을 억제하는데 효과적인 것으로 입증되었고, 이는 암의 치료에 있어서 생체내 용도를 나타낸다. 이렇게 나타난 결과는 마우스에서 인간 암의 이종이식 모델에서 확인되었다.
- [0031] 추가의 양태에서, 본 발명은 항암제에 컨쥬게이션된 본 발명의 재조합 항체 조성물을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이다.
- [0032] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 엔코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터 및 상기 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0033] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 조성물을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 또한 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 조성물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 또한, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 항체 조성물을 이를 필요로 하는 피검체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 그 밖의 포유동물에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 여전히 추가의 양태에서, 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한, 및/또는 항체 및/또는 TKI를 이용한 치료에 획득 저항성을 갖는 인간 또는 그 밖의 포유동물에서 암을 치료하기 위한 약제로서 사용되는 본 발명의 항체 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 추가의 양태에서, 본 발명은 암 치료에 있어서 동시, 별개 또는 연속 투여를 위한 조합물로서 본 발명의 항체 조성물 및 하나 이상의 화학요법제 또는 항신생물성 화합물을 포함하는 약제 물품에 관한 것이다. 본 발명의 항체 조성물은 2차 라인 치료, 즉 통상적인 화학요법제 또는 항신생물제를 이용한 치료 후에 또는 이와 동시에, 혹은 방사선 요법 및/또는 수술 후에 또는 이와 동시에 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1: A) 상이한 농도의 지시된 항체 및 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 A431NS 세포의 대사 활성. B) 상이한 농도의 지시된 항체 및 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 NCI-N87 세포의 대사 활성. C) 10 nM의 헤레글린 베타의 존재하에 상이한 농도의 지시된 항체 및 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 MCF7 세포의 대사 활성.
- 도 2: 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 A431NS 세포의 대사 활성.
- 도 3: 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 MCF7 세포의 대사 활성.
- 도 4: 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물로 10 nM의 헤레글린 베타의 존재하에 96시간 동안 처리된 NCI-N87 세포의 대사 활성.
- 도 5: 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물 및 참조 모노클로날 항체인 세툭시맙 및 트라스투주맙으로 96시간 동안 처리된 A431NS 세포, 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물 및 참조 모노클로날 항체인 세툭시맙 및 트라스투주맙으로 96시간 동안 처리된 NCI-N87 세포 및 상이한 농도의 지시된 항체 혼합물 및 참조 모노클로날 항체인 세툭시맙 및 트라스투주맙으로 10 nM의 헤레글린 베타의 존재하에 96시간 동안 처리된 MCF7 세포의 대사 활성.
- 도 6: 2 µg/ml의 지시된 항체 및 항체 혼합물로 96시간 동안 처리된 지시된 세포주의 성장 억제의 최대 수준
- 도 7: 지시된 항체 및 항체 혼합물로 밤새 처리한 후 세포주 HN5, NCI-N87 및 MCF7에서 EGFR, HER2 및 HER3 수준의 웨스턴 블롯 분석.

도 8-12: 암 세포주 A431NS (EGFR-의존성), H358 (EGFR-의존성), HCC202 (HER2-의존성), OE19 (HER2-의존성) 및 H820 (EGFR-의존성)의 성장 및 증식에 대한 상이한 항체 혼합물 및 항체의 효과를 도시하는 적정.

도 13: 지시된 항체 및 항체 혼합물로 밤새 처리한 후 세포주 H292 및 OVCAR-8에서 EGFR, HER2 및 HER3 수준의 웨스턴 블롯 분석.

도 14-20: 암 세포주 OE19, BT474, MDA-MB-175-VII, HCC202, N87, A431NS 및 A549의 성장 및 증식에 대한 상이한 항체 혼합물 및 항체의 효과를 도시하는 적정.

도 21-25: 암 세포주 A431NS, H1975, HCC202, AU565, 및 H358의 성장 및 증식에 대한 상이한 항체 혼합물 및 항체의 효과를 도시하는 적정.

도 26: A431NS 인간 종양 이종이식 모델에서 상이한 항체 혼합물 및 항체의 성장 억제 효과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0039] 용어 "항체"는 "항체 분자"는 혈청의 기능성 성분을 기재하며, 이는 종종 분자의 집합물(항체 또는 면역글로불린) 또는 하나의 분자(항체 분자 또는 면역글로불린 분자)를 언급한다. 항체는 특정 항원성 결정인자(항원 또는 항원성 에피토프)에 결합하거나 이와 반응할 수 있고, 차례로 면역학적 효과가 메커니즘을 유도할 수 있다. 개별적 항체는 보통 단일특이성으로 간주되고, 항체들의 조성물은 모노클로날(즉, 동일한 항체 분자로 구성) 또는 폴리클로날(즉, 동일한 항원, 또는 심지어 별개의 상이한 항원 상의 동일하거나 상이한 에피토프와 반응하는 2개 이상의 상이한 항체들로 구성)일 수 있다. 각각의 항체는 이의 해당 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 독특한 구조를 갖고, 모든 천연 항체는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄의 동일한 전체적인 기본 구조를 갖는다. 항체는 또한 집합적으로 면역글로불린으로 공지되어 있다.

[0041] 본원에서 사용되는 용어 "항체" 또는 "항체들"은 또한 키메라 및 단일 사슬 항체, 뿐만 아니라 항체의 결합 단편, 예를 들어, Fab, Fv 단편 또는 단일 쇄 Fv(scFv) 단편, 뿐만 아니라 다합체 형태, 예를 들어, 이합체 IgA 분자 또는 5가 IgM을 포함한다. 항체 미메틱(mimetic)도 포함된다. 항체는 인간 또는 비-인간 기원의 것, 예를 들어 뮤린 또는 그 밖의 설치류-유래 항체, 또는, 예를 들어 뮤린 항체에 기반한 키메라, 인간화 또는 재형성된(reshaped) 항체일 수 있다. 항체의 각각의 중쇄는 전형적으로 중쇄 가변 영역 (VH) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 CH1, CH2 및 CH3으로 지칭되는 3개의 도메인을 포함한다. 각각의 항체 경쇄는 통상적으로 경쇄 가변 영역 (VL) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 통상적으로 CL로서 지칭되는 단일 도메인을 포함한다. VH 및 VL 영역은 과변이(서열 및/또는 구조적으로 정의된 루프에서 과변이될 수 있는 "과가변 영역")의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 이들은 또한 프레임워크 영역 (FR)으로 명명된, 더욱 보존된 영역이 산재된 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 지칭된다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기 순서대로 정렬되는 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 가변 영역의 아미노산 잔기는 종종 케이벳(Kabat) 넘버링 양식으로서 알려진 표준화된 넘버링 방법을 이용하여 넘버링된다 (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

[0042] 항체가 본원에 기재된 명시된 항체로부터 "유래"되거나 항체에 "기반"한다고 언급될 때, 이는 "유래된" 항체가 특정 상황에 따라 하기 중 하나를 포함함을 의미한다: 상기 명시된 항체의 중쇄 CDR3 서열; 상기 명시된 항체의 중쇄 CDR3 서열 및 경쇄 CDR3 서열; 상기 명시된 항체의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 그리고 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 또는 상기 명시된 항체의 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열, 또는 상기 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열의 인간화 및/또는 친화성 성숙된 변이체, 또는 개개의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 지니는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열. 본원에 기재된 명시된 항체로부터 유래되거나 이에 기반한 항체는 일반적으로 상기 명시된 항체와 동일한 에피토프에 결합할 것이고 바람직하게는 상기 명시된 항체와 실질적으로 동일한 활성을 나타낼 것이다. 항체가 결합에 대해 상기 명시된 항체와 경쟁하는 경우 이러한 항체는 명시된 항체와 동일한 HER 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다.

[0043] 주로 아미노산 잔기에 있는 표적 항원 잔기와 항체의 상호작용의 특이성은 중쇄 및 경쇄의 6개 CDR에 있다. 따라서 CDR내 아미노산 서열은 CDR의 밖에 있는 서열보다 개별적인 항체들 간에 훨씬 많이 가변적이다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용을 책임지므로, 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열로 그래프트된 특수한 항

체로부터의 CDR 서열을 발현시키는 발현 벡터를 작제함에 의해 특수한 천연 발생 항체의 특징을 모방하는 재조합 항체, 또는 더욱 일반적으로 주어진 아미노산 서열을 지니는 임의의 특수한 항체를 발현시킬 수 있다. 결과적으로, 비-인간 항체를 "인간화"시킬 수 있고 더욱 실질적으로 원래 항체의 결합 특이성 및 친화성을 유지시킬 수 있다. 인간화에 대한 보다 상세한 논의가 하기에 제공된다.

[0044] "키메라 항체"는 이의 가장 넓은 의미에서 하나의 항체로부터의 하나 이상의 영역 및 하나 이상의 다른 항체로부터의 하나 이상의 영역을 함유하는 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 "키메라 항체"는 일반적으로, 부분적으로는 인간 기원의 것이고 부분적으로는 비-인간 기원의 것인, 즉 비-인간 동물, 예를 들어 마우스 또는 그 밖의 설치류, 또는 닭과 같은 조류에서 일부 유래된 항체이다. 키메라 항체는 인간 항-항체 반응, 예컨대 뮤린 항체의 경우, 인간 항-마우스 항체 반응의 위험성을 감소시키는데 있어서 비-인간 항체보다 바람직하다. 전형적인 키메라 항체의 예는 가변 영역 서열이 마우스의 면역화로부터 유래된 뮤린 서열인 반면 불변 영역 서열이 인간인 것이다. 키메라 항체의 경우, 비-인간 부분, 즉 전형적으로 가변 영역 서열의 프레임워크 영역은 항체를 인간화하기 위해 추가로 변경될 수 있다.

[0045] 용어 "인간화"는 항체가 전체적으로 또는 부분적으로 비-인간 기원의 것, 예를 들어 관심있는 항원으로 마우스를 면역화시켜 수득된 뮤린 항체 또는 그러한 뮤린 항체에 기반한 키메라 항체인 경우, 특히 중쇄 및 경쇄의 프레임워크 영역 및 불변 도메인에 있는 특정 아미노산을 대체시켜 인간에서 면역 반응을 회피하거나 최소화할 수 있다는 사실을 지칭한다. 모든 항체는 논의되고 있는 항체의 "인간화(humanness)" 정도와 어느 정도 관련되는 인간 항-항체 반응을 유도할 가능성을 지니는 것으로 알려져 있다. 비록 면역원성, 그리고 이에 의해 특정 항체의 인간 항-항체 반응을 정밀하게 예측할 수는 없지만, 비-인간 항체는 인간 항체보다 더욱 면역원성인 경향이 있다. 외래(일반적으로 설치류) 불변 영역이 인간 기원의 서열로 대체된 키메라 항체는 완전한 외래 기원의 항체보다 일반적으로 덜 면역원성인 것으로 나타났고, 치료용 항체에서의 추세는 인간화 또는 완전한 인간 항체를 향하고 있다.

[0046] 키메라 항체 또는 비-인간 기원의 그 밖의 항체의 경우, 그 결과로서, 이들을 인간화시켜 인간 항-항체 반응의 위험성을 감소시키는 것이 바람직하다. 키메라 항체의 경우, 인간화는 전형적으로 가변 영역 서열의 프레임워크 영역의 변형을 포함한다. 상보성 결정 영역(CDR)의 일부인 아미노산 잔기는 통상적으로 인간화와 관련하여 변경되지 않을 것이다, 특정 경우에, 예를 들어 글리코실화 부위, 탈아미드화 부위 또는 요망되지 않는 시스테인 잔기를 제거하기 위해 개별적인 CDR 아미노산 잔기를 변경시키는 것이 바람직할 수 있다. N-결합된 글리코실화는 올리고사카라이드 사슬이 트리펩티드 서열 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr에서 아스파라긴 잔기에 부착함에 의해 일어나며, 여기서 X는 Pro를 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. N-글리코실화 부위의 제거는 Asn 또는 Ser/Thr 잔기를, 바람직하게는 보존적 치환에 의해 상이한 잔기로 돌연변이시킴에 의해 달성될 수 있다. 아스파라긴 및 글루타민 잔기의 탈아미드화는 pH 및 표면 노출과 같은 요인에 의해 일어날 수 있다. 아스파라긴 잔기는 주로 서열 Asn-Gly에 존재할 때 특히 탈아미드화되기 쉽고, Asn-Ala과 같은 다른 디펩티드 서열에서는 적은 정도로 탈아미드화된다. 따라서, 그러한 탈아미드화 부위, 특히 Asn-Gly이 CDR 서열에 존재할 때, 전형적으로 관여된 잔기들 중 하나를 제거하기 위한 보존적 치환에 의해 그 부위를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 관여된 잔기들 중 하나를 제거하기 위한 CDR 서열에서의 치환도 본 발명에 포함시키고자 한다.

[0047] 항체 서열을 인간화하는 많은 방법이 당분야에 공지되어 있다; 참조: 예컨대, Almagro & Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633에 의해 개관됨. 한 가지 일반적으로 사용되는 방법은, 예컨대 뮤린-유래된 키메라 항체의 경우 뮤린 가변 영역 유전자에 대한 인간 생식계열 유전자 대응부를 동정하고 뮤린 CDR 서열을 이러한 프레임워크로 그래프트하는 것을 포함하는 CDR 그래프팅이다. CDR 그래프팅은 케이벳 CDR 정의에 기반할 수 있으나, 최근 간행물 (Magdelaine-Beuzelin et al. (2007) *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64: 210-225)은 IMGT 정의 (www.imgt.org)가 인간화의 결과를 향상시킬 수 있음을 제안하였다. CDR 그래프팅이 CDR 그래프트된 비-인간 항체의 결합 특이성 및 친화성, 및 이에 따라 생물학적 활성을 감소시킬 수 있으므로, 복귀 돌연변이를 CDR 그래프트된 항체의 선택된 위치에 도입시켜 부모 항체의 결합 특이성 및 친화성을 유지시킬 수 있다. 가능한 복귀 돌연변이를 위한 위치의 확인은 문헌 및 항체 데이터베이스에서 이용가능한 정보를 이용하여 수행될 수 있다. 복귀 돌연변이의 후보인 아미노산 잔기는 전형적으로 항체 분자의 표면에 위치한 것들인 반면, 숨겨지거나 낮은 정도의 표면 노출을 지니는 잔기는 일반적으로 변경되지 않을 것이다. CDR 그래프팅 및 복귀 돌연변이에 대안적인 인간화 기법은 비-인간 기원의 표면 노출되지 않은 잔기를 유지하는 한편 표면 잔기를 인간 잔기로 변경시키는 리서피싱(resurfacing)이다.

[0048] 특정 경우에, 표적 에피토프에 대한 결합 친화성을 향상시키기 위해 하나 이상의 CDR 아미노산 잔기를 변경시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 이것은 "친화성 성숙화"로 알려져 있고, 예를 들어 항체의 인간화가 감소된

결합 특이성 또는 친화성을 초래하고 복귀 돌연변이 단독에 의해 결합 특이성 또는 친화성을 충분히 향상시킬 수 없는 상황에서, 임의로 인간화와 함께 수행될 수 있다. 다양한 친화성 성숙화 방법, 예를 들어 문헌[Burks et al. (1997) *PNAS USA*, vol. 94, pp. 412-417]에 기재된 시험관내 스캐닝 포화 돌연변이발생 방법 및 문헌 [Wu et al. (1998) *PNAS USA*, vol. 95, pp. 6037-6042]의 단계식 시험관내 친화성 성숙화 방법이 당 분야에 공지되어 있다.

[0049] 상기 지시된 대로, 본 발명은 인간화 항체, 즉 달리 기재된 인간화된 항체를 포함한다. 이들은 또한 본 발명의 항체의 "인간화 변이체"로서 지칭될 수 있다. 특히, 임의의 특수한 아미노산 서열에 관해 본원에서 사용되는 용어 "중쇄 가변 영역 서열" 및 "경쇄 가변 영역 서열"은 특수한 서열뿐 아니라 이의 임의의 인간화 변이체도 포함하도록 의도된다. 본원에 기재된 항-HER 항체의 친화성 성숙된 변이체도 본 발명에 포함시키고자 한다.

[0050] 본원에서 이용되는 대로, 명시된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에 비해 특정한 최소 수준의 서열 동일성, 예컨대, 참조 서열과 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성, 예컨대 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 서열 또는 경쇄 가변 영역 서열에 대한 언급은 그러한 참조 서열의 인간화 및/또는 친화성 성숙된 변이체를 포함하도록 의도되나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 용어 "제조합 항체"는 항체의 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터 (또는 가능하게는 1개를 초과하는 발현 벡터, 전형적으로 2개의 발현 벡터)로 트랜스펙션된 세포 또는 세포주로부터 발현되는 항체를 지칭하며, 여기서 상기 코딩 서열은 자연적으로는 세포와 관련이 없다.

[0052] 용어 "벡터"는 상이한 유전적 환경들 간의 수송 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 핵산 서열이 삽입될 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 핵산 서열의 전사를 위한 조절 엘리먼트(적어도 적합한 프로모터)를 지니는 벡터를 "발현 벡터"로서 지칭한다. 용어 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환적으로 이용될 수 있다. 본 발명에 관해 사용된 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같이 당 분야에 공지된 임의의 적합한 유형의 것일 수 있다.

[0053] 용어 "폴리클로날 항체" 또는 "[모노클로날] 항체들의 혼합물"은 동일하거나 상이한 항원 상에 있는 상이한 특이적 항원성 결정인자와 결합하거나 반응할 수 있는 2개 이상의 상이한 항체 분자들의 조성물을 지칭한다. 본 발명과 관련하여, 폴리클로날 항체의 개별적인 항체는 HER 패밀리의 상이한 항원성 결정인자에 결합한다. 바람직하게는 본 발명의 폴리클로날 항체의 개별적인 항체가 HER 패밀리의 상이한 에피토프, 더욱 바람직하게는 별개의 그리고 실질적으로 중첩되지 않은 에피토프에 결합한다. 폴리클로날 항체의 가변성은 일반적으로 항체 분자의 가변 영역에 있는 것으로 여겨진다.

[0054] 항체는 인간 아이소형 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2, 또는 뮤린 아이소형 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgA와 같은 상이한 아이소형으로서 존재하는 것이 당 분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 항체는 어떠한 아이소형도 지닐 수 있다. 본 발명의 폴리클로날 항체 조성물의 개별적인 항체는 하나를 초과하는 아이소형의 항체를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 이들은 모두 동일한 아이소형을 갖는다.

[0055] 용어 "HER 의존성"은 증식, 성장, 운동성, 침습성, 생존력 및/또는 화학 저항성과 같은 악성 특성을 유지하기 위해 HER 패밀리 수용체들 중 하나 이상에 의존상태인 암 세포를 지칭한다. 의존성은 수용체 과발현, 수용체 돌연변이, 자가분비 성장 인자 생산, 및/또는 다른 수용체 시스템과의 교차-대화(cross-talk)에 의해 야기될 수 있다.

[0056] 용어 "pan-HER" 또는 "pan-HER 항체 조성물"은 2개 이상의 HER 패밀리 수용체 상의 2개 이상의 상이한 항원에 결합할 수 있는 항체 분자의 조성물을 지칭한다. 본 발명에 관해, 항체 조성물의 개별적인 항체는 HER 패밀리의 상이한 항원성 결정인자에 결합한다. 바람직하게는, 항체 조성물의 개별적인 항체는 EGFR 및 HER2, EGFR 및 HER3, HER2 및 HER3, 또는 EGFR, HER2 및 HER3에 각각 결합한다.

[0057] 용어 "HER"은 "배경기술" 단락에서 상기 기재된 "인간 표피 성장 인자 수용체"를 뜻하고 용어 "ErbB"와 상호교환적으로 사용되어 4개의 멤버인 EGFR/ErbB, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 및 HER4/ErbB4로 구성되는 수용체 티로신 키나제 (RTK)의 서브그룹의 특성을 묘사한다. 더불어, 이러한 4개의 수용체는 "HER 패밀리" 수용체를 구성한다. 본원에서 사용되는 대로, 이것은 HER의 변이체, 아이소형 및 종 상동체를 포함하고자 한다.

[0058] 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 항체의 결합 특이성을 결정하는데 주로 책임이 있는 항체의 가변 도메인에서 발견되는 "과가변" 영역을 지칭한다. 참조: 문헌[Lefranc et al (2003), IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, *Dev. Comp Immunol.* 27, 55-77]에서의 정의. 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 지칭되는 3개의

CDR 영역을 함유하는데, 그 중 CDR3이 가장 큰 가변성을 나타낸다.

[0059] 용어 "에피토프"는 동물에서 항원성 또는 면역원성 활성을 갖는 큰 문자 (예컨대, 항원 또는 항원성 부위)의 일부를 기재하기 위해 사용된다. 면역원성 활성을 지니는 에피토프는 동물에서 항체 반응을 유도하는 큰 문자의 일부이다. 항원성 활성을 지니는 에피토프는 당 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해 측정시 항체가 면역특이적으로 결합하는 큰 문자의 일부이다. 항원성 에피토프가 반드시 면역원성일 필요는 없다. 항원은, 독소, 바이러스, 박테리아, 단백질 또는 DNA와 같이, 항체 또는 항체 단편이 면역특이적으로 결합하는 물질이다. 항원 또는 항원성 부위는, 이것이 매우 작지 않은 한, 종종 하나를 초과하는 에피토프를 지니며, 자주 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 에피토프는 선형이거나 입체형태일 수 있다. 선형 에피토프는 일반적으로 항체에 의해 인지되는 단백질 문자 상에 약 6 내지 10개의 인접 아미노산들로 구성된다. 대조적으로, 입체형태적 에피토프는 순차적으로 정렬되지 않지만, 항체가 특정 3차원 구조를 인지하는 경우의 아미노산들로 구성된다. 단백질 문자가 3차원 구조로 폴딩될 때, 에피토프를 형성하는 아미노산은 항체가 입체형태적 에피토프를 인지할 수 있도록 병렬연결된다. 변성된 단백질에서 선형 에피토프만이 인지된다. 입체형태적 에피토프는, 당연히, 폴딩된 단백질의 바깥에 있어야 한다.

[0060] 용어 "별개의 에피토프"는 본 발명의 2개의 상이한 항체가 별개의 에피토프에 결합할 때, 항원 결합에 대해 100% 미만의 경쟁, 바람직하게는 항원 결합에 대해 80% 미만의 경쟁, 보다 바람직하게는 항원 결합에 대해 50% 미만의 경쟁, 가장 바람직하게는 가능한 한 적은 경쟁, 예컨대 항원 결합에 대해 약 25% 미만의 경쟁이 존재한다는 사실을 지칭한다. 동일한 항원과의 결합에 대해 서로 경쟁할 수 있는 항체는 동일한 에피토프 또는 중첩 에피토프에 결합할 수 있거나, 서로의 가까운 근접부에 결합 부위를 지닐 수 있어서, 경쟁이 주로 입체 장해에 의해 야기되게 한다. 항체 쌍의 "별개의 에피토프"에 대한 분석은, 예를 들어 HER 패밀리 및 개별적인 형광 표지된 항체를 발현시키는 세포 상에서 FACS (형광 활성화 세포 분류) 또는 그 밖의 유세포 분석을 이용하여 포화 항체 조건하에 결합 실험을 이용함으로써, 또는 흐름 세포 표면에 포획되거나 컨쥬게이션된 HER 패밀리 항원을 이용한 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해, 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. SPR을 이용하여 항체들 간의 경쟁을 측정하는 방법은 실시예에 기재되어 있다.

[0061] 별개의 에피토프는, 본 발명의 조성물 중 2개의 상이한 항-HER 항체가 항원 결합에 대해 충분히 낮게 경쟁하여 2개의 항체가 이들의 개개의 에피토프에 동시에 결합할 수 있다는 의미에서 "중첩되지 않는(non-overlapping)" 것이 바람직하다. 상이한 정도의 중첩이 존재할 수 있고, 어느 정도의 중첩이 존재함에도 불구하고 개별적인 항체가 이들의 에피토프에 실질적으로 결합할 수 있는 한 별개의 에피토프는 "중첩되지 않은" 것으로 고려될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다. 이것은 항원 결합에 대한 2개의 항체들 간의 경쟁이 약 50% 미만일 때의 경우로서 일반적으로 고려된다.

[0062] 유사하게, 본 발명의 항체와 "결합에 대해 경쟁하는" 항체는 항원 결합에 대해 약 50% 이상의 경쟁을 나타내는 것으로서 정의될 수 있다.

[0063] 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체는 에피토프의 위치에 따라 이들이 결합하는 항원의 활성에 다양한 영향을 미칠 수 있다. 항원의 활성 분위에서 에피토프에 결합하는 항체는 항원의 기능을 완전히 차단할 수 있는 반면, 상이한 에피토프에 결합하는 또 다른 항체는 항원 단독의 활성에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않을 수 있다. 그러나, 이러한 항체는 여전히 보체를 활성화시킴으로써 항원을 제거시킬 수 있고, 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에서의 하나 이상의 항체 결합과 조합될 때 상승 효과를 발생시킬 수 있다. 본 발명에 관해, 에피토프는 HER 패밀리의 세포외 도메인의 부분인 것이 바람직하다. 본 발명의 항원은 바람직하게는 항체나 항체 단편이 면역특이적으로 결합하는 세포외 도메인 HER 패밀리 단백질, 폴리펩티드 또는 이의 단편이다. HER 패밀리 관련 항원은 또한 항체나 항체 단편이 면역특이적으로 결합하는 HER 폴리펩티드 또는 이의 단편의 세포외 도메인의 유사체 또는 유도체일 수 있다.

[0064] 용어 "면역글로불린"은 혈액 또는 혈청에서 발견되는 항체의 혼합물의 집합적인 명칭으로서 일반적으로 사용되나, 그 밖의 공급원으로부터 유래되는 항체의 혼합물을 표기하는 데에도 이용될 수 있다.

[0065] 용어 "동족체(cognate) V_H 및 V_L 코딩 쌍"은 동일한 항체 생산 세포 내에 함유되거나 이로부터 유래된 V_H 및 V_L 코딩 서열의 본래의 쌍을 기재한다. 따라서, 동족체 V_H 및 V_L 쌍은 상기 세포가 유래되는 공여체에 본래 존재하는 V_H 및 V_L 쌍이다. 용어 " V_H 및 V_L 코딩쌍으로부터 발현된 항체"는 항체 또는 항체 단편이 벡터, 플라스미드 또는 V_H 및 V_L 코딩 서열을 함유하는 그 밖의 폴리뉴클레오티드로부터 생성된 것을 나타낸다. 완전한 항체 또는 이의 안정적인 단편으로 동족체 V_H 및 V_L 코딩 쌍이 발현되는 경우, 이들은 이들이 유래되는 세포로부터 본래 발

현되는 항체의 결합 친화성 및 특이성을 보존한다. 동족체 쌍의 라이브러리는 또한 동족체 쌍의 레퍼토리 또는 접합물을 언급하는 것이며, 이는 개별적으로 유지되거나 풀링될 수 있다.

[0066] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 길이 또는 번역후 변형에 관계 없는 임의의 아미노산 사슬을 의미한다. 단백질은 단량체 또는 다합체로 존재할 수 있고, 이는 2개 이상의 어셈블링된 폴리펩티드 사슬, 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 또는 펩티드의 단편을 포함한다.

[0067] 용어 "헤드-투-헤드(head-to-head) 프로모터"는 근접하게 위치하여 프로모터에 의해 구동되는 2개의 유전자 단편의 전사가 반대 방향으로 발생하는 프로모터 쌍을 지칭한다. 헤드-투-헤드 프로모터는 양-지향성(bi-directional) 프로모터로도 알려져 있다.

[0068] 용어 "트랜스펙션"은 외래 DNA를 세포로 도입시키는 광범위한 용어로 본원에서 사용된다. 상기 용어는 또한 외래 DNA를 세포로 도입시키기 위한 다른 기능적으로 동등한 방법, 예를 들어, 형질전환, 감염, 형질도입, 또는 공여체 세포 및 수용체 세포의 융합을 포함하고자 한다.

[0069] 본원에서 사용되는 용어 "성장을 억제한다" (예컨대, 세포에 대해 언급됨)는 것은 본 발명의 항체 조성물의 부재시의 동일한 세포의 성장에 비해, 상기 항체 조성물과 접촉시에 세포의 증식 (세포의 수에서의 증가) 또는 대사에서의 어떠한 측정가능한 감소, 예컨대 세포 배양 성장의 적어도 약 10%, 더욱 바람직하게는, 예컨대 적어도 약 20% 또는 30%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40% 또는 50%, 예컨대 적어도 약 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 심지어 100%의 억제를 포함한다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "치료"는 정후 또는 질병 상태를 완화, 감소, 개선 또는 근절(치유)하기에 충분한 양으로 본 발명의 항체 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 일반적으로 본 발명의 2개 이상의 항체의 투여는, 바람직하게는 치료에 이용되는 모든 항체를 함유하는 조성물의 형태로, 항체를 동시 투여함에 의해서일 수 있다. 그러나, 본 발명의 2개 이상의 항체를 별도로 투여하는 것도 가능하다. 따라서, 본원에서 예컨대 2개 이상의 항체를 포함하는 재조합 항체 조성물을 투여하는 것에 대한 언급은 2개 이상의 항체를 이와 같이 포함하는 조성물의 투여뿐 아니라, 항체들의 분리된 투여도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명의 2개 이상의 항체의 조합물을 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여될 수 있다.

[0071] 2개의 서열들, 예컨대 가변 영역 서열들 간의 동일성 퍼센트는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 캡을 고려하여, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수를 지칭한다 (동일한 위치의 # / 위치의 총 # × 100으로서 계산됨). 서열 비교 및 2개의 서열 간의 동일성 퍼센트의 결정은 용이하게 이용가능한 소프트웨어를 이용하여 수행될 수 있다. 적합한 소프트웨어 프로그램은 단백질과 뉴클레오티드 서열 둘 모두를 정렬하기 위해 온라인용과 다운로드용 둘 모두에 해당하는 다양한 공급원으로부터 이용가능하다. 하나의 적합한 프로그램은 www.clustal.org로부터 이용가능하거나, 대안적으로 다양한 다른 단백질 및 뉴클레오티드 인포메틱스 툴도 제공하는, 예컨대 European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk)로부터의 ClustalW (Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 11;22(22):4673-80)이다.

[0072] 특수한 항-EGFR 항체, 예컨대 992, 1024, 1030, 1254 및 1277로서 지칭되는 항체를 본원에서 언급할 때, 이러한 항체 번호는 일반적으로 WO 2008/104183호에 기재된 항-EGFR 항체를 의미한다.

[0073] 특수한 항-HER2 항체, 예컨대 4382, 4384, 4385 및 4518로서 지칭되는 항체를 본원에서 언급할 때, 이러한 항체 번호는 WO 2011/107957 A1호에 기재된 항-HER2 항체를 의미한다.

[0074] 특수한 항-HER3 항체, 예컨대 4785, 5038, 5082 및 5096으로서 지칭되는 항체를 본원에서 언급할 때, 이러한 항체 번호는 서열 목록에 제공된 DNA 및 아미노산 서열을 지니는 항-HER3 항체를 의미한다.

항체 혼합물

[0076] 한 구체예에서, 본 발명은 재조합 항체 조성물, 즉, 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자가 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하고 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자가 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하는 조성물에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 재조합 항체 조성물, 즉, 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자가 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하고 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자가 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하는 조성물에 관한 것이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다.

체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자, 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 3 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 별개의 항-HER 항체 분자, 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 3 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다. 심지어 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자, 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 3 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합할 수 있는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함한다.

[0077] 제 1 및 제 2 HER 패밀리 수용체는 바람직하게는 각각 EGFR 및 HER2, HER2 및 EGFR, EGFR 및 HER3, HER3 및 EGFR, HER2 및 HER3, HER3 및 HER2이다. 항체 분자가 HER 패밀리의 3개의 상이한 수용체에 결합하는 구체예에서, 제 1, 제 2 및 제 3 HER 패밀리 수용체는 바람직하게는 각각 EGFR과 HER2와 HER3, EGFR과 HER3과 HER2, HER2와 EGFR과 HER3, HER2와 HER3과 EGFR, HER3과 EGFR과 HER2, HER3과 HER2와 EGFR이다.

[0078] 별개의 항-HER 항체는 수용체 상의 중첩되지 않은 에피토프에 결합한다.

[0079] 항체의 비중첩 특성은 바람직하게는 HER을 발현시키는 세포를 이용한 FACS 분석에서 다르게 표지된 항체를 이용하여 혹은 흐름 세포 표면에 포획되거나 컨쥬케이션된 HER 항원을 이용한 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된다. 중첩되지 않은 에피토프에 결합하는 조성물은 이것이 하나 이상의 에피토프를 표적화하는 모노클로날 항체의 조성물에 비해 HER 형태에서의 차이에 덜 취약할 수 있고 돌연변이에 덜 약하기 때문에 더 넓은 범위의 HER 의존성 암 유형에 이용될 수 있다. 더욱이, 중첩되지 않은 에피토프에 결합하는 항체 조성물은 더 적은 에피토프를 표적화하는 조성물에 비해 양호한 효능을 제공할 수 있다. 특히, 항체 조성물은 생체내 암세포의 최종 분화와 관련하여 우수한 효능을 제공할 수 있다.

[0080] 본 발명의 항체 조성물에 제 1 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자 및 제 2 HER 패밀리 수용체의 항원에 결합하는 2개 이상의 별개의 항-HER 항체 분자를 포함시키는 것이 바람직하나, HER 패밀리의 3개 이상의 상이한 수용체에 결합할 수 있는 항체 조성물이 더욱 바람직하다. 이러한 바람직한 조성물은 본 발명의 항체 조성물을 어떻게 설계할 지에 대한 안내와 함께 하기에 보다 상세하게 기재된다.

[0081] 본 발명의 항체는 비인간 가변 사슬 및 인간 불변 사슬을 지니는 키메라 항체일 수 있다. 비인간 가변 사슬은 마우스, 랙트, 양, 돼지, 닭, 비인간 영장류 또는 그 밖의 적합한 동물로부터 비롯될 수 있다. 완전한 인간 항체를 얻기 위해, 인간 항체 유전자를 갖는 유전자이식 동물에서 항체를 생성시킬 수 있다. 항체는 또한 비인간 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열로 그래프트된 상기 기재된 인간화된 항체일 수 있다.

[0082] 바람직하게는 인간 불변 사슬은 IgG1 또는 IgG2 아이소형을 갖는다. 보다 바람직하게는 조성물의 모든 항체가 제조의 용이함을 위해 동일한 아이소형을 갖는다. 그러나, 일부 경우에 조성물에 상이한 아이소형을 갖는 항체를 포함시키는 것이 유리할 수 있다.

[0083] 바람직하게는 본 발명의 항체 조성물은 인간 EGFR, HER2 및 HER3, 돌연변이된 인간 EGFR, HER2 및 HER3, 및 인간 EGFR, HER2 및 HER3의 결실 변이체로 구성되는 군으로부터 선택된 HER 패밀리 수용체에 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 바람직하게는 항체는 인간 및 비인간 영장류 둘 모두의 EGFR, HER2 및/또는 HER3에 결합할 수 있고, 이에 따라 이들은 임상 실험 전에 관련 독성학 연구에서 시험될 수 있다. 바람직하게는, 비인간 영장류는 시노몰구스 원숭이 (*Macaca fascicularis*)이다.

[0084] 암 세포주 A431NS 및 MCF7 (실시예 3)을 이용하여 결과를 얻었고 상기 결과는 항-EGFR 혼합물 및 항-HER3 또는 항-HER2 혼합물의 조합물이 암세포 성장을 억제함에 있어서 상승적인 증가를 발생시켰고 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물의 조합물이 개별적인 혼합물 및 2개 수용체에 대한 혼합물보다 우수하였음을 나타내었다.

[0085] 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물의 조합물을 판매되는 모노클로날 항체인 세툭시맙 (항-EGFR) 및 트라스투주맙 (항-HER2) 그리고 이러한 2개 항체의 혼합물과 비교하였다. 그 결과는, 3개 수용체 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물이 상이한 세포주에서 세툭시맙 및 트라스투주맙 둘 모두는 물론 이러한 2개 항체의 혼합물보다 우수하였음을 나타낸다.

- [0086] 전체적으로 상기 결과는, 하나를 초과하는 HER 패밀리 수용체의 최적 표적화는 각각의 수용체에 대한 항체들의 혼합물을 조합시킴에 의해 수득되고 3개의 수용체를 표적화하는 것이 2개의 수용체를 표적화하는 것보다 우수함을 나타내었다.
- [0087] 세포주 MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-MB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 및 MDA-MB-468로 얻어진 결과(실시예 4)도 역시 항-EGFR 혼합물 및 항-HER2 혼합물의 조합이 시험된 모든 세포주를 억제하였음을 나타내었다. 이러한 수용체들 중 단 하나만을 표적화하는 것은 그 특정 수용체에 의존적인 세포주의 억제를 초래한다. 전체적으로, 이러한 결과는, EGFR 및 HER2에 대한 항체들의 혼합물이 훨씬 넓은 억제 프로파일을 제공하고, 이에 따라 궁극적으로 수용체들 중 어느 한 쪽에 의존적인 종양을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있음을 나타낸다.
- [0088] 웨스턴 블로트 연구로부터의 결과(실시예 5 및 7)는, 단일 수용체(EGFR, HER2 및 HER3)에 대한 항체의 혼합물이 이를 개개의 표적의 분해를 유도하고 각각의 표적에 대한 항체 혼합물들의 조합물이 3개 모두의 수용체의 능률적인 분해를 동시에 유도할 수 있음을 나타낸다.
- [0089] 암 세포주 A431NS, H358, HC202, OE19, 및 H820에서 얻은 결과(실시예 6)는, 비록 항체 혼합물 및 개별적인 항체들의 효과가 상이한 세포주들 간에 다르긴 하지만, 3개의 수용체 EGFR, HER2 및 HER3의 각각에 대한 항체들을 함유하는 항체 혼합물은 일반적으로 세포 성장 및 증식을 억제함에 있어서 효능이 있음을 나타낸다. 6개의 항체, 즉 3개 수용체 각각에 대해 2개씩의 항체를 함유하는 혼합물은 일반적으로 상이한 세포주에 걸쳐 가장 효능이 있었다.
- [0090] 실시예 8로부터의 결과는, 비록 항체 혼합물 및 개별적인 항체들의 효과가 상이한 세포주 간에 다르긴 하지만, 3개의 수용체 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 3개, 4개 또는 6개의 항체를 포함하는 항체 혼합물이 일반적으로 암 세포 성장 및 증식을 억제함에 있어서 매우 효능이 있음을 지적한다.
- [0091] 실시예 9로부터의 결과는, HER 패밀리에 있는 하나를 초과하는 수용체의 최적 표적화는 각각의 수용체에 대한 항체들의 혼합물을 조합시킴에 의해 얻어지고, 3개 수용체의 표적화는 2개 수용체의 표적화보다 우수하며, 항체들의 혼합물로 각각의 수용체를 표적화하는 것은 단일 항체로 각각의 수용체를 표적화하는 것보다 우수함을 나타낸다.
- [0092] 마지막으로, 생체내 효능 실험으로부터의 결과(실시예 10)는 EGFR+HER3 또는 EGFR+HER2+HER3에 대한 항체들 또는 항체 혼합물의 조합물로 A431NS 종양 이종이식을 치료하는 것이 개별적인 표적 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 모노클로날 항체 및 항체 혼합물, 또는 EGFR+HER2 또는 HER2+HER3에 대한 모노클로날 항체 및 항체 혼합물의 조합물에 비해 더욱 효과적이었음을 나타낸다.
- [0093] 이러한 실험으로부터 분명한 것은 본 발명자들이 제공하는 항체의 조합물이 매우 광범한 범위의 암 세포주에 대해 효능을 나타낸다는 것이다.
- [0094] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체 조성물은 항체 992, 1024, 1030, 1254, 1277 및 1565의 CDR를 지니는 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체들로 구성되는 군으로부터 선택되는 2개 이상의 별개의 항-EGFR 항체 분자를 포함한다.
- [0095] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 992+1030, 992+1024, 1024+1030, 1030+1254, 1030+1277, 1030+1565, 1254+1277, 1254+1565, 및 1277+1565의 CDR을 지니는 항체들로 구성되는 조합물의 군으로부터 선택되는 2개 이상의 별개의 항-EGFR 항체 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 항-EGFR 항체는 항체 1277+1565 또는 1254+1565의 CDR을 지닌다.
- [0096] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 4382, 4384 4385, 4517 및 4518의 CDR를 지니는 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체들로 구성되는 군으로부터 선택되는 2개 이상의 별개의 항-HER2 항체 분자를 포함한다.
- [0097] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 4382+4384, 4382+4385, 4382+4517, 4382+4518, 4384+4385, 4384+4517, 4384+4518, 4517+4518, 및 4385+4518의 CDR을 지니는 항체들로 구성되는 조합물의 군으로부터 선택되는 2개 이상의 별개의 항-HER2 항체 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 항-HER2 항체는 항체 4384+4517 또는 4385+4518의 CDR을 지닌다.
- [0098] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 4785, 5038, 5082, 및 5096의 CDR를 지니는 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이러한 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체들로 구성되는 군으로부터 선택되는 2개

이상의 별개의 항-HER3 항체 분자를 포함한다.

[0099] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 4785+5038, 4785+5082, 4785+5096, 5038+5082, 5038+5096, 및 5082+5096의 CDR을 지니는 항체들로 구성되는 조합물의 군으로부터 선택되는 2개 이상의 별개의 항-HER3 항체 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 항-HER3 항체는 항체 5038+5082의 CDR을 지닌다.

[0100] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 992+1024+4785+5082, 992+1024+4382+4385+4518, 992+1024+4382+4385+4518+4785+5082, 4382+4385+4518+4785+5082, 1565+4517+5082, 1277+4517+5082, 1277+4384+5038, 1277+4384+5082, 1277+1565+5038+5082, 1277+1565+4384+4517, 4384+4517+5038+5082, 1277+4384+4517+5082, 1277+4384+4517+5038, 1277+1565+4384+4517+5038+5082, 및 1277+1565+4385+4518+5038+5082의 CDR을 지니는 항체들로 구성되는 조합물의 군으로부터 선택된다.

[0101] 본 발명의 바람직한 구체예는 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열이 각각 상기 항체들 중 어느 하나의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열과 각각 90% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성, 예컨대 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 동일성을 지니고, 결합에 대해 상기 항체와 결합한다고 정의된 항체 분자를 포함하는 재조합 항체 조성물을 포함한다.

[0102] 특정 구체예에서, 본 발명의 항체 조성물은 1254, 1277 또는 1565로부터의 CDR을 지니거나 1254, 1277 또는 1565의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-EGFR 항체; 4384, 4385, 4517 또는 4518로부터의 CDR을 지니거나 4384, 4385, 4517 또는 4518의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-HER2 항체; 및 5038 또는 5082로부터의 CDR을 지니거나 5038 또는 5082의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항-HER3 항체를 포함한다.

[0103] 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대해 유도된 2개의 항체를 포함하며, 여기서 항-EGFR 항체는 1277+1565 또는 1254+1565로부터의 CDR을 지니거나, 1277+1565 또는 1254+1565의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하고; 항-HER2 항체는 4384+4517 또는 4385+4518로부터의 CDR을 지니거나, 4384+4517 또는 4385+4518의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하고; 항-HER3 항체는 5038+5082로부터의 CDR을 지니거나, 5038+5082의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합한다.

[0104] 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 1277+1565+4384+4517+5038+5082의 CDR을 지니는 항체, 또는 상기 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0105] 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 조성물은 항체 1277+1565+4385+4518+5038+5082의 CDR을 지니는 항체, 또는 상기 항체의 결합을 억제할 수 있고/거나 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0106] 하기 표 1은 첨부된 서열 목록에 개시된 항체 992, 1024, 1030, 1254, 1277, 1565, 4382, 4384, 4385, 4517, 4518, 4785, 5038, 5082, 및 5096의 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 (LC)의 DNA 및 아미노산 서열에 대한 서열 ID 번호를 나타낸다.

[0107]

표 1: 선택된 항-HER 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄의 DNA 및 아미노산 서열에 대한 서열 ID 번호

항체 번호	VH DNA 서열	VH 단백질 서열	LC DNA 서열	LC 단백질 서열
992	1	2	3	4
1024	5	6	7	8
1030	9	10	11	12
1254	13	14	15	16
1277	17	18	19	20
1565	21	22	23	24
4382	25	26	27	28
4384	29	30	31	32
4385	33	34	35	36
4517	37	38	39	40
4518	41	42	43	44
4785	45	46	47	48
5038	49	50	51	52
5082	53	54	55	56
5096	57	58	59	60

[0108]

하기 표 2 및 3은 본 발명에 따른 다양한 항-HER 항체의 중쇄 (표 2) 및 경쇄 (표 3)의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄의 아미노산 서열뿐 아니라 엔코딩 DNA 서열 (CHO 세포에서 발현에 최적화됨)이 첨부된 서열 목록에서 제공된다. 이러한 서열에 대한 SEQ ID 번호의 개관에 대해서는 상기 표 1을 참조하라.

[0110]

표 2: 선택된 항-HER 항체의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열

항체 번호	H CDR1	H CDR2	H CDR3	SEQ ID NO (CDR1/2/3)
992	GYTFTSYW	IYPGSRST	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	61-63
1024	GYTFTSHW	INPSSGRN	CVRYGGYDEAMDYW	64-66
1030	GFTFSSYA	ISVGGST	CARGSDGYFYAMDYW	67-69
1254	GFAYSTYD	ISSGGDAA	CARSRYGNYGDAMDYW	70-72
1277	GFAFSYSD	MSSAGDVT	CVRHRDVAMDYW	73-75
1565	GYTFTSYW	INPSNGGT	CARDGGLYDGYYFDFW	76-78
4382	GYTFTDYY	INPNNGGT	CVPGGLRSYFDYW	79-81
4384	GYTFTSHW	INPSNGGT	CARAYYDFSWFVYW	82-84
4385	GYTFTGYW	ILPGSGST	ARWGDGSFAY	85-87
4517	GFTFSSYG	ISGGGSYT	CARKGNYGNYGKLAYW	88-90
4518	GFNIKDIF	IDPANDNP	CAGGPAYFDYW	91-93
4785	GYSFTSYY	IYPGSGHT	CARPPYYSNYADWW	94-96
5038	GYSITSGFY	ISYDGSN	CARGGGYYYGNLFDW	97-99
5082	GYSITSAYY	IGYDGRN	CSREGDYGYSYDW	100-102
5096	GYTFTSYL	INPYNDGA	CAREGDYVRYGMDYW	103-105

[0111]

[0112] 표 3: 선택된 항-HER 항체의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열

항체 번호	L CDR1	L CDR2	L CDR3	SEQ ID NO (CDR1/2/3)
992	QDIGNY	YTS	CQHYNTVPPTF	106-108
1024	KSLLHSNGITY	QMS	CAQNLELPYTF	109-111
1030	KSVSTSGYSF	LAS	CQHSREFPLTF	112-114
1254	QSLVHSNGNTY	KVS	CSQNTHVYTF	115-117
1277	QSLVHSNGNTY	KVS	CSQSTHVPTF	118-120
1565	QDVDTA	WAS	CQQYSSYPLTF	121-123
4382	QDVSA	WAS	CQQHYTPPPTF	124-126
4384	QDISNY	YIS	CQQGNTLPLTF	127-129
4385	QNVGTA	STS	CQQYRSYPFTF	130-132
4517	ENIYSN	AAT	CQHFWGTPWTF	133-135
4518	QDVIAA	WAS	CQQHYSTPWT	136-138
4785	QSLLNSGNQKNY	WAS	CQSDYSYPYTF	139-141
5038	QDISNY	HTS	CQQGITLPWTF	142-144
5082	QDINNY	YTS	CQQSETLPWTF	145-147
5096	QSVLYISNERNY	WAS	CHQHLSSYTF	148-150

[0113]

[0114]

더욱이, 비인간 영장류에서 독성학 연구를 수행할 수 있으려면, 조성물의 모든 항체가 인간뿐 아니라 하나 이상의 추가의 영장류 ErbB 패밀리 수용체, 예컨대 침팬지 (*Pan troglodytes*), 레수스 뭉키 (*Macaca mulatta*), 시노몰구스 원숭이 (*Macaca fascicularis*) 또는 그 밖의 원숭이로부터의 ErbB에 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 시노몰구스 원숭이는 비교적 작은 동물이며, 독성학 연구에 매우 적합하다. 따라서, 추가의 영장류 ErbB 패밀리 수용체는 바람직하게는 시노몰구스 ErbB이다. 바람직하게는 항체는 인간 및 비인간 영장류 ErbB에 대략 동일한 친화성으로 결합한다.

[0115]

본 조성물의 항체의 추가의 바람직한 특징은 단백질 균질성인데, 이로 인해 항체들이 용이하게 정제될 수 있다. 개별적인 항체 멤버들의 경우, 특성규명의 용이함을 위해서는 하나의 뚜렷한 피크를 갖는 이온 교환 크로마토그래피 프로파일이 바람직하다. 최종 항체 조성물의 특성 규명의 용이함을 위해서는 명백한 이온 교환 크로마토그래피 프로파일도 바람직하다. 항체들을 조합시키는 경우, 이들이 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 구별될 수 있어서, 모든 항체를 갖는 조성물이 1회 진행(run)으로 특성규명될 수 있는 것이 또한 바람직할 수 있다.

[0116]

항체는 인간, 뮤린, 토키, 닭, 돼지, 라마, 양, 및 낙타와 같은 어떠한 기원의 것일 수 있다. 항체는 또한 실시예에 기재된 대로 키메라일 수 있거나, 당 분야에 기재된 널리 공지된 방법을 이용하여 이의 인간화, 초인화 또는 재형성된 버전일 수 있다.

[0117]

항체들은 투여를 위해 하나의 용기에서 제형화될 수 있다. 그러나, 이들은 개별적으로 제조, 정제 및 특성규명될 수 있고 각각의 용기에 하나의 항체를 지니는 부품들의 키트로서 분리된 용기에 제공될 수 있다. 이와 같이 이들은 동시에, 연속하여 또는 별도로 투여될 수 있다.

[0118]

본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항체, 즉 항체 992, 1024, 1030, 1254, 1277, 1565, 4382, 4384, 4385, 4517, 4518, 4785, 5038, 5082, 및 5096으로 구성되는 군으로부터 선택된 항체, 또는 이의 인간화 변이체; 또는 그러한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열, 또는 참조 서열과 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성, 예컨대 그러한 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 지니는 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

- [0119] 본 발명의 추가의 양태는 상기 정의된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 상기 지시된 대로, 본 발명과 관련하여 사용되는 발현 벡터는 당 분야에 공지된 임의의 적합한 유형의 벡터, 예컨대 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0120] 또한 본 발명의 추가의 양태는 상기 정의된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이고, 여기서 상기 숙주 세포는 상기 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 항체를 발현시킬 수 있다.
- [0121] 본 발명의 항체 및 항체 조성물의 생산
- [0122] 본 발명의 추가의 양태는 표피 성장 인자 수용체 (HER) 패밀리를 표적화하는 재조합 항체 및 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 양태의 한 구체예는 항체를 발현시킬 수 있는 상기 정의된 숙주 세포를 제공하는 단계, 상기 숙주 세포를 항체를 발현시키기에 적합한 조건하에 배양시키는 단계, 및 생성된 항체를 분리시키는 단계를 포함하는, 본원에 정의된 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0123] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 각각의 세포가 재조합 항-HER 항체를 발현시킬 수 있는 다수의 세포를 제공하는 단계, 조성물의 항체를 발현시키기에 적합한 조건하에 세포를 배양시키는 단계, 및 생성된 항체를 분리시키는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 재조합 항-HER 항체를 포함하는 재조합 항체 조성물을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0124] 본 발명의 항체 또는 항체 조성물은 재조합 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 생산하기 위해 당 분야에 일반적으로 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 본 발명의 단일 항체를 생산하는 경우에, 재조합 모노클로날 항체를 생산하기 위해 당 분야에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 본 발명의 항체 조성물을 생산하기 위해서, 개별적인 항체들은 별도로 생산될 수 있고, 즉 각각의 항체는 분리된 바이오반응기에서 생산되거나, 개별적인 항체들은 단일 바이오반응기에서 함께 생산될 수 있다. 만약 항체 조성물이 하나를 초과하는 바이오 반응기에서 생산되는 경우, 각각의 바이오반응기로부터 개별적으로 정제된 상충액에서 수득된 항체들을 풀링시킴에 의해 정제된 항-HER 항체 조성물을 수득할 수 있다. 세포주 또는 항체 제조물이 이후 시점에 업스트림에서 또는 다운스트림 프로세싱 이전이나 그 동안에 조합되는 경우, 다수의 바이오반응기에서 폴리클로날 항체 조성물을 생산하기 위한 다양한 접근법이 WO 2009/129814호 (참조로서 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0125] 개별적인 항체를 단일 바이오반응기에서 생산하는 경우, 이것은, 예컨대 WO 2004/061104호 또는 WO 2008/145133호 (둘 모두는 본원에 참조로서 포함된다)에 기재된 대로 수행될 수 있다. WO 2004/061104호에 기재된 방법은 항체 코딩 서열의 개별적 숙주 세포의 유전체로의 부위-특이적인 통합에 기초하며, V_H 및 V_L 단백질 사슬이 생산 동안 이들의 원래 페어링으로 유지되는 것을 보장한다. 또한, 부위-특이적인 통합은 위치 효과를 최소화하므로 폴리클로날 세포주에서 개별적 세포의 성장 및 발현 특성은 거의 유사할 것으로 예상된다. 일반적으로, 상기 방법은 하기를 포함한다: i) 하나 이상의 리콤비나제(recombinase) 인지 부위를 갖는 숙주 세포; ii) 숙주 세포와 양립하는 하나 이상의 리콤비나제 인지 부위를 갖는 발현 벡터; iii) 선택된 V_H 및 V_L 코딩 쌍을 스크리닝 벡터에서 발현 벡터로 이동시켜 발현 벡터의 접합물을 생성함으로써 전장 항체 또는 항체 단편이 벡터로부터 발현될 수 있도록 함(이러한 이동은 스크리닝 벡터가 발현 벡터와 동일한 경우에는 필요하지 않을 수 있다); iv) 숙주 세포를 발현 벡터의 접합물, 및 숙주 세포의 유전체에 있는 리콤비나제 인지 부위를 벡터에 있는 것과 조합시킬 수 있는 리콤비나제를 코딩하는 벡터로 트랜스펙션; v) 트랜스펙션된 숙주 세포로부터 폴리클로날 세포주 수득/생성; 및 vi) 폴리클로날 세포주로부터 항체 조성물의 발현 및 수집.
- [0126] WO 2008/145133호는 단일 바이오반응기에서 항체들을 생산하기 위한 대안적인 접근법을 기재한다. 이러한 방법은 a) 발현 벡터의 세트로서, 상기 벡터들 각각이 폴리클로날 단백질의 별개의 멤버를 엔코딩하는 별개의 핵산의 하나 이상의 복사체(copy)를 포함하는 발현 벡터의 세트를 제공하고, 세포의 유전체로의 발현 벡터의 부위-특이적인 통합을 회피하는 조건하에 숙주 세포를 각각의 발현 벡터로 별도로 트랜스펙션시킴으로써, 세포의 2개 이상의 조성물로서, 각각의 조성물이 폴리클로날 단백질의 한 별개의 멤버를 발현시키는 세포의 2개 이상의 조성물을 수득하고, c) 세포의 적어도 2개의 조성물을 혼합시켜 폴리클로날 세포주를 수득함에 의해, 2개 이상의 별개의 멤버를 포함하는 폴리클로날 항체 또는 그 밖의 폴리클로날 단백질을 발현시킬 수 있는 폴리클로날 세포주를 생성하는 것을 포함한다. WO 2004/061104호 및 WO 2008/145133호의 두 방법 모두는 재조합 폴리클로날 항체를 구성하는 모든 멤버가 단일 바이오반응기에서 생산되고 단일 공정으로 정제될 수 있게 함으로써, 각각의 항체에 대해 분리된 생산 및 정제 공정이 필요하지 않으면서 놀랍게도 동시에 상이한 항체를 균일하게 생산할 수 있다는 이점을 가진다. WO 2008/145133호의 방법은 증가된 수율을 제공하는 이점을 추가로 지니는데, 그 이

유는 각각의 생산 세포가 특정 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 다수의 복사체를 지닐 수 있기 때문이다.

[0127] 본 발명의 항체는 포유동물 세포뿐 아니라 비-포유동물 진핵생물 또는 원핵생물 세포, 예컨대 식물 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 균류, 대장균(*E. coli*) 등을 포함하는 다양한 유형의 세포에서 생산될 수 있다. 그러나, 항체는 CHO 세포, COS 세포, BHK 세포, 골수종 세포(예를 들어, Sp2/0 또는 NSO 세포)와 같은 포유동물 세포, NIH 3T3와 같은 섬유모세포, 또는 HeLa 세포, HEK 293 세포 또는 PER.C6 세포와 같은 무한증식(imortalized) 인간 세포에서 생산되는 것이 바람직하다.

[0128] 핵산 서열을 숙주 세포에 트랜스펙션시키는 방법은 당 분야에 널리 알려져 있다 (참조: 예컨대, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Edition, 2001). 예컨대 WO 2004/061104호에 기재된 대로, 부위-특이적인 통합을 위해, 적합한 숙주 세포는 하나 이상의 리콤비나제 인지 부위를 그 유전체에 포함할 것이다. 이러한 경우에, 적합한 발현 벡터는 숙주 세포의 리콤비나제 인지 부위(들)에 어울리는 재조합 인지 부위를 포함한다. 예컨대 부위-특이적인 통합 접근법을 이용하여 스크리닝 벡터로부터 선택된 VH 및 VL 코딩 쌍을 이동시키는 것에 관한 추가의 상세설명은 WO 2004/061104호에서 찾아볼 수 있다.

[0129] 본 발명의 재조합 항체 조성물은, 폴리클로날 세포주에 의해 발현되는 개별적인 항체의 상대 발현 수준에 있어서 실질적인 균일성을 유지하면서, 폴리클로날 위킹 세포 뱅크(pWCB)로부터의 하나의 앰풀을 적합한 배지에서 항체 발현의 충분한 수준을 허용하는 기간 동안 배양시킴에 의해 단일 바이오반응기에서 제조될 수 있다. 대략 15일 내지 50일의 생산 기간이 일반적으로 적합할 것이다. 유가식(fed) 회분 또는 관류 배양과 같이 당 분야에 공지된 배양 방법이 이용될 수 있다. 배양 배지는 바람직하게는 무혈청 배지이고, 보다 바람직하게는 무혈청 무단백질 배지, 예컨대 화학적으로 규정된 배지이다. 그러한 배양 배지는 전형적으로 생산에 이용된 특정 세포 유형의 성장을 위해 설계되고, 다수의 적합한 배지 제형이 시판된다.

[0130] 재조합 항체 조성물은 배양 배지로부터 수득되고 통상적인 정제 기법에 의해 정제된다. 이들은 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 젤 여과와 같은 후속 정제 단계와 조합된, 예를 들어 친화성 크로마토그래피를 포함할 수 있는데, 이러한 정제 기법이 재조합 항체의 정제를 위해 빈번하게 사용되어 왔기 때문이다. 2개 이상의 항체가 폴리클로날 세포주에 의해 단일 바이오반응기에서 생산될 때, 폴리클로날 항체 조성물 내에 모든 개별적인 멤버들의 존재는 전형적으로 정제, 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피 이후에 평가된다. 폴리클로날 항체 조성물의 특성규명은, 예컨대 WO 2006/007853 및 WO 2009/065414호 (본원에 참조로서 포함됨)에 기재된 대로 수행될 수 있다.

치료 조성물

[0132] 본 발명의 또 다른 양태는 활성 성분으로서 본 발명의 항체 조성물을 포함하는 약제 조성물, 또는 재조합 Fab 또는 또 다른 재조합 항체 단편 조성물이다. 그러한 조성물은 암의 완화, 예방 및/또는 치료를 위한 것이다. 약제 조성물은 인간 또는 가축이나 애완동물에 투여될 수 있으나, 전형적으로 인간에게 투여될 것이다.

[0133] 본 발명의 치료 조성물에서 개별적인 항체들 간의 비, 또는 본 발명의 개별적인 항체가 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여되는 경우에, 개별적인 항체들 간의 비는 종종 항체가 동등한 양으로 투여되도록 하는 비일 것이다, 반드시 그럴 필요가 있는 것은 아니다. 따라서, 2개의 항-HER 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 종종 이들을 1:1의 비로 함유할 것이고, 3개의 항-HER 항체를 포함하는 조성물은 종종 이들을 1:1:1의 비로 함유할 것이다. 그러나, 개별적인 항체의 특성에 따라서, 동등하지 않은 양의 상이한 항체를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 조성물 중 상이한 항-HER 항체들의 적합한 비는 WO 2010/040356호 (본원에 참조로서 포함됨)에 기재된 대로 측정될 수 있는데, 상기 특허에는 최적의 효력 및 효능을 갖는 조합 약물을 얻기 위해 폴리클로날 항체 조성물과 같은 조합 약물 생성물에서 화학적 개체(entity)들 간의 최적의 화학량론적 비를 확인하고 선택하는 방법이 기재되어 있다.

[0134] 약제 조성물은 본 발명의 항체 조성물 또는 이의 단편 외에 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 것이다. 이들은, 예를 들어 보존제, 안정화제, 계면활성제/습윤제, 에멀젼화제, 용해제, 삼투압을 조절하기 위한 염 및/또는 완충제를 포함할 수 있다. 용액 또는 혼탁액은 점도-증가 물질, 예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐파리돈 또는 젤라틴을 추가로 포함할 수 있다. 약제 조성물에 적합한 pH 값은, 적절한 경우, 완충제를 사용하여 유지된, 일반적으로 약 5.5 내지 8.5의 범위, 예컨대 약 6 내지 8, 예컨대 약 7일 것이다.

[0135] 예컨대, 암 환자에게 투여되는 적합한 제형 또는 조성물을 제공하기 위해 통상적인 조제 실무가 이용될 수

있다. 투여는 전형적으로 치료용일 것이며, 이것은 암 질환이 진단된 이후에 투여됨을 의미한다. 임의의 적합한 투여 경로가 이용될 수 있고, 예를 들어, 투여는 비경구, 정맥내, 동맥내, 피하, 근내, 복막내, 비내, 에어로솔, 좌제, 또는 경구 투여일 수 있다. 본 발명의 약제 조성물은 전형적으로 액체 용액 또는 혼탁액의 형태로 투여될 것이고, 보다 전형적으로 수용액 또는 혼탁액, 특히 등장성 수용액 또는 혼탁액의 형태로 투여될 것이다.

[0136] 본 발명의 약제 조성물은 그 자체로(*per se*) 공지된 방식으로 제조되며, 예를 들어, 통상적인 용해, 동결건조, 혼합, 과립화 또는 당제(*confectioning*) 공정에 의해 제조된다. 약제 조성물은 통상적인 조제 실무에 따라 제형화될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st edition), ed. A.R. Gennaro, 2005, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, 3rd edition, 2006, Informa Healthcare, New York, NY, USA] 참조).

[0137] 액제 제형의 대안으로서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 항체만을 포함하거나 만니톨과 같은 담체와 함께 포함하는 동결건조된 형태로 제조될 수 있는데, 이러한 경우 조성물은 사용 전에 살균수와 같은 액체로 재구성된다.

[0138] 약제 조성물은 약 1% 내지 약 95%, 바람직하게는 약 20% 내지 약 90%의 활성 성분을 포함한다. 본 발명에 따른 약제 조성물은, 예를 들어 앰풀, 바이알, 좌제, 정제 또는 캡슐의 형태와 같은 단위 용량 형태로 생산될 수 있다. 제형은 치료적 또는 예방적 유효량 (예컨대, 병리 상태를 예방, 제거, 또는 감소시키는 양)으로 개인에 투여되어 암성 질환 또는 그 밖의 병상에 대한 치료를 제공할 수 있다. 투여되는 치료제의 바람직한 투여량은 암의 종증도, 특정 환자의 전반적인 건강 상태, 화합물 부형제의 제형, 및 이의 투여 경로와 같은 변수에 의존적일 듯하다.

[0139] 본 발명에 따른 항체 조성물의 치료 용도

[0140] 본 발명에 따른 약제 조성물은 포유동물에서 질병의 치료 또는 개선, 특히 인간에서 암의 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 한 구체예는 치료적 유효량의 본 발명의 약제학적 항체 조성물을 인간 또는 그 밖의 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에서 암과 관련된 하나의 이상의 징후를 예방, 치료 또는 개선시키는 방법이다.

[0141] 특정 구체예는 본원에 정의된 재조합 항체 조성물을 어떠한 HER 패밀리 멤버의 과발현 또는 의존성을 특징으로 하는 질병, 특히 암에 걸린 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0142] 추가의 구체예에서, 본 발명은 유효량의 본원에 정의된 항체 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 항체 및/또는 TKI를 이용한 치료에 획득 저항성을 지니는 인간 또는 그 밖의 포유동물에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0143] 다수의 요인에 기반하여, 특히 하기 종양 유형에 본 발명의 항체 조성물을 이용한 치료가 필요할 수 있다: 유방암, 난소암, 위암, 결장암, 직장암, 전립선암, 방광암, 혀장암, 흑색종, 두경부암, 및 비소세포폐암. 본 발명의 항체 조성물은 EGFR 또는 HER2를 과발현시키는 암, 예를 들어 많은 유방암, 난소암 및 위암과 같은 특정 상피암의 치료에 특히 적용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0144] 이러한 적응증 각각과 관련하여, 2가지의 주요 임상 경로, 즉 1) 한 가지 이상의 추가의 치료적 처치에 관한 보조 요법 또는 2) 단일요법이 고려된다. 이러한 2가지 옵션을 하기에서 간단하게 검토한다.

[0145] 1) 보조 요법: 조합 요법으로도 알려진 보조 요법에서, 환자는 한 가지 이상의 추가의 치료적 처치, 전형적으로 화학요법제 또는 항신생물제 및/또는 방사선 요법과 함께 본 발명의 항체로 치료될 것이다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 조성물은 또한 VEGF를 표적화하는 항체와 같은 상이한 항암 항체와 함께 이용될 수 있다. 따라서 상기 나열된 일차 암 표적은 표준 1차 라인 및 2차 라인 요법 외에 본 발명의 항체 또는 조성물을 투여함에 의해 치료될 수 있다. 프로토콜 설계는, 예컨대 종양 부피의 감소 뿐만 아니라 표준 화학요법제의 통상적인 양을 감소시키는 능력에 의해 평가되는 유효성을 다룰 것이다. 이러한 투여량 감소는 화학요법제의 용량-관련 독성을 감소시킴으로써 추가적이고/이거나 지속된 요법을 가능케 할 것이다.

[0146] 본 발명의 항체 조성물을 암 세포의 최종 분화를 유도하는 것으로 알려진 작용제와 조합시킴에 의해, 효과가 추가로 향상될 수 있다. 그러한 화합물은, 예를 들어 레티노산, 트랜스-레티노산, 시스-레티노산, 페닐부티레이트, 신경 성장 인자, 디메틸 살포시드, 활성 형태 비타민 D3, 과산화소체 증식-활성화 수용체 감마, 12-0-테트

라데카노일포르볼 13-아세테이트, 헥사메틸렌-비스-아세트아미드, 형질전환 성장 인자-베타, 부티르산, 시클릭 AMP, 및 베스나리논(vesnarinone)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 화합물은 레티노산, 폐닐부티레이트, 모든-트랜스-레티노산, 및 활성 형태 비타민 D로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0147] 본 발명의 항체 조성물 및 하나 이상의 화합요법제 또는 항신생물성 화합물을 포함하는 약제 물품은 암 요법에서 동시, 별개 또는 연속 투여를 위한 조합 치료제로서 이용될 수 있다. 화합요법 화합물은 대상이 되는 특정 암의 치료에 적합한 임의의 화합요법제, 예를 들어 알킬화제, 예를 들어 시스플라틴, 카르보플라틴 및/또는 옥살리플라틴과 같은 백금 유도체; 식물 알코이드, 예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀 및/또는 이리노테칸; 항종양 항생제, 예를 들어 독소루비신 (아드리아마이신), 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신 미톡산트론, 닉티노마이신, 블레오마이신, 액티노마이신, 루테오마이신, 및/또는 미토마이신; 토포테칸과 같은 토포아이소머라제 억제제; 및 항대사산물, 예를 들어 플루오로우라실 및/또는 그 밖의 플루오로파리미딘으로 구성된 군으로부터 선택된 작용제일 수 있다.

[0148] 또한 본 발명의 항체 조성물은 티로신 키나제 억제제 (TKI)에 관한 보조 요법으로서 이용될 수 있는 것으로 고려된다. 이들은 수용체의 세포내 티로신 키나제 도메인과 상호작용하고, 세포내 Mg-ATP 결합 부위에 대해 경쟁함으로써 리간드 유도 수용체 인산화를 억제하는 주로 퀴나졸린 유도된 합성 저분자량 분자이다. HER2 키나제를 차단하는 여러 티로신 키나제 억제제가 현재 임상 개발중에 있다. 이들 중 일부는 또한 EGFR 또는 그 밖의 EGFR 패밀리 수용체를 표적화한다. 이러한 TKI의 검토에 관해서는 문헌[Spector et al. (2007) *Breast Cancer Res.* 9(2): 205]을 참조하라. 이렇게 본 발명의 항체 조성물 및 HER2를 표적화하는 하나 이상의 TKI를 포함하는 약제 물품을 또한 암 요법에서 동시, 별개 또는 연속 투여를 위한 조합 치료제로서 이용할 수 있다.

[0149] 그 밖의 구체예에서, 본 발명의 항체 조성물은 그 밖의 항체 치료제와 함께 이용될 수 있다. 이러한 예는, 예컨대 EGFR (에르비ট스(Erbxitux)® 또는 벡티빅스(Vectibix)®) 또는 VEGF (아바스틴(Avastin)®)에 대한 항체를 포함한다. 또한 그 밖의 구체예에서, 본 발명의 항체 조성물은 면역계의 세포를 자극하는 것으로 알려진 작용제와 함께 이용될 수 있고, 그러한 조합 치료는 본 발명의 항체 조성물의 효능에 있어서 강화된 면역-매개된 개선을 초래한다. 그러한 면역-자극제의 예는 재조합 인터루킨 (예컨대, IL-21 및 IL-2)을 포함한다.

[0150] 2) 단일요법: 종양의 단일요법에 있어서 본 발명에 따른 항체 조성물의 이용과 관련하여, 항체 조성물은 화학요법제 또는 항신생물제를 함께 사용하지 않으며, 즉 독립형 요법으로서 환자에게 투여될 수 있다.

면역컨쥬게이트

[0152] 본 발명의 조성물의 치료 용도를 위한 또 다른 옵션은 면역컨쥬게이트, 즉 하나 이상의 항암제에 컨쥬게이션된 항체의 형태이다. 특히 별개의 에피토프에 결합하는 본 발명의 조성물의 경우, 이것은 세포 표면 상에 가교된 항체-수용체 격자를 생성함으로써 단일 모노클로날 항체를 이용한 것에 비해 수용체 내재화의 수준을 잠재적으로 증가시킬 수 있는 것으로 고려된다. 따라서 하나 이상의 항암제에 그러한 조성물의 개별적인 항체들 중 하나 이상을 컨쥬게이션하는 것은 종양 세포의 내부에 컨쥬게이션된 항암제를 특이적으로 그리고 효과적으로 전달 할 가능성을 지니므로, 본 발명의 항체 조성물의 효과를 증대시켜 향상된 종양 세포-사멸 활성을 제공한다.

[0153] 세포독성제 (통상적인 화학요법제 및 그 밖의 소분자 항암 약물 포함), 사이토카인 (컨쥬게이트가 "면역사이토카인"으로 명명될 수 있는 경우), 독소 (컨쥬게이트가 "면역독소"로 명명될 수 있는 경우) 및 방사성핵종을 포함하는 다양한 유형의 항암제가 본 발명의 항체에 컨쥬게이션될 수 있고, 소수의 면역컨쥬게이트는 이미 임상용으로 승인된 바 있다. 여기에는 제발린(Zevalin)® (⁹⁰Y에 컨쥬게이션된 뮤린 항-CD20 항체), 벡사르(Bexxar)® (¹³¹I에 컨쥬게이션된 뮤린 항-CD20 항체) 및 밀로타르그(Mylotarg)® (칼리케아미신에 컨쥬게이션된 인간화 항-CD33 항체)가 포함된다. 임상 시험 테스트를 받은 그 밖의 면역컨쥬게이트는, 예컨대 독소루비신 또는 메이탄시노이드 화합물에 컨쥬게이션된 항체를 포함한다. 임상 시험 테스트를 받은 면역독소는 트령케이션된 슈도모나스 외독소 A에 컨쥬게이션된 여러 개의 항체를 포함한다. IL-2에 컨쥬게이션된 인간화 EpCAM 항체를 포함하는 면역사이토카인도 테스트를 받았다.

[0154] 세포독성제에 컨쥬게이션된 본 발명의 항체의 경우, 이들은 알킬화제 (예컨대, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴), 항대사산물 (예컨대, 메토트렉세이트, 카페시타빈, 켐시타빈), 아트라사이클린 (예컨대, 블레오마이신, 독소루비신, 미토마이신-C) 및 식물 알칼로이드 (예컨대, 도세탁셀 및 파클리탁셀과 같은 탁산, 및 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈과 같은 빈카 알칼로이드)를 포함하는 화학요법 약물의 주요 부류들 중 어느 것에 속할 수 있다. 면역컨쥬게이트의 이용은 항암제를 종양에, 특히 내재화 이후 종양 세포의 내부에 명확하게 겨냥하기 때문에, 본 발명의 항체에 기반한 면역컨쥬게이트는 유리하게는 칼리케아미신 또는 메이탄신 유도체와

같은 고도의 세포독성제, 또는 박테리아 독소 (예컨대, 슈도모나스 외독소 A, 디프테리아 독소) 또는 식물 독소 (예컨대, 리신)와 같은 독소에 기반할 수 있다.

[0155] 면역컨쥬게이트에서 컨쥬게이션된 항암제는 혈청에서 비교적 안정하지만 면역컨쥬게이트가 표적 세포내로 내재화될 때 작용제의 방출을 허용하는 불안정한 링커에 의해 일반적으로 항체에 연결된다. 적합한 링커는, 예를 들어 혈청의 중성 pH에서는 안정하지만 내재화 이후 리소좀 내의 약산성 조건에서는 산 가수분해되는 화학적 링커, 세포내 티올에 의해 절단되는 디설파이드 링커, 및 혈청에서는 안정하지만 세포내 구획에서 효소 절단되는 웹티드 링커를 포함한다.

[0156] 다양한 컨쥬게이션 정렬이 본 발명의 2개 이상의 항체를 함유하는 조성물에서 구상될 수 있다. 예를 들어, 2개의 항체를 이용하여 항체들을 2개 이상의 상이한 항암 약물에 컨쥬게이션하거나 하나의 항체를 다른 항체에 컨쥬게이션된 효소와 같은 작용제에 의해 활성화되는 프로드럭에 컨쥬게이션시킬 수 있을 것이다. 항체-지향성 효소 프로드럭 요법 (ADEPT)의 일반적 개념이 모노클로날 항체에 대해 기재되었는데, 여기서 프로드럭은 mAB-효소 컨쥬게이트에 의해 종양에 표적화된 효소에 의해 활성화되지만, 본 발명은 이러한 접근법을 특정 상황에 맞출 기회를 제공할 수 있다. 따라서, 정상 조직에 대한 손상을 회피하거나 감소시키면서 종양 세포 사멸을 특이적으로 증가시킬 수 있다.

[0157] 항암 면역컨쥬게이트에 대한 추가의 정보에 관해서는, 문헌 [Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Schrama et al. (2006) *Nature Reviews/Drug Discovery* 5:147-159; and Rohrer (2009) *chimica oggi/Chemistry Today* 27(5):56-60]을 참조하라.

[0158] 투여 용량 및 경로

[0159] 본 발명의 항체 조성물은 대상이 되는 질환의 치료에 효과적인 양, 즉 요망되는 결과를 달성하는데 필요한 투여량으로 그러한 기간 동안 투여될 것이다. 치료적 유효량은 치료되는 특정 질환, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 항체가 독립형 치료로서 투여되는지 또는 하나 이상의 추가의 항암 치료와 함께 투여되는지 여부와 같은 요인들에 따라 달라질 수 있다.

[0160] 종양 요법을 위한 유효량은 환자에서 질환 진행을 안정화시키고/거나 징후를 개선시키고, 바람직하게는, 예컨대 종양 크기를 감소시킴에 의해 질환 진행을 역전시키는 이의 능력에 의해 측정될 수 있다. 임을 억제하는 본 발명의 항체 또는 조성물의 능력은, 예컨대 실시예에 기재된 시험판내 검정에 의해서, 뿐만 아니라 인간 종양에서의 효능을 예측하게 하는 적합한 동물 모델에서 평가될 수 있다. 적합한 투여 섭생은, 예를 들어 단일 볼루스 (bolus) 또는 연속 주입으로서 투여되고, 각 경우의 긴급성에 따라 투여량의 조정이 가능한, 각각의 특정 상황에서의 최적 치료 반응을 제공하도록 선택될 것이다.

[0161] 본 발명에 따른 항체에 대한 구체적인 용량은 아직 결정되지 않았으나, 치료 용도로 승인된 유사한 제품 (예컨대, HER2 또는 EGFR에 대해 유도된 모노클로날 항체)과의 비교를 통해 정확한 용량 항목이 결정될 수 있다. 따라서 본 발명의 항체 조성물의 적절한 투여량은 항-HER2 모노클로날 항체 트拉斯투주맙 (헤르셉틴®) 또는 항-EGFR 모노클로날 항체 파니투무맙 (베티빅스®)에 대해 권고된 투여량과 유사할 것으로 고려된다. 특정 질환에 따라, 헤르셉틴®은 4 mg/kg의 초기 용량 및 후속하는 2 mg/kg의 주 1회 용량, 또는 8 mg/kg의 초기 용량 및 후속하는 3주마다의 6 mg/kg의 용량으로 유방암의 치료를 위해 (주입에 의해) 투여되는 한편, 베티빅스®는 14일마다 6 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0162] 본 발명의 항체 조성물의 적합한 용량은 0.1-100 mg/kg의 범위, 예컨대 약 0.5-50 mg/kg, 예컨대 약 1-20 mg/kg의 범위일 것으로 고려된다. 항체 조성물은, 예를 들어 적어도 0.25 mg/kg, 예컨대 적어도 0.5 mg/kg, 예컨대 적어도 1 mg/kg, 예컨대 적어도 1.5 mg/kg, 예컨대 적어도 2 mg/kg, 예컨대 적어도 3 mg/kg, 예컨대 적어도 4 mg/kg, 예컨대 적어도 5 mg/kg; 및 예컨대 많아야 50 mg/kg 이하, 예컨대 많아야 30 mg/kg 이하, 예컨대 많아야 20 mg/kg 이하, 예컨대 많아야 15 mg/kg 이하의 투여량으로 투여될 수 있다. 투여는, 보통, 예컨대 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 또는 4주마다 1회, 및 필요한 경우 투여량을 임의로 증가시키거나 감소시킬 수 있는 주치의가 적절하다고 판단하는 동안의 적합한 간격으로 반복될 것이다.

[0163] 3개의 별개의 전달 접근법이 본 발명에 따른 항체의 전달을 위해 고려된다. 통상적인 정맥내 전달은 아마 대부분의 종양에 대한 표준 전달 기법일 것이다. 그러나, 복막강 내의 종양, 예를 들어, 난소, 담도, 다른 관 등의 종양과 관련하여, 복막내 투여가 종양에서 고 용량의 항체를 수득하고 항체 제거율을 최소화하는데 유리함이 증명될 수 있다. 유사하게, 특정 고형 종양은 국부 관류에 적합한 맥관 구조를 가진다. 국부 관류는 종양 부위에서 고용량의 항체의 획득을 가능케 하고, 항체의 단기 제거를 최소화할 것이다.

[0164] 임의의 단백질 또는 항체 융합 기반 치료제를 이용함에 따른, 안정성 우려는 주로, (i) 사이토카인 방출 증후군, 즉 저혈압, 열, 진전, 오한, (ii) 단백질에 대한 면역원성 반응의 발생 (즉, 재조합 항체 생성물에 대한 환자에 의한 인간 항체의 발생), 및 (iii) HER 패밀리 수용체를 발현시키는 정상 세포, 예컨대 상피 세포에 대한 독성과 관련된다. 상기 임의의 안전성 우려를 모니터하기 위해 표준 시험 및 후속 절차가 이용된다.

[0165] 본 출원에 인용된 모든 특허 및 비특허 참조문헌은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.

[0166] 하기 비제한적인 실시예에서 본 발명을 추가로 설명할 것이다.

[0167] 실시예

[0168] 하기 실시예에서 이용된 EGFR 및 HER2를 표적화하는 항체는 모두 본원에 참조로서 포함된 WO 2008/104183 A2 및 WO 2011/107957 A1에 기재된 방법에 따라 확인되었다. 실시예에서 대조군 mAb로서 이용된 모노클로날 항체는 Synagis (팔리비주맙)이다. 모든 실시예에서, x-축 상의 농도는 총 항체 농도, 즉 2개 항체의 혼합물에서의 농도이고, 각각의 개별적인 항체는 전체의 1/2을 차지하며; 3개 항체의 혼합물에서는, 각각의 개별적인 항체가 전체의 1/3을 차지한다 (기타 등등).

[0169] 실시예 1: 항-HER3 항체의 클로닝

[0170] 면역화

[0171] 한 마리의 BALB/cJ, 한 마리의 C57BL/6 및 한 마리의 C3H (8-10주령)로 이루어진 3마리의 암컷 마우스를 면역화에 이용하였다. 마우스를 시판되는 HER3 단백질 (R&D Systems cat.#348-RB)로 면역시켰다. 처음 4회의 면역화 동안, HER3 단백질을 PBS에 희석시키고 프로인트 애쥬번트(Freund's Adjuvant)와 1:1(v/v)로 혼합하였다. 다섯 번째 및 최종 면역화에는 애쥬번트 없이 PBS 중 HER3 단백질을 제공하였다.

[0172] 면역 반응을 향상시키고 조절하기 위해 애쥬번트를 사용하였다. 첫 번째 면역화에서, 완전 프로인트 애쥬번트 (CFA)를 사용한 반면, 두 번째, 세 번째 및 네 번째 면역화를 위해서는 불완전 프로인트 애쥬번트(IFC)를 사용하였다. IFA는 광유로 구성된 수중유 에멀젼이고, CFA는 가열 사멸되고, 건조된 미코박테리움 종을 함유하는 IFA이다. 둘 모두의 애쥬번트는 저장소 효과(depot effect)를 갖는다. CFA의 미코박테리움은 면역계의 강력한 활성화를 생성하고, 이는 면역 반응의 장기간 지속성을 발생시킨다. 안정적인 에멀젼만을 마우스에 투여하였다.

[0173] 10 μ g의 재조합 HER3 단백질을 각각의 면역화에 이용하였다. 전체적으로, 마우스에 5회 주입하였다. 모든 마우스에 200 μ l의 항원-애쥬번트 에멀젼을 처음 4회의 주입시에 피하(s.c.) 주입하고 PBS 중 100 μ l의 항원을 다섯 번째 주입 동안 복막내(i.p.) 주입하였다. 면역화, 애쥬번트, 주입 경로 등의 요약은 표 4에 있다.

[0174] 마우스를 경추 틸골로 희생시키고, 비장과 서혜 램프절을 수거하였다. 70 μ m 세포 스트레이너 (strainer)(Falcon, BD Biosciences, Cat. No.352350)를 통해 분쇄시켜 단일 세포 혼탁액을 제조하였다. 3마리의 마우스로부터의 세포를 풀링시키고, 10% FBS를 지니는 찬 RPMI-1640에 재현탁시키고 스핀 다운(spun down)시켰다.

[0175] 표 4: 면역화 요약

일	면역화	애쥬번트	항원 μ g/용량	항원 농도 μ g/mL	용량 부피	투여 경로
0	1 st	CFA	10	50	200 μ l	s.c.
21	2 nd	IFA	10	50	200 μ l	s.c.
42	3 rd	IFA	10	50	200 μ l	s.c.
69	4 th	IFA	10	50	200 μ l	s.c.
86	5 th	PBS	10	100	100 μ l	i.p.
89	기관 회수	-	-	-	-	-

[0176]

[0177] 뮤린 형질 세포의 FACS 분류

[0178] 적혈구를 제거하기 위해 풀링된 세포 혼탁액을 0.17 M NH₄Cl에서 용해시켰다. 용해 후에 세포를 2% FBS/PBS에서 2회 세척하였다. 세포를 1 ml의 2% FBS/PBS에 재현탁시키고, Fc-블록(block) (항-마우스 CD16/CD32, BD

Biosciences, Cat. No.553141)과 인큐베이션하고, 1회 세척하였다. 2% FBS/PBS에서 재현탁시킨 후에, 세포를 항-마우스 CD43-FITC (BD Biosciences, Cat. No.553270), 항-마우스 CD138-PE (BD Biosciences, Cat. No. 553714), 항-마우스 IgM-호라이즌 (BD Biosciences, Cat. No. 560575), 항-마우스 IgG1-APC (BD Biosciences, Cat. No. 550874), 항-마우스 MHC II (I-A/I-Ed)-바이오틴 (BD Biosciences, Cat. No. 553622) 및 항-마우스 B220/CD45R-PerCP (BD Biosciences, Cat. No. 553093)로 암실에서 20분간 염색하였다. 세포를 세척하고, 스트렙타비딘-APC-Cy7 (BD Biosciences, Cat. No. 554063)과 20분간 인큐베이션하고, 세척하였다. 세포를 FACS Aria 세포 분류기 상에서 FACS 분류하였다. $B220^{\text{low}} \text{MHCII}^{\text{int}} \text{CD43}^+ \text{CD138}^+ \text{IgM}^-$ 인 세포가 PCR 반응 완충제를 함유하는 384-웰 미세역가 플레이트로 단일 세포 분류되었다. 플레이트를 원심분리하고, 냉동시키고, -80°C에서 저장하였다.

[0179] 동족체 V_H 및 V_L 쌍의 결합

[0180] 형질 세포로서 게이팅된 단일 세포 상에서 V_H 및 V_L 코딩 서열의 결합을 수행하여 V_H 및 V_L 코딩 서열의 동족체 페어링을 촉진하였다. 절차는 일-단계 다중 중첩-신장 RT-PCT에 이은 네스티드 PCR에 기반한 2단계 PCR 절차를 이용하였다. 본 실시예에서 이용된 프라이머 혼합물은 카파 경쇄만을 증폭시킨다. 그러나, 요망되는 경우 람다 경쇄를 증폭시킬 수 있는 프라이머가 다중 프라이머 혼합물 및 네스티드 PCR 프라이머 혼합물에 첨가될 수 있었다. 람다 프라이머가 첨가되면, 분류 절차가 람다 포지티브 세포를 제외시키지 않도록 조정되어야 한다. 동족체 V_H 및 V_L 서열의 결합 원리는 WO 2005/042774호 및 문헌[Meijer et al. (2006) *J Mol Biol.* 358(3):764-72]에 상세히 기재되어 있다.

[0181] 96-웰 PCT 플레이트를 해동시켰고 분류된 세포는 다중 중첩-신장 RT-PCR에 대한 주형으로 제공되었다. 단일-세포 분류가 반응 완충제(OneStep RT-PCR 완충제; Qiagen), RT-PCR에 대한 프라이머 및 RNase 억제제(RNasin, Promega)를 함유하기 전에, 분류 완충제를 각 웰에 첨가하였다. 중첩 신장 RT-PCR에 사용되는 프라이머뿐 아니라 프라이머 농도는 WO 2008/104183호의 표 3에 기재된 바와 동일하였다. 여기에 원스텝(OneStep) RT-PCR5Enzyme 혼합물(25배 희석; Qiagen) 및 dNTP 혼합물(각각 200 μM)를 보충하여 20 μl의 반응 부피에서 주어진 최종 농도를 수득하였다. 플레이트를 55°C에서 30분 동안 인큐베이션시켜 각 세포로부터 RNA의 역전사(RT)를 가능하게 하였다. RT 이후에, 플레이트를 하기 PCR 주기에 적용시켰다: 94°C에서 10분, 35x(94°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 5분), 72°C에서 10분.

[0182] PCR 반응을 필 실 바스켓(Peel Seal Basket)이 구비된 H20BIT 써멀 사이클러(Thermal cycler)에서 24개의 96-웰 플레이트(ABgene)에 대해 수행하여 고-처리량을 촉진하였다. PCR 플레이트를 주기 후 -20°C에서 저장하였다.

[0183] 네스티드 PCR 단계를 위하여, 96-웰 PCR 플레이트를 각 웰(20 μl 반응물)에서 하기 혼합물을 이용하여 제공된 최종 농도를 수득하도록 제조하였다: 1x 패스트스타트(FastStart) 완충제 (Roche), dNTP 혼합물(각각 200 μM), 네스티드 프라이머 혼합물, 퓨전(Phusion) DNA 폴리머라제(0.08U; Finnzymes) 및 패스트스타트 하이 피델리티(FastStart High Fidelity) 효소 블렌드(0.8 U; Roche). 네스티드 PCR에 사용되는 프라이머뿐 아니라 프라이머 농도는 WO 2008/104183호의 표 4에 기재된 바와 동일하였다. 네스티드 PCR에 대한 주형으로서, 1 μl를 다중 중첩-신장 PCR 반응물로부터 옮겼다. 네스티드 PCR 플레이트를 하기 열주기로 처리하였다: 35x(95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 90초), 72°C에서 10분. 무작위로 선택된 반응물을 1% 아가로스 겔 상에서 분석하여 약 890 염기쌍(bp)의 중첩-신장 단편의 존재를 입증하였다. PCR 단편의 추가 가공까지 플레이트를 -20°C에서 저장하였다.

[0184] 네스티드 PCR로부터의 결합된 V_H 및 V_L 코딩 쌍의 레퍼토리를 다양한 공여체로부터의 쌍을 혼합하지 않고 풀링시키고, 분취용 1% 아가로오스 겔 전기영동에 의해 정제하였다. 인간 카파 불변 경쇄 엔코딩 서열을 WO 2008/104183호에 기재된 대로 결합된 V_H 및 V_L 코딩 쌍의 풀링된 PCR 생성물의 V_L 코딩 영역으로의 중첩 신장에 의해 스플라이싱하였다. 인간 카파 불변 경쇄 엔코딩 서열을 50 μl의 전체 부피 중의 퓨전(Phusion) 효소(2U; Finnzymes), 1x 퓨전 완충제, dNTP 혼합물(각각 200 μM), hKCForw-v2 프라이머 및 Kappa3' 프라이머(사용된 프라이머 및 농도에 대해서는 WO 2008/104183호의 표 5 참조), 및 플라스미드 주형 pLL138(10 ng/μl)을 함유하는 반응물에서 카파 경쇄를 갖는 인간 항체의 코딩 서열을 함유하는 플라스미드로부터 증폭시켰다. 반응물을 25x(95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초), 72°C에서 10분의 열주기에 적용시켰다. 생성된 PCR 단편을 분취용 1% 아가로오스 겔 전기영동에 의해 정제하였다.

- [0185] 인간 카파 불변 엔코딩 영역 단편($1.4 \text{ ng}/\mu\ell$), 정제된 플링된 PCR 단편($1.4 \text{ ng}/\mu\ell$), 퓨전(Phusion) DNA 폴리머라제(0.5U; Finnzymes) 및 패스트스타트 하이 피엘리티 효소 블렌드(0.2U; Roche), 1x 패스트스타트 완충제(Roche), dNTP 혼합물(각각 $200 \mu\text{M}$), mhKCreV 프라이머 및 mJH 세트 프라이머를 함유하는 중첩 신장 PCR($50 \mu\ell$ 의 전체 부피)에 의한 다음 스플라이싱에 의해 각각의 레퍼토리에서 정제된 플링된 PCR 단편을 인간 카파 불변 엔코딩 영역(SEQ ID NO: 41)의 증폭되고 정제된 PCR 단편에 스플라이싱시켰다(사용된 프라이머 및 농도에 대해서는 WO 2008/104183호의 표 5 참조). 반응을 95°C 에서 2분, 25x(95°C 에서 30초, 55°C 에서 30초, 72°C 에서 1분), 72°C 에서 10분의 열주기에 적용시켰다. 생성된 PCR 단편(약 4518 bp)을 분취용 1% 아가로오스 젤 전기영동에 의해 정제시켰다.
- [0186] 동족체 V_H 및 V_L 코딩 쌍의 스크리닝 벡터로의 삽입
- [0187] HER3에 대한 결합 특이성을 지니는 항체를 확인하기 위해, 수득된 V_H 및 V_L 코딩 서열을 전장 항체로서 발현시켰다. 이것은 V_H 및 V_L 코딩 쌍의 레퍼토리를 발현 벡터로 삽입하고 숙주 세포로 트랜스펙션시키는 것을 포함한다.
- [0188] 결합된 V_H 및 V_L 코딩 쌍을 함유하는 발현 벡터의 레퍼토리를 생성하기 위해 2-단계 클로닝 절차를 이용하였다. 통계적으로, 발현 벡터의 레퍼토리가 스크리닝 레퍼토리의 생성을 위해 사용된 페어링된 동족체 V_H 및 V_L PCR 생성물의 수 보다 10배 많은 재조합 플라스미드를 함유하는 경우, 모든 독특한 유전자 쌍이 제시될 가능성이 99%이다. 따라서, 400개의 중첩-신장 V-유전자 단편이 수득되는 경우, 모든 독특한 유전자 쌍을 수득할 99%의 가능성을 지니기 위해 4000개 이상의 클론의 레퍼토리가 스크리닝을 위해 생성되었을 것이다.
- [0189] 간단히 말해, 인간 카파 불변 코딩 영역으로 스플라이싱된 결합된 V_H 및 V_L 코딩 쌍의 레퍼토리의 정제된 PCR 생성물을 PCR 생성물의 말단에 도입된 제한 부위에서 *Xho I* 및 *Not I* DNA 엔도누클레아제로 절단하였다. 절단되고 정제된 단편을 표준 라이게이션(ligation) 절차에 의해 *XhoI/NotI* 분해된 포유동물 IgG 발현 벡터, 00-VP-002(WO 2008/104183에 기재됨)로 라이게이션 혼합물을 대장균(*E. coli*)으로 전기 천공시키고 적합한 항생제를 함유하는 2xYT 플레이트에 첨가하고 37°C 에서 밤새 인큐베이션하였다. 증폭된 벡터의 레퍼토리를 플레이트로부터 회수된 세포로부터 표준 DNA 정제 방법(Qiagen)을 이용하여 정제시켰다. 플라스미드를 *AscI* 및 *NheI* 엔도누클레아제를 이용한 절단에 의해 프로모터-리더(leader) 단편의 삽입을 위해 제조하였다. 상기 효소의 제한 부위는 V_H 및 V_L 코딩 유전자 쌍 사이에 위치하였다. 벡터의 정제에 이어서, *AscI-NheI* 분해된 양-지향성 포유동물 프로모터-리더 단편을 표준 라이게이션 절차에 의해 *AscI* 및 *NheI* 제한 부위에 삽입하였다. 라이게이션된 벡터를 대장균(*E. coli*)에서 증폭시키고 플라스미드를 표준 방법을 이용하여 정제하였다. 통상적인 절차에 의해 스크리닝 벡터의 생성된 레퍼토리로 대장균(*E. coli*)을 형질전환시켰다. 수득된 콜로니를 384-웰 마스터 플레이트에 통합시키고 저장하였다.
- [0190] 포유동물 발현 플라스미드의 증폭을 위해 2-단계 절차를 이용하였다. 먼저, 박테리아를 용해시키고 수산화나트륨에서 인큐베이션시킴에 의해 DNA를 변성시켰다. 후속하여, TempLiphi 증폭을 수행하였다(GE Amersham). 이러한 방법은 롤링 서클(rolling circle) 증폭에 의해 이중-가닥 환형 DNA 주형을 지수적으로 증폭시키기 위해 박테리오파지 $\Phi 29$ DNA 폴리머라제를 이용한다. 포유동물 세포에서의 항체 발현을 위해, 제조자가 권고하는 대로 표준 트랜스펙션 조건을 이용한 293프리스타일(Freestyle)TM 발현 시스템 (Invitrogen)을 적용시켰다. 트랜스펙션에 앞서 세포에 밸프로에이트를 50mM 로 보충시켰고 다음 날 트립تون N1을 1.5% (w/v)의 최종 농도의 트랜스펙션 부피로 첨가시켰다. 항체를 함유하는 상층액을 트랜스펙션한 지 6일 후에 회수하였다. 표준 항-IgG ELISA를 이용하여 발현 수준을 산정하였다.
- [0191] 재조합 HER3 단백질로의 결합에 대한 스크리닝 (ELISA)
- [0192] 항체 특이성을 재조합 HER3-단백질을 항원으로서 이용하여 ELISA에 의해 측정하였다.
- [0193] 간단히 말해, 눈크 맥시소르브(Nunc maxisorb) 플레이트(cat.# 464718)를 밤새 4°C 에서 PBS 중에서 희석된 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HER3 단백질(R&D Systems cat.#348-RB)로 코팅하였다. $50 \mu\ell$ 2%-밀크(milk)-PBS + 0.05% Tween 20에서 차단하기 전, 플레이트를 PBS-T로 1회 세척하였다. 플레이트를 PBS-T로 1회 세척하고, $20 \mu\ell$ 의 2%-밀크-PBS-T 및 프리스타일293 트랜스펙턴트로부터의 $10 \mu\ell$ 의 상층액을 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 웰당 PBS-T $20 \mu\ell$ 로 1회 세척하였다. 2% 밀크-PBS-T에서 1:25000 희석된 이차 항체(HRP-염소-항-인간 카파 경쇄, Serotec, cat.# STAR 100P)를 첨가하여 웰에 결합된 항체를 검출하고, 실온에서 1시간 동안

인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-T에서 1회 세척한 후에, 5분 동안 인큐베이션된 25 μl 의 기질(Kem-en-tec Diagnostics, cat.# 4518)을 첨가하였다. 인큐베이션 후에 반응을 중지시키기 위해 25 μl 의 1M 황산을 첨가하였다. 450 nm에서 ELISA 판독기 상에서 특정 신호를 검출하였다. ELISA 데이터로부터 480개의 포지티브 항체 클론을 동정하였고 서열 분석 및 HER3으로의 결합을 확인하기 위해 선택하였다.

[0194] 서열 분석 및 클론 선택

ELISA에 의해 HER3에 결합하는 것으로 확인된 클론을 본래의 마스터(master) 플레이트(384-웰 포맷)으로부터 회수하였고, 아가 플레이트 상에 스트리킹하여 단일 콜로니를 생성하였으며, 이것을 LB-배지 배양물로 끌라내어 강하게 진탕시키며 37°C ON에서 인큐베이션시켰다. 플라스미드 DNA를 Qiaprep 96 터보 미니-프렙 키트 (Qiagen, cat.# 27193)를 이용하여 클론으로부터 분리시키고, V-유전자의 DNA 서열분석을 위해 제공하였다. 서열을 정렬시키고, 모든 독특한 클론을 선택하였다. 수득된 서열의 다중정렬은 각각의 특정 클론의 독특함을 나타내었고, 독특한 항체의 확인을 가능케 하였다. 서열분석되는 클론의 서열 분석 후, 2개 내지 40개가 넘는 멤버로 된 관련된 서열의 33개의 클러스터뿐 아니라 단 한 번만 표시되는 20개가 넘는 클론유형을 동정하였다. 각각의 관련된 서열의 클러스터는 대개 공통의 전구체 클론의 체세포 과돌연변이(somatic hypermutation)를 통해 유래되었다. 종합적으로, 각각의 클러스터로부터의 1 내지 2개의 클론을 서열 및 특이성의 확인을 위해 선택하였다. 클러스터 분석에 기반하여, 소규모 발현 및 추가의 특성규명을 위해 119개의 클론이 선택되었다. 선택된 항체 가변 영역의 서열은 서열 목록에 제시되어 있다. 서열 목록에 제시된 경쇄 서열은 모두 동일한 인간 카파 불변 영역을 포함하고, 이는 아미노산 -TVAAP-로 시작하고 C-말단에서 -NRGEC로 종료된다. 항체를 엔코딩하는 클론을 확인하기 위해, DNA 플라스미드를 제조하고 2 ml 규모의 프리스타일 CHO-S 세포 (Invitrogen)의 트랜스펙션을 발현을 위해 수행하였다. 트랜스펙션한 지 6일 후에 상층액을 회수하였다. 발현 수준을 표준 항-IgG ELISA를 이용하여 산정하였고, 특이성을 "제조합 HER3 단백질로의 결합에 대한 스크리닝"에서 상기 기재된 대로 HER3 특이적 ELISA에 의해 그리고 HER3 과발현 세포에 결합하는 항체의 고 처리량 스크리닝 공초점 현미경검사 (하기 참조)에 의해 측정하였다.

[0196] HER3 과발현 세포로의 결합에 대한 스크리닝 (OPERA)

119개 클론을 HER3-과발현 유방암 세포주 (MCF-7)로의 결합에 대해 공초점 현미경검사를 이용하여 스크리닝하였다. 10,000개의 MCF-7 세포를 384-웰 세포 캐리어 플레이트 (Perkin Elmer, cat.# 6007439)의 각각의 웰에 시딩하고 밤새 부착되게 하였다. 배지를 다시 폐기하고, 세포를 세척하고, 2% 포름알데히드 용액 (Aldrich cat.# 533998)으로 고정시켰다. 세척 후, 40 μl 의 항체 상층액을 각각의 웰로 옮기고, 플레이트를 2시간 동안 인큐ベ이션시킨 후에, 웰의 배지를 폐기하고, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Alexa-488 표지된 염소 항-인간 IgG (H+L, Invitrogen cat.# A11013), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CellMask Blue (Invitrogen cat.# H34558) 및 1 μM Hoechst 33342 (Invitrogen cat.# H3570)를 함유하는 30 μl 의 새로운 배지를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 추가로 30분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 OPERA 고 처리량 공초점 현미경검사 (Perkin Elmer)를 이용하여 형광성 수준을 측정하였다.

[0198] ELISA 및 OPERA 확인 스크린에 의해 얻어진 결합 데이터로부터, 중간 규모 발현을 위한 64개 클론을 선택하였다.

[0199] 실시예 2: EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 최적 항체 혼합물의 선택

[0200] 본 실시예는 각각의 개별적인 HER 패밀리 수용체 (EGFR, HER2 및 HER3)에 대한 항체들의 혼합물이 개별적인 항체보다 우수하였음을 입증한다.

[0201] 방법

[0202] 각각의 수용체에 대한 3개의 모노클로날 항체를 본 연구를 위해 선택하였다 (표 5). 각각의 수용체에 대한 항체는 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 확인된 대로 중첩되지 않은 에피토프에 결합한다.

[0203]

표 5: 연구에 이용된 항체

표적	항체
EGFR	992 키메라 IgG1
EGFR	1024 키메라 IgG1
EGFR	1030 키메라 IgG1
HER2	4382 키메라 IgG1
HER2	4385 키메라 IgG1
HER2	4518 키메라 IgG1
HER3	4785 키메라 IgG1
HER3	5082 키메라 IgG1
HER3	5096 키메라 IgG1

[0204]

[0205]

생존력 분석을 이용하여 암 세포주 A431NS (EGFR), NCI-N87 (HER2) 및 10 nM 헤레글린 베타로 자극된 MCF-7 세포 (HER3)의 성장 및 증식을 억제하는 능력에 대해 선택된 항체 및 항체 혼합물을 시험하였다. 세포 손상은 부득이하게 대사성 세포 기능 및 성장을 위한 에너지를 유지하고 제공하는 세포의 능력을 상실시킬 것이다. 대사 활성 검정은 이러한 전제를 기초로 하며, 보통, 미토콘드리아 활성을 측정한다. 세포 증식 시약 WST-1(Roche Cat. No. 11 644 807 001)은 생육할 수 있는 세포의 대사 활성을 측정하는 미리 제조된(ready-to-use) 기질이다. 대사 활성을 생육할 수 있는 세포의 수와 관련이 있는 것으로 가정된다. 이러한 실시예에서, 암세포를 다양한 농도의 항체로 96시간 동안 처리한 후 대사적으로 활성인 세포의 수를 측정하는데 WST-1 검정을 이용하였다.

[0206]

WST-1 검정을 수행하기 전에, 적절한 항체 및 항체 혼합물을 2%의 FBS 및 1%의 P/S이 보충된 적절한 배지에서 100 µg/ml의 최종 총 항체 농도로 희석시켜, 가장 높은 항체 농도를 함유하는 웰에서 50 µg/ml의 최종 총 항체 농도를 산출하였다. 그 후 항체의 3배 연속 희석을 수행하였다. 이어서 적절한 수의 세포를 384-웰 플레이트의 실험용 웰에 첨가하였다. 플레이트를 가습된 인큐베이터에서 37°C에서 4일간 인큐베이션하였다. 그 후 WST-1 시약을 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 1시간 동안 오비탈 플레이트 진탕기로 옮기고 ELISA 판독기를 이용하여 450 및 620 nm (기준 파장)에서 흡광도를 측정하였다. 대사적으로 활성인 세포 (MAC)의 양을 하기에 따라 미처리 대조군의 비율로서 계산한다:

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{실험}} - OD_{\text{배지}})}{(OD_{\text{미처리}} - OD_{\text{배지}})} \right) \times 100$$

[0207]

결과

[0209]

세포주 A431NS 상에서 3개의 항-EGFR 항체 및 이들의 모든 가능한 혼합물의 적정으로부터의 결과를 도 1A에 도시한다. 항체들의 혼합물은 개별적인 항체보다 우수한 것이 명백하다. 992 및 1024로 구성된 항체 혼합물을 선택하였는데, 그 이유는 이것이 가장 높은 효능 및 효력을 지니기 때문이다. 세포주 NCI-N87 상에서 3개의 항-HER2 항체 및 이들의 모든 가능한 혼합물의 적정으로부터의 결과를 도 1B에 도시한다. 역시 항체들의 혼합물은 개별적인 항체보다 우수하였다. 4382, 4385 및 4518로 구성된 항체 혼합물을 선택하였는데, 그 이유는 이것이 가장 높은 효능 및 효력을 지니기 때문이다. 10 nM의 헤레글린 베타로 자극된 세포주 MCF7 상에서 3개의 항-HER3 항체 및 이들의 모든 가능한 혼합물의 적정으로부터의 결과를 도 1C에 도시한다. 최상의 모노클로날 항체 5082 및 최상의 항체 혼합물 4785+5082를 판별하기 곤란하였다. 그러나, 혼합물이 더 나은 경향이 약간 있었고, 이에 따라 pan-HER 혼합물의 시험을 위해 선택되었다.

[0210]

실시예 3: pan-HER 항체 혼합물의 암 억제 활성

[0211]

본 실시예는 하나를 초과하는 HER 패밀리 수용체의 최적 표적화가 각각의 수용체에 대한 항체들의 혼합물을 조합시킴에 의해 달성되고 3개 수용체의 표적화가 2개 수용체의 표적화에 비해 우수하였음을 입증한다.

[0212]

방법

[0213]

3개의 수용체에 대해 최적화된 혼합물인 992+1024 (EGFR), 4382+4385+4518 (HER2) 및 4785+5082 (HER3)뿐 아니

라 이들의 모든 가능한 혼합물을 A431NS (EGFR), NCI-N87 (HER2), 및 10 nM 헤레큘린 베타로 자극된 MCF-7 세포 (HER3)의 성장 및 증식을 억제하는 능력에 대해 실시예 2에 기재된 것과 유사한 생존력 분석을 이용하여 시험하였다.

[0214] 결과

[0215] 세포주 A431NS, MCF7 및 NCI-N87에 대한 3개 항체 혼합물 및 이들의 모든 가능한 혼합물로부터의 결과를 도 2, 3 및 4에 각각 도시한다. A431NS 세포에서 EGFR 혼합물 및 HER3 또는 HER2 혼합물의 조합물은 암 세포 성장의 억제에 있어서 상승적인 증가를 발생시켰다 (도 2). HER2 및 HER3에 대한 혼합물들의 조합물은 A431NS 세포에서 어떠한 억제 효과도 갖지 않았다. 그러나, 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물들의 조합물은 개별적인 혼합물 및 2개 항체에 대한 혼합물들의 조합물보다 우수하였다.

[0216] 유사한 결과가 MCF7 세포주에서 발견되었다 (도 3). EGFR 혼합물 및 HER3 또는 HER2 혼합물 및 HER2 및 HER3 혼합물의 조합물은 암 세포 성장의 억제에 있어서 상승적인 증가를 발생시켰다. 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물들의 조합물은 개별적인 혼합물 및 2개 수용체에 대한 혼합물들의 조합물에 비해 우수하였다.

[0217] NCI-N87 세포주에서는 효과적인 항-HER2 혼합물을 항-EGFR 혼합물이나 항-HER3 혼합물과 조합시킴에 의해 효력 또는 효능에 있어서 어떠한 증가도 달성되지 않았다 (도 4). EGFR 및 HER3에 대한 혼합물들의 조합물은 NCI-N87 세포에 대해 어떠한 억제 효과도 갖지 않았다. 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물들의 조합물은 항-HER2 혼합물과 유사한 효력 및 효능을 지녔다.

[0218] 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물의 조합물을 판매되는 모노클로날 항체인 세툭시맙 (EGFR) 및 트라스투주맙 (HER2) 그리고 이러한 2개 항체의 혼합물과 비교하였다 (도 5). 그 결과는, pan-HER 혼합물이 3개 모두의 세포주에서 세툭시맙 및 트라스투주맙 둘 모두는 물론 이러한 2개 항체의 혼합물보다 우수하였음을 입증한다.

[0219] 전체적으로 본 실시예에서의 결과는, 하나를 초과하는 HER 패밀리 수용체의 최적 표적화는 각각의 수용체에 대한 항체들의 혼합물을 조합시킴에 의해 수득되었고 3개의 수용체를 표적화하는 것은 2개의 수용체를 표적화하는 것보다 우수하였음을 입증한다.

[0220] 실시예 4: 항체 혼합물의 조합물로 2개의 HER 패밀리 수용체인 EGFR 및 HER2를 동시에 표적화함에 의한 억제 프로파일

[0221] 본 실시예는 항-EGFR 혼합물 및 HER2 혼합물의 조합물이 암 세포주 MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-MB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 및 MDA-MB-468을 억제함을 입증한다.

[0222] 방법

[0223] 항-EGFR 혼합물 (992+1024), 항-HER2 혼합물 (4382+4385+4518) 및 이러한 2개 혼합물의 조합물을 EGFR 또는 HER2 의존성을 지니는 10개의 인간 암 세포주의 성장을 억제하는 능력에 대해 조사하였다. 판매되는 모노클로날 항체인 세툭시맙 및 트라스투주맙을 대조군으로서 포함시켰다.

[0224] 암 세포주 MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-MB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 및 MDA-MB-468을 2 μ g/ml의 항-HER2 항체를 함유하는 배지에서 1000개 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 플레이트를 가습된 인큐베이터에서 37°C로 4일 동안 인큐베이션하였다. 그 후 20 μ l의 WST-1 시약을 pr. 웰에 첨가시키고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 플레이트를 오비탈 플레이트 진탕기로 옮기고 추가로 1시간 동안 두었다. 흡광도를 ELISA 판독기 상에서 450 및 620 nm (기준 파장)에서 측정하였다. 성장 억제의 수준을 미처리된 대조군의 비율로서 계산하였다.

[0225] 결과

[0226] 세포 성장 억제를 조사한 결과는 도 6에서 찾아볼 수 있고 이러한 결과는 항-EGFR 혼합물 및 HER2 혼합물의 조합물이 시험된 모든 세포주를 억제함을 나타낸다. 수용체 중 단 하나의 표적화는 그 수용체에 의존적인 세포주를 억제시켰다. 전체적으로 이러한 결과는 EGFR 및 HER2에 대한 항체의 혼합물의 조합물이 훨씬 넓은 억제 프로파일을 제공하고, 이에 따라 궁극적으로 이러한 수용체들 중 어느 한 쪽에 의존적인 종양을 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있음을 나타낸다.

[0227] 실시예 5: 항체 혼합물들의 조합물로 EGFR, HER2 및 HER3의 분해

[0228] 본 실시예는 항체들의 혼합물이 이들의 표적 (EGFR, HER2 또는 HER3)의 분해를 유도하고 3개 모두의 표적에 대

한 혼합물의 조합물이 모든 수용체의 분해를 동시에 유도할 수 있음을 입증한다.

[0229] **방법**

[0230] 항체 혼합물 및 혼합물들의 조합물에 의해 유도된 EGFR, HER2 및 HER3 분해를 연구하기 위해, 48시간 동안 항체로 처리된 HN5, N87 및 MCF7 세포의 전(whole) 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 세포를 T-75 배양 플라스크에서 성장시켰고 50% 컨플루언트(confluent)에서 배양 배지를 제거하고, 세포를 1xPBS에서 세척하고, 0.5% FBS를 함유하는 5 ml의 배지에서 희석된 20 µg/ml의 항체로 처리하였다. 세포를 48시간 동안 처리한 후에, 전 세포 용해물을 표준 RIPA 완충제를 이용하여 제조하였다. 각각의 샘플에서 총 단백질 농도를 측정하였고 EGFR, HER2 또는 HER3에 대한 일차 항체를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 1-10 µg의 단백질을 분석하였다. β-액틴에 대한 항체를 로딩 대조군으로서 이용하였다.

[0231] **결과**

[0232] 웨스턴 블롯 조사 결과 (도 7)는, 단일 수용체 (EGFR, HER2 또는 HER3)에 대한 항체의 혼합물이 이들의 개개 표적의 분해를 유도하였고 각각의 표적에 대한 항체 혼합물의 조합물로 구성된 pan-HER 혼합물이 3개 모두의 수용체의 효과적인 분해를 동시에 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0233] **실시예 6: pan-HER 항체 혼합물의 암 억제 활성**

[0234] 실시예 3에 기재된 방법을 이용하여, 항체 혼합물 Sym004 (WO 2008/104183에 기재된 2개의 항-EGFR 항체 992+1024 함유), 1277+1565 (항-EGFR), 1254+1565 (항-EGFR), 4385+4318 (항-HER2), 4384+4517 (항-HER2), 5038+5082 (항-HER3), pan-HER 항체 혼합물 1565+4517+5082 및 1277+4384+5082 (EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 하나의 항체), 및 1277+1565+4384+4517+5038+5082와 1277+1565+4385+4518+5038+5082 (EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 2개씩의 항체), 참조 항체 세툭시맙 (항-EGFR), 트라스투주맙 (항-HER2), 8736 (MM-121 유사체; 항-HER3), 및 3개의 참조 항체의 혼합물을, 음성 대조군 항체와 함께, EGFR 또는 HER2, EGFR/HER2, HER2/HER3 또는 EGFR/HER2/HER3에 의존적인 22개 암 세포주의 성장 및 증식을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 5 개의 세포주 A431NS (EGFR), H358 (EGFR), HCC202 (HER2), OE19 (HER2) 및 H820 (EGFR)에 대한 상기 열거된 항체 혼합물 및 항체들의 적정 결과를 도 8-12에 도시한다.

[0235] **결과**

[0236] 비록 항체 혼합물 및 개별적인 항체의 효과가 상이한 세포주들 간에 다르긴 하지만, 3개의 수용체 EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 항체를 함유하는 pan-HER 항체 혼합물이 세포 성장 및 증식을 억제함에 있어서 일반적으로 효능이 있음을 도 8-12의 결과로부터 알 수 있다. 6개의 항체, 즉 3개 수용체 각각에 대해 2개씩의 항체를 함유하는 pan-HER 혼합물은 일반적으로 상이한 세포주에 걸쳐 가장 효능이 있었다.

[0237] **실시예 7: 항체 혼합물의 조합물로 EGFR, HER2 및 HER3의 분해**

[0238] 본 실시예는 항체들의 혼합물이 이들의 표적 (EGFR, HER2 또는 HER3)의 분해를 유도하고 3개 모두의 표적에 대한 혼합물의 조합물이 모든 수용체의 분해를 동시에 유도할 수 있음을 입증한다.

[0239] **방법**

[0240] 항체 혼합물 및 혼합물들의 조합물에 의해 유도된 EGFR, HER2 및 HER3 분해를 연구하기 위해, 48시간 동안 항체로 처리된 H292 및 OVCAR-8 세포의 전 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 세포를 T-75 배양 플라스크에서 성장시켰고 50% 컨플루언트에서 배양 배지를 제거하고, 세포를 1xPBS에서 세척하고, 0.5% FBS를 함유하는 5 ml의 배지에서 희석된 20 µg/ml의 항체로 처리하였다. 세포를 48시간 동안 처리한 후에, 전 세포 용해물을 표준 RIPA 완충제를 이용하여 제조하였다. 각각의 샘플에서 총 단백질 농도를 측정하였고 EGFR, HER2 또는 HER3에 대한 일차 항체를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 1-10 µg의 단백질을 분석하였다. β-액틴에 대한 항체를 로딩 대조군으로서 이용하였다.

[0241] **결과**

[0242] 웨스턴 블롯 연구로부터의 결과 (도 13)는, 단일 수용체 (EGFR, HER2 및 HER3)에 대한 항체들의 혼합물이 이들 개개의 표적의 분해를 유도하였고 각각의 표적에 대한 항체 혼합물의 조합물로 구성된 pan-HER 혼합물이 3개 모두의 수용체의 효율적인 분해를 동시에 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0243] H292 세포주에서는, 항-EGFR 항체 1277, 1565 그리고 EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 하나씩의 항체로 구성된

pan-HER 혼합물 (1277+4384+5082)로 처리된 세포에서 총 EGFR에 있어서 적은 감소가 관찰될 수 있었지만, 항-EGFR 비교기 항체인 세특시맙으로 처리된 세포에서는 관찰되지 않았다. 1277+1565의 혼합물은 EGFR의 효율적인 분해를 야기시켰는데, 이는 각각의 표적에 대한 2개씩의 항체로 구성된 pan-HER 혼합물 (1277+1565+4384+4517+5038+5082)에서도 관찰된다. 항-HER2 항체의 조합물 (4384+4517)은 단독으로도 그리고 pan-HER 혼합물 1277+1565+4384+4517+5038+5082의 일부로서도 HER2의 분해를 유도하였다.

[0244] H292에서와 같이, OVCAR-8 용해물에서 총 EGFR의 적은 감소가 개별적인 항체 1277 및 1565 그리고 pan-HER 혼합물 1277+4384+5082로 처리된 세포에서 관찰되었다. 조합물 1277+1565 및 pan-HER 혼합물 1277+1565+4384+4517+5038+5082는 EGFR의 매우 효율적인 분해를 유도하였다. 항-HER2 모노클로날 항체는 총 HER2에 대해 미소한 효과를 지닌 반면 HER2에 대한 항체의 조합물 (4384+4517)은 수용체를 효율적으로 분해시켰다. HER3에 대한 항체 및 항체 혼합물은 모두 OVCAR-8 세포에서 수용체를 분해시켰다.

[0245] H292 세포에서, 세포를 개별적인 항체 (세특시맙, 1277 및 1565) 또는 EGFR에 대한 항체의 혼합물 (1277+1565)로 처리하는 것에 반응하여 HER2의 상향 조절이 관찰될 수 있다. 이것은 각각의 표적에 대해 2개씩의 항체로 구성된 pan-HER 항체 혼합물 (1277+1565+4384+4517+5038+5082)로 처리된 세포에서는 관찰되지 않는데, 그 이유는 EGFR, HER2 및 HER3이 모두 이러한 환경에서 동시에 분해되기 때문이다. OVCAR-8 세포에서, HER3에 대한 항체 또는 항체의 혼합물로 처리된 세포에서 HER2의 상향 조절이 나타날 수 있다. 역시, 이것은 각각의 표적에 대해 2개씩의 항체로 구성된 pan-HER 항체 혼합물 (1277+1565+4384+4517+5038+5082)로 처리된 세포에서는 동시에 수용체 분해로 인해 관찰되지 않는다. 수용체 상향 조절은 pan-HER 항체 혼합물 (1277+4384+5082)로 처리된 세포에서도 관찰되지 않았다. 따라서, 세포를 pan-HER 혼합물로 처리하는 것은, 3개 모두의 수용체 (EGFR, HER2 및 HER3)가 pan-HER 항체 혼합물로 처리시에 분해되기 때문에, 수용체 상향 조절의 결과인 저항성의 출현을 잠재적으로 방해한다.

실시예 8: pan-HER 항체 혼합물의 암 억제 활성

[0247] 본 실시예는 표적 EGFR, HER2 및 HER3 각각에 대한 하나씩의 항체로 구성된 pan-HER 항체 혼합물, 즉 각각의 표적에 대해 하나씩의 항체를 함유하는 pan-HER 혼합물, 2개의 표적 (EGFR 및 HER3)에 대한 하나씩의 항체 및 하나의 표적 (HER2)에 대한 2개의 항체를 함유하는 pan-HER 혼합물 및 각각의 수용체, 즉 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 2개씩의 항체로 구성된 pan-HER 혼합물의 양호한 암 억제 활성을 기재한다.

방법

[0249] 실시예 3에 기재된 방법을 이용하여 각각의 수용체 1277+1565 (항-EGFR), 4384+4517 (항-HER2) 및 5038+5082 (항-HER3)에 대한 항체 혼합물, 각각의 항체에 대해 2개씩의 항체를 갖는 pan-HER 혼합물 (1277+1565+4384+4517+5038+5082), EGFR에 대한 하나의 항체, HER2에 대한 2개의 항체 및 HER3에 대한 하나의 항체를 포함하는 pan-HER 혼합물 (1277+4384+4517+5038 또는 1277+4384+4517+5082), 각각의 수용체에 대한 하나씩의 항체로 구성된 pan-HER 혼합물 (1277+4384+5038 및 1277+4384+5082), 참조 항체 세특시맙 (항-EGFR), 트라스투주맙 (항-HER2), MM-121 유사체 (항-HER3), 3개의 참조 항체의 혼합물 및 음성 대조군 항체를 EGFR 또는 HER2, EGFR/HER2, EGFR/HER3, HER2/HER3 또는 EGFR/HER2/HER3에 의존적인 11개의 암 세포주의 성장 및 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 7개의 세포주 A431NS, N87, A549, OE19, BT474, MDA-MB-175 VII 및 HCC202에서 상기 열거된 항체 혼합물 및 항체를 적정한 결과를 도 14-20에 도시한다.

결과

[0251] 도 14-20에 제시된 결과는, 비록 항체 혼합물 및 개별적인 항체의 효과가 상이한 세포주들 간에 달라지긴 하나, 3개의 수용체 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 3개, 4개 또는 6개의 항체를 포함하는 pan-HER 항체 혼합물이 일반적으로 암 세포 성장 및 증식을 억제함에 있어서 매우 효능이 있음을 나타낸다. 실시예 5에 기재된 대로, 3개의 수용체 각각에 대해 2개씩의 항체인 6개의 항체를 함유하는 pan-HER 혼합물은 일반적으로 시험된 세포주에 걸쳐 가장 효능이 있었다.

실시예 9: pan-HER 항체 혼합물의 암 억제 활성

[0253] 본 실시예는 항체 혼합물의 조합물을 이용한 3개의 HER 패밀리 수용체 (EGFR/HER2/HER3)의 동시 표적화가 2개의 HER 패밀리 수용체 (EGFR/HER2, EGFR/HER3 또는 HER2/HER3)를 동시에 표적화하거나 3개의 수용체 중 어느 것을 단독으로 표적화하는 것에 비해 더 넓은 억제 프로파일을 생성하였음을 기재한다.

방법

- [0255] 실시예 3에 기재된 방법을 이용하여 각각의 수용체 1277+1565 (항-EGFR), 4384+4517 (항-HER2) 및 5038+5082 (항-HER3)에 대한 항체 혼합물, 이들의 모든 가능한 과돌연변이, 즉 1277+1565+4384+4517 (항-EGFR+항-HER2), 1277+1565+5038+5082 (항-EGFR+항-HER2) 및 4384+4517+5038+5082 (항-HER2+항-HER3), 각각의 항체에 대해 2개씩의 항체를 갖는 pan-HER 혼합물 (1277+1565+4384+4517+5038+5082), 각각의 수용체에 대한 하나씩의 항체로 구성된 pan-HER 혼합물 (1277+4384+5038 및 1277+4384+5082), 참조 항체 세토시맙 (항-EGFR), 트라스투주맙 (항-HER2), MM-121 유사체 (항-HER3), 3개의 참조 항체의 혼합물 및 음성 대조군 항체를 EGFR 또는 HER2, EGFR/HER2, EGFR/HER3, HER2/HER3 또는 EGFR/HER2/HER3에 의존적인 11개의 암 세포주의 성장 및 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 5개의 세포주 A431NS, AU565, H358, H1975 및 HCC202에서 상기 열거된 항체 혼합물 및 항체를 적정한 결과를 도 21-25에 도시한다.
- [0256] 결과
- [0257] A431NS에서 EGFR 및 HER2 또는 EGFR 및 HER3에 대한 혼합물은 실시예 3에 기재된 결과와 일치하는 암 세포 성장의 억제에 있어서 상승적인 증가를 초래하였다. HER2 및 HER3을 표적화하는 혼합물의 조합물은 A431NS 세포에 대해 억제 효과를 갖지 않았다. EGFR, HER2 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 개별적인 혼합물 및 3개의 수용체 각각에 대해 단 하나의 항체만을 지니는 항체 혼합물보다 우수하였고 2개의 수용체에 대한 혼합물의 조합물만큼 효과적이었다.
- [0258] 유사한 결과가 H1975 세포주에서 달성되었다. 역시, EGFR 및 HER2 또는 EGFR 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 억제 효과에 있어서 상승적인 증가를 나타내었다. EGFR, HER2 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 개별적인 혼합물 및 3개의 수용체 각각에 대해 단 하나의 항체만을 지니는 항체 혼합물보다 우수하였고 2개의 수용체에 대한 혼합물의 조합물만큼 효과적이었다.
- [0259] HCC202 세포주에서 HER2 및 EGFR 또는 HER2 및 HER3에 대한 혼합물의 조합물은 암 세포 성장 및 증식에 대해 증가된 억제 활성을 나타내었다. EGFR 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 HCC202 세포에 대해 억제 효과를 갖지 않았다. EGFR, HER2 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 개별적인 혼합물, 2개의 수용체에 대한 혼합물 및 3개의 수용체 각각에 대해 단 하나의 항체만을 지니는 항체 혼합물보다 우수하였다.
- [0260] 유사한 결과가 AU565 세포주에서 발견되었다. HER2 및 EGFR 또는 HER2 및 HER3에 대한 혼합물의 조합물은 암 세포 성장 및 증식에 대해 증가된 억제 활성을 지녔다. EGFR 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 AU565 세포에 대해 억제 효과를 갖지 않았다. EGFR, HER2 및 HER3에 대한 항체 혼합물의 조합물은 개별적인 혼합물, 2개의 수용체에 대한 혼합물 및 3개의 수용체 각각에 대해 단 하나의 항체만을 지니는 항체 혼합물보다 우수하였다.
- [0261] H358 세포주에서 EGFR 및 HER3 또는 EGFR 및 HER2에 대한 혼합물의 조합물은 EGFR만을 표적화하는 것에 비해 억제 효과에 있어서 약간의 증가를 초래하였다. 혼합물의 조합물로 HER2 및 HER3을 표적화하는 것은 HER3만을 표적화하는 것에 필적하는 암 세포 성장 및 증식에 있어서 보통의 억제 효과를 초래하였다. 그러나, 3개 모두의 수용체에 대한 혼합물의 조합물은 세포 성장 및 증식의 증가된 억제를 초래하였는데, 이것은 개별적인 혼합물, 2개의 수용체에 대한 혼합물 및 3개의 수용체 각각에 대해 단 하나의 항체만을 지니는 항체 혼합물보다 우수하였다.
- [0262] 요약해 보면, 본 실시예에서 제시된 결과는, HER 패밀리에서 하나를 초과하는 수용체의 최적 표적화는 각각의 수용체에 대한 항체들의 혼합물을 조합시킴에 의해 달성되고, 3개의 수용체를 표적화하는 것은 2개의 수용체를 표적화하는 것보다 우수하고, 항체들의 혼합물로 각각의 수용체를 표적화하는 것은 단일 항체로 각각의 수용체를 표적화하는 것보다 우수함을 입증한다.
- [0263] 실시예 10: 인간 A431NS 종양 이종이식 모델에서 Pan-HER 항체 혼합물의 생체내 효능
- [0264] EGFR, HER2, HER3 및 3개의 수용체의 조합물에 대한 항체 혼합물의 생체내 효능을 평가하기 위해, 본 발명자들은 A431NS 인간 종양 이종이식 모델에서 항체 및 혼합물을 시험하였다. 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 신규한 항-EGFR 화합물의 성장 억제 효과를 시험할 때 EGFR을 과발현시키는 인간 표피 암종 세포주 A431이 광범위하게 이용된다. 본원에 제시된 생체내 연구에서 본 발명자들은 부모 A431 세포주의 더욱 공격적으로 성장하는 변이체인 A431NS (ATCC no. CRL-2592)를 이용하였다. 그 결과를 도 26에 도시한다.
- [0265] 방법
- [0266] 2×10^6 개 A431NS 세포를 8주령의 가슴샘없는 암컷 누드 마우스의 좌측 옆구리에 피하 접종시켰다. 캘리퍼스를

이용하여 매주 2회 종양을 측정하였고, 종양 부피를 하기 식에 따라 mm^3 으로 산출하였다: ($\text{폭})^2 \times \text{길이} \times 0.5$. 평균 종양 크기가 175 mm^3 일 때, 마우스를 랜덤화하고 치료를 개시하였다. 표적당 50 mg/kg을 매주 2회씩 2.5 주간 복막내 주입시켜 마우스를 치료하고 (총 5회 주입) 관찰 기간을 두었다. 이에 따라 하나의 수용체의 표적화는 50 mg/kg의 투여를 발생시킨 반면, 2개 또는 3개의 수용체를 표적화하는 항체 조합물로 치료된 마우스에는 각각 100 또는 150 mg/kg이 투여되었다. 본 실험에 하기 항체 조합물을 포함시켰다: 1277+1565 (항-EGFR), 4384+4517 (항-HER2), 5038+5082 (항-HER3), 1277+1565+4384+4517 (항-EGFR+항-HER2), 1277+1565+5038+5082 (항-EGFR+항-HER3), 4384+4517+5038+5082 (항-HER2+항-HER3), 1277+4384+5038 (항-EGFR+항-HER2+항-HER3) 및 1277+1565+4384+4517+5038+5082 (항-EGFR+항-HER2+항-HER3). 실험은 상기 항체 혼합물에 대해 기재된 바대로 투약되고 투여되는 항-EGFR 모노클로날 항체 세특시맙 및 항-HER2 모노클로날 항체 트라스트주맙을 또한 포함하였다.

[0267]

결과

[0268]

접종 후 12일째 되는 날 175 mm^3 의 평균 종양 크기에서 마우스를 8마리의 동물씩 11 그룹으로 랜덤화하고 치료를 개시하였다. 동물을 EGFR+HER3 (1277+1565+5038+5082) 및 EGFR+HER2+HER3을 표적화하는 항체 (Pan-HER 혼합물: 1277+4384+5038 및 Pan-HER 혼합물: 1277+1565+4384+4517+5038+5082)로 치료하는 것은 종양 성장을 제어함에 있어서 매우 효율적이었다. 항-EGFR+항-HER3 (1277+1565+5038+5082) 및 항-EGFR+항-HER2+항-HER3 (Pan-HER 혼합물: 1277+4384+5038 및 Pan-HER 혼합물: 1277+1565+4384+4517+5038+5082)로 치료된 그룹에서 치료 기간 후에 종양 크기의 증가가 거의 관찰되지 않았다. EGFR (1277+1565) 또는 HER3 (5038+5082)에 대한 항체 또는 EGFR+HER2 (1277+1565+4384+4517) 및 HER2+HER3 (4384+4517+5038+5082)을 표적화하는 조합물로 치료된 동물에서는, 비록 종양이 비히를 대조군보다 느린 속도로 성장하긴 하였으나, 모두 치료 기간 후에 종양이 계속 성장하였다. 항-HER3 및 항-HER2+항-HER3 항체 조합물로 치료된 동물은 비히를 대조군에 비해 단지 약간 작은 종양을 지녔다. 항-EGFR (1277+1565) 또는 항-EGFR+항-HER2 (1277+1565+4384+4517)로 치료된 그룹은 종양 억제 및 비히를 대조군보다 느린 성장 속도를 나타내었다.

[0269]

관찰 기간 동안에, 항-HER3, 항-EGFR+항-HER2, 항-HER2+항-HER3 및 세특시맙으로 치료된 그룹은 모두 비히를 대조군보다 느린 속도이긴 하나 종양 성장이 계속되었다. 일반적으로, 항-EGFR 항체 및 EGFR에 대한 항체 조합물을 포함하는 혼합물로 치료된 그룹은 HER3에 대한 항체 혼합물 및 HER2+HER3에 대한 혼합물의 조합물로 치료된 그룹에 비해 느린 종양 성장을 지녔다.

[0270]

EGFR+HER3 및 EGFR+HER2+HER3을 표적화하는 항체 혼합물의 조합물 (Pan-HER 6-혼합물) 및 3개의 수용체 각각에 대해 하나씩의 항체의 조합물 (Pan-HER 3-혼합물)로 치료된 그룹은 모두 실험 동안 내내 종양 성장의 제어를 유지하였다.

[0271]

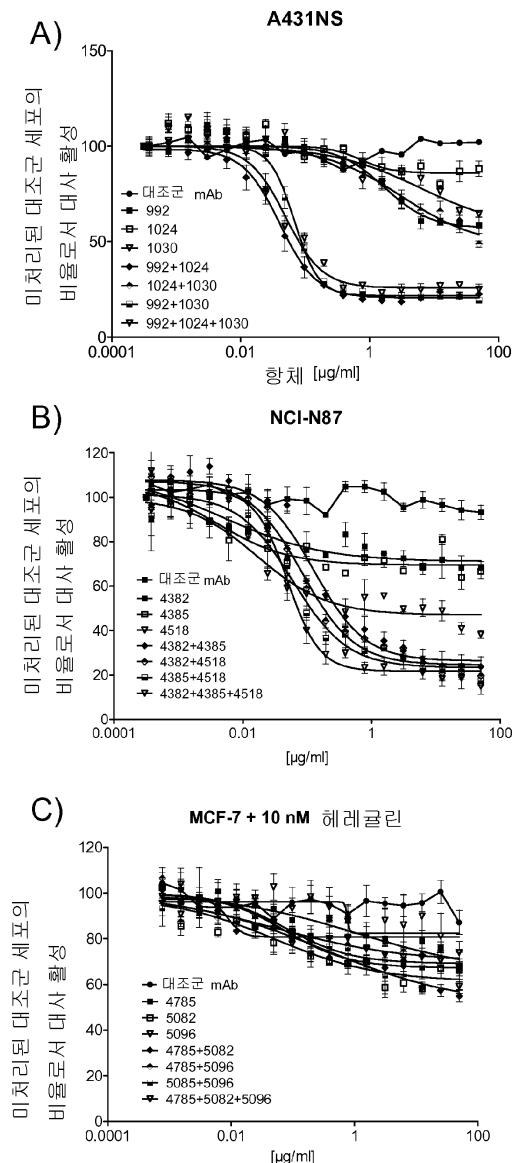
A431NS 종양 이종이식 모델에서 EGFR 및 HER3의 동시 표적화의 향상된 효능은 시험관내 실험 (실시예 2)에서 이러한 세포주에 대해 알려진 ErbB 수용체 의존성을 반영한다. 비록 EGFR 신호전달에 주로 의존적이긴 하나, A431NS 세포주도 EGFR 및 HER3간의 교차-대화 그리고 어느 정도 EGFR 및 HER2 사이에 의존적이지만, 후자는 현행 생체내 실험에서는 관찰되지 않는다.

[0272]

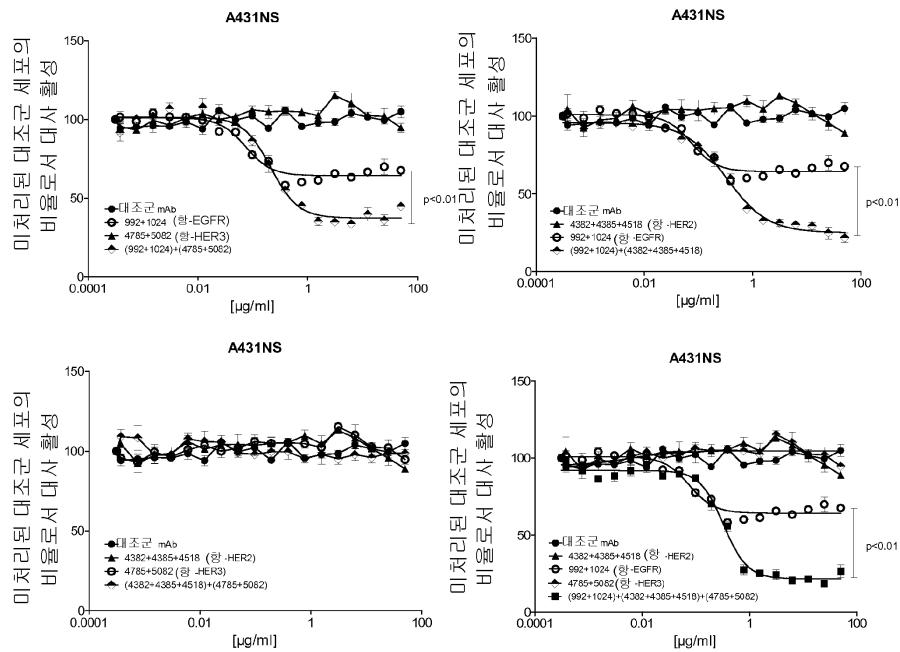
요약해 보면, 본 실험에서 제시된 결과는, A431NS 종양 이종이식 모델을 EGFR+HER3 또는 EGFR+HER2+HER3에 대한 항체 또는 항체 혼합물의 조합물로 치료하는 것이 종양을 개별적인 표적 EGFR, HER2 및 HER3에 대한 모노클로날 항체 및 항체 혼합물, 혹은 EGFR+HER2 또는 HER2+HER3에 대한 모노클로날 항체 및 항체 혼합물의 조합물로 표적화하는 것에 비해 더욱 효과적임을 나타낸다.

도면

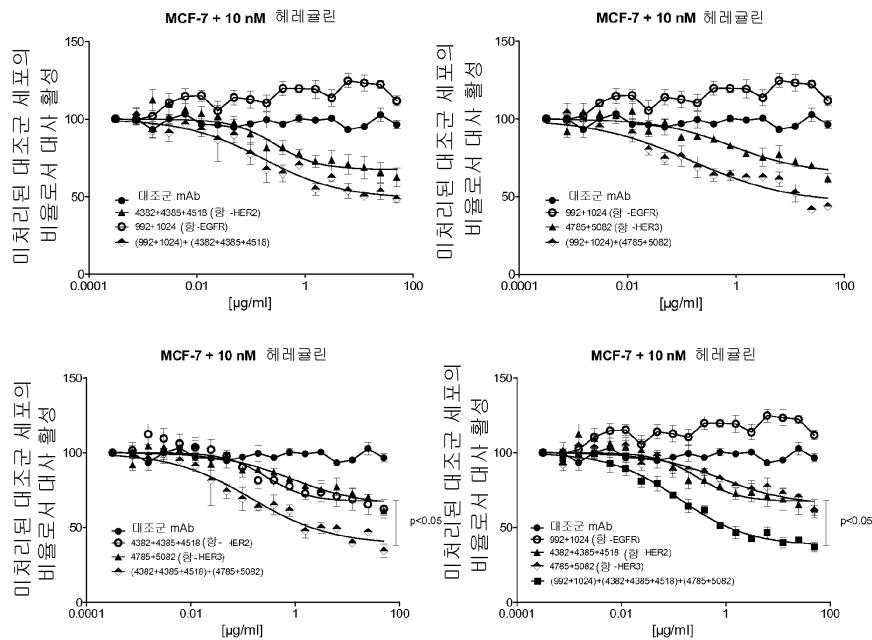
도면1



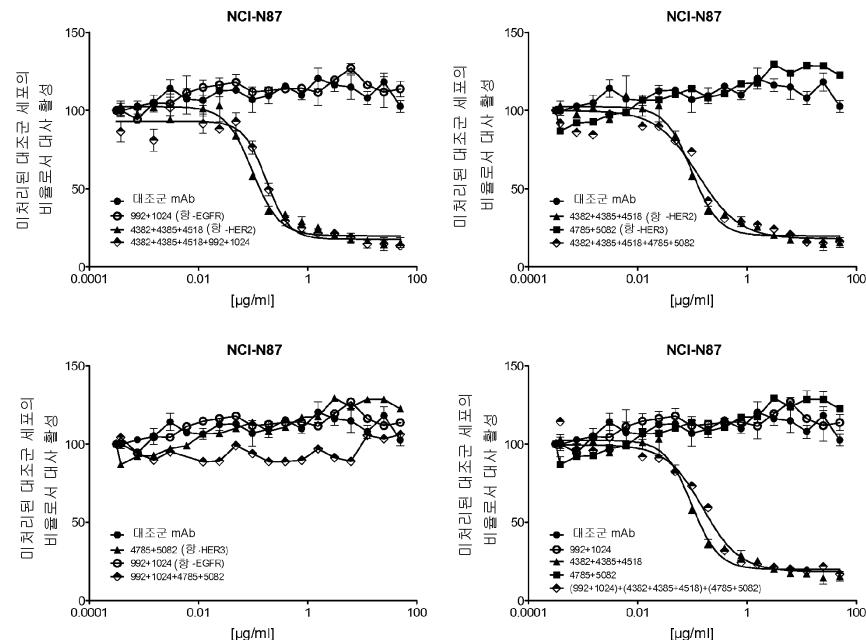
도면2



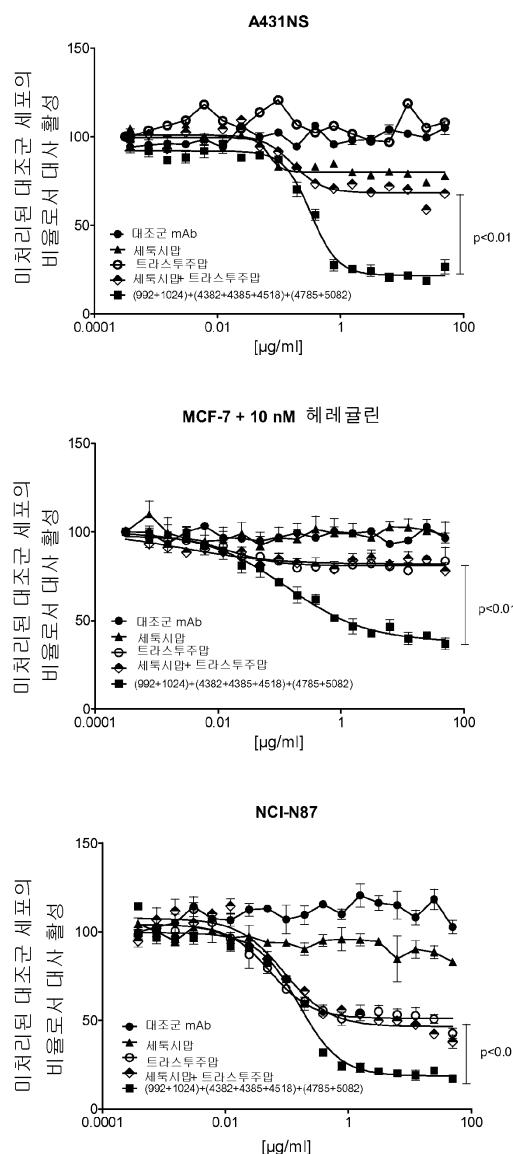
도면3



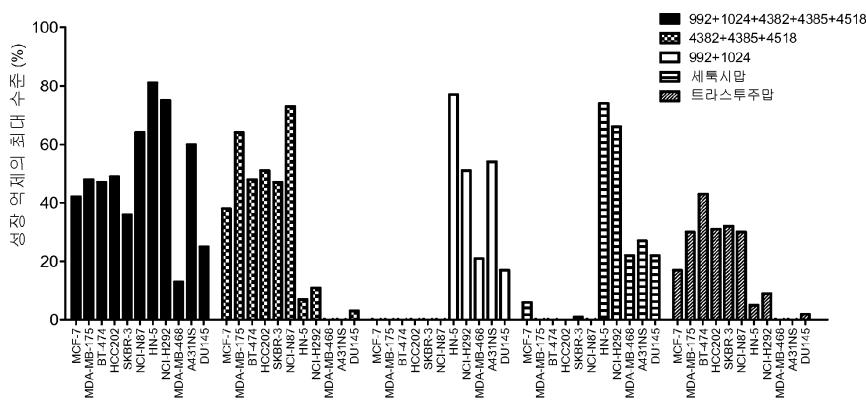
도면4



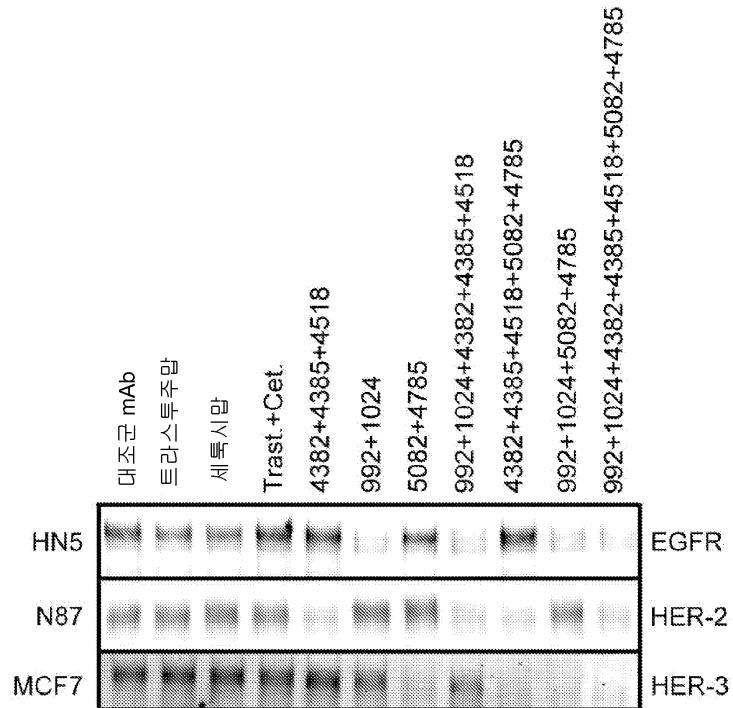
도면5



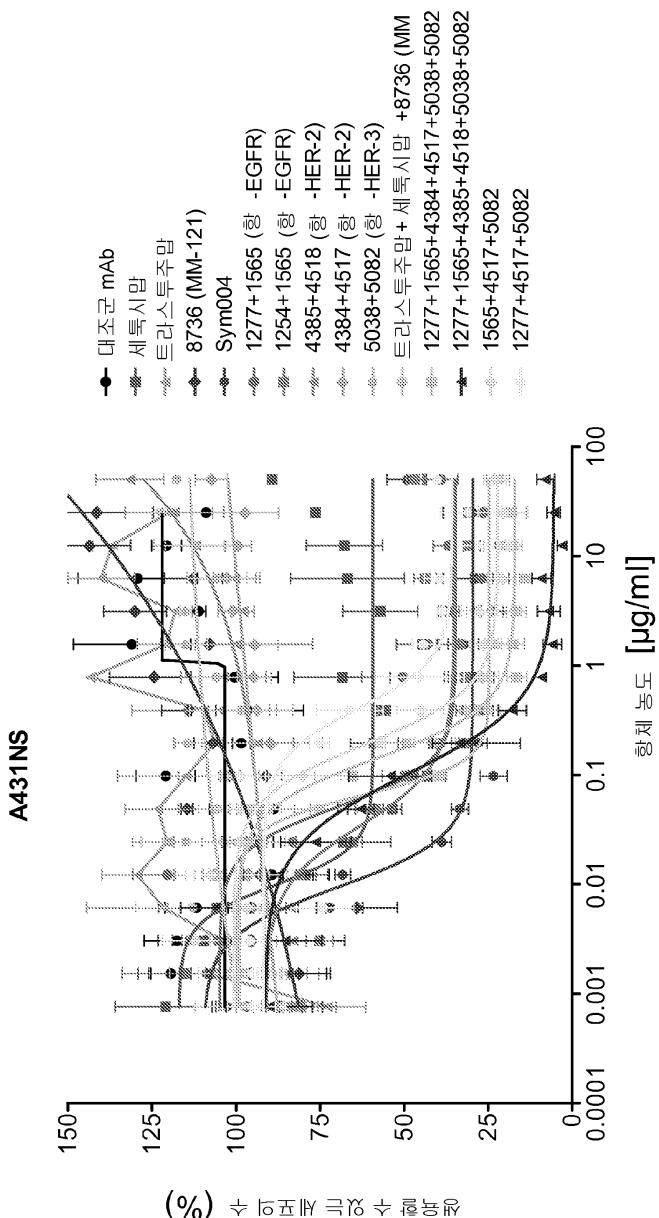
도면6



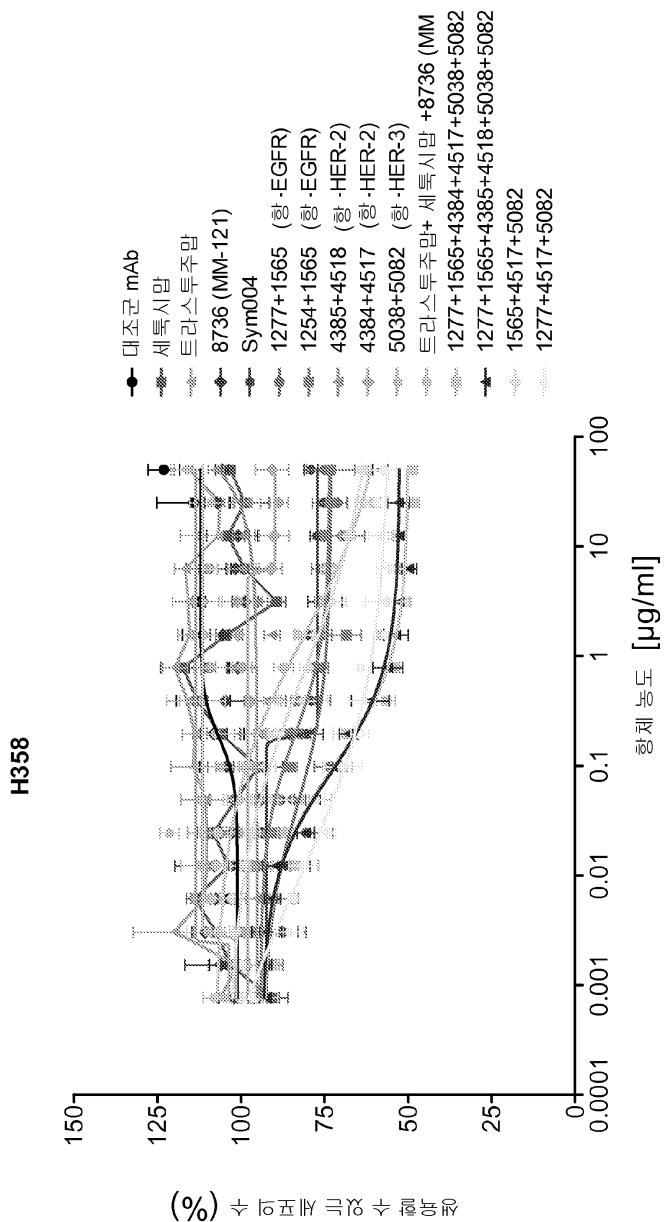
도면7



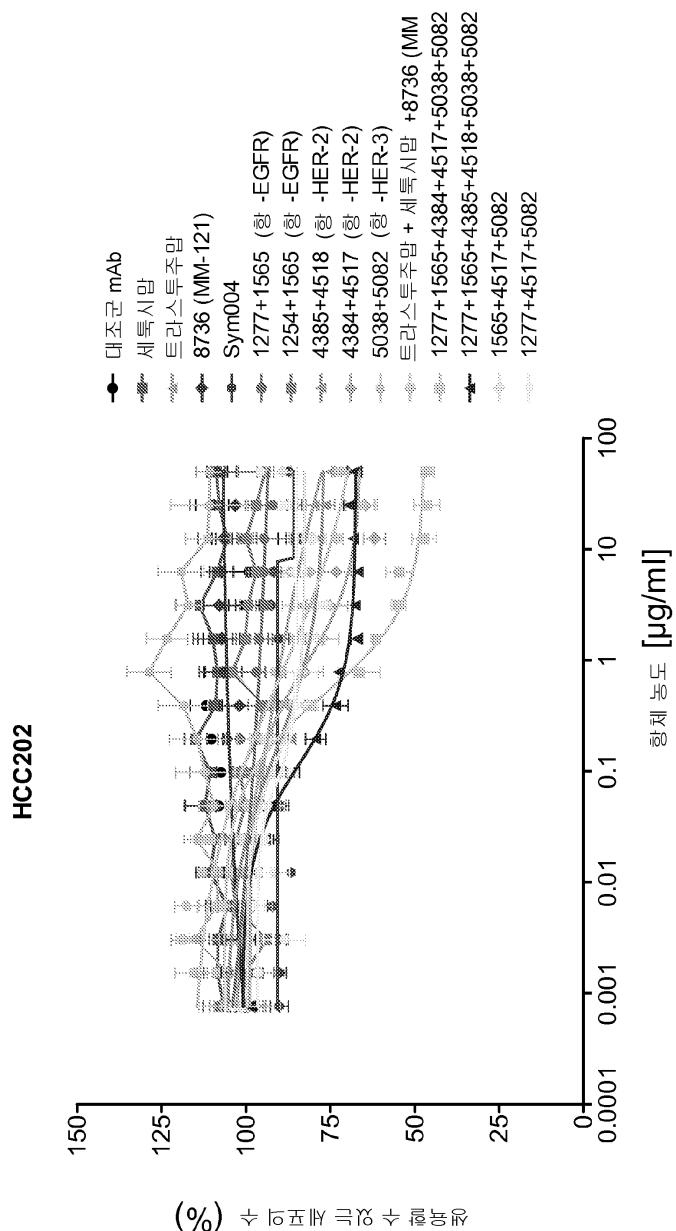
도면8



도면9

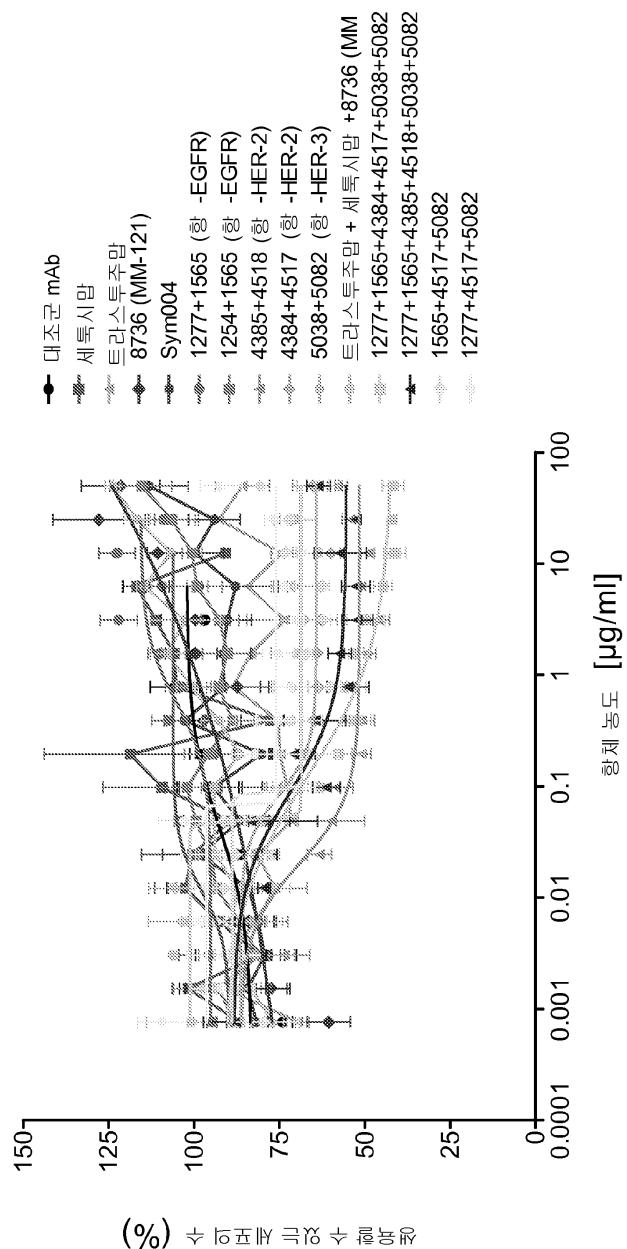


도면10

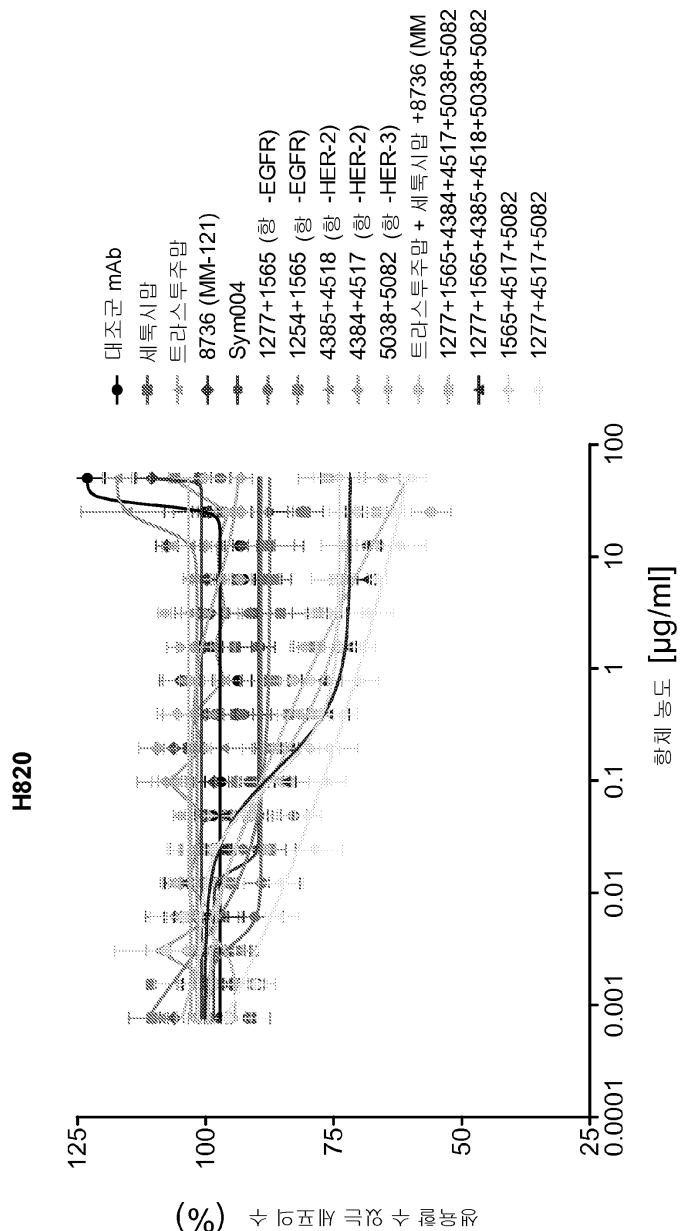


도면11

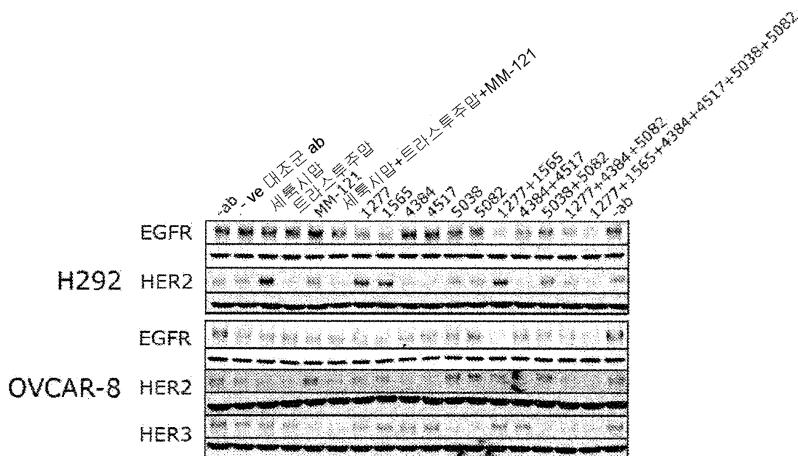
OE19



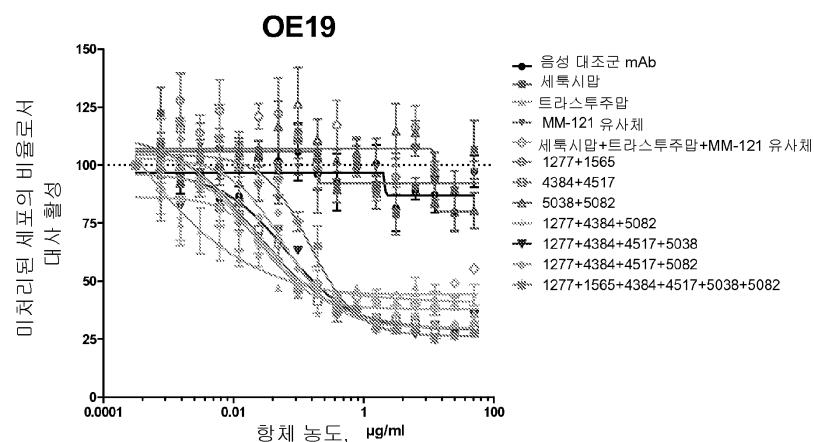
도면12



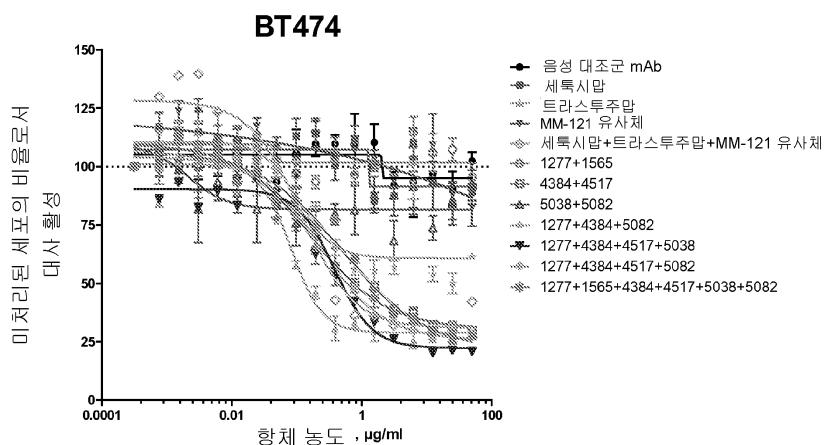
도면13



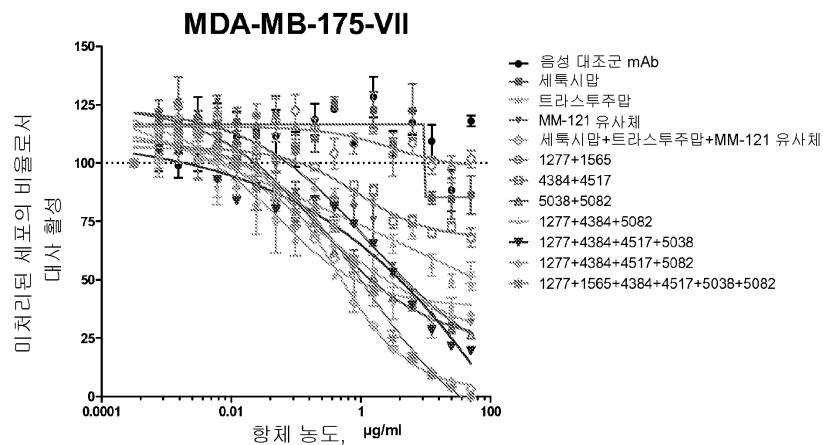
도면14



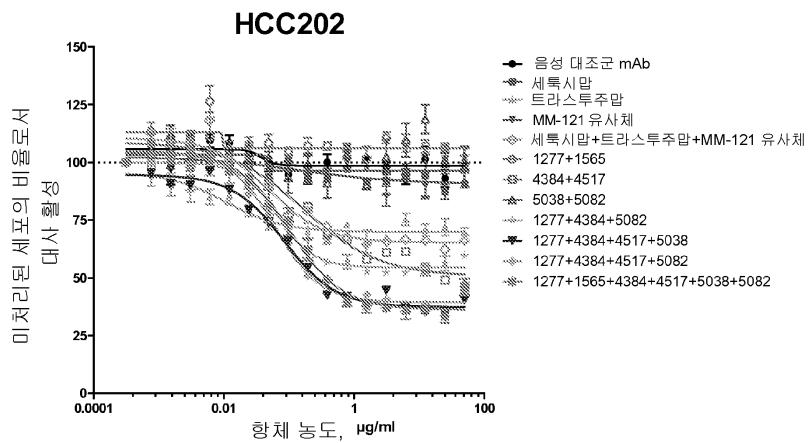
도면15



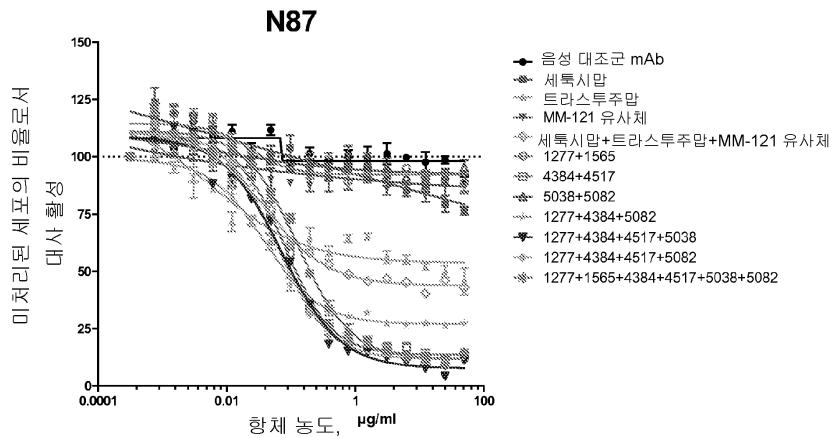
도면16



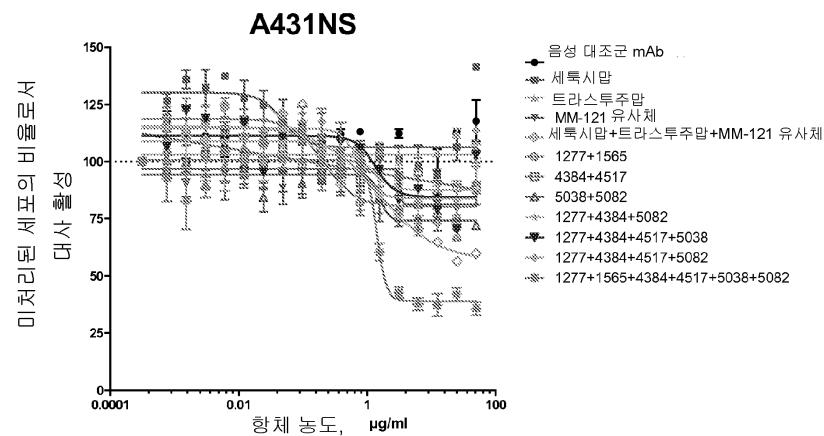
도면17



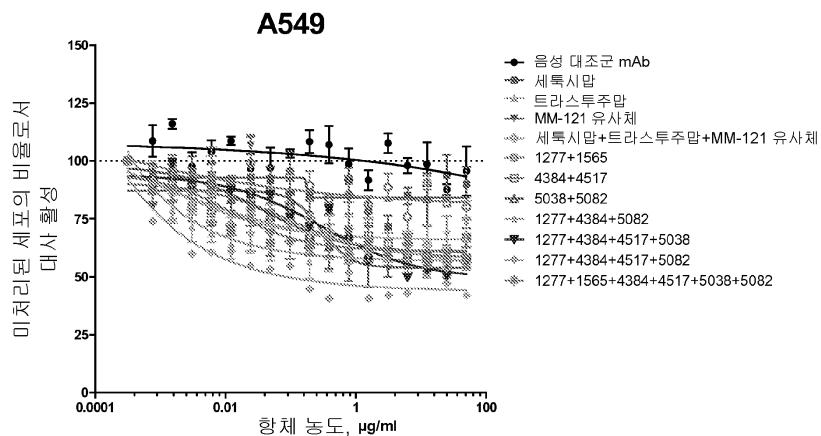
도면18



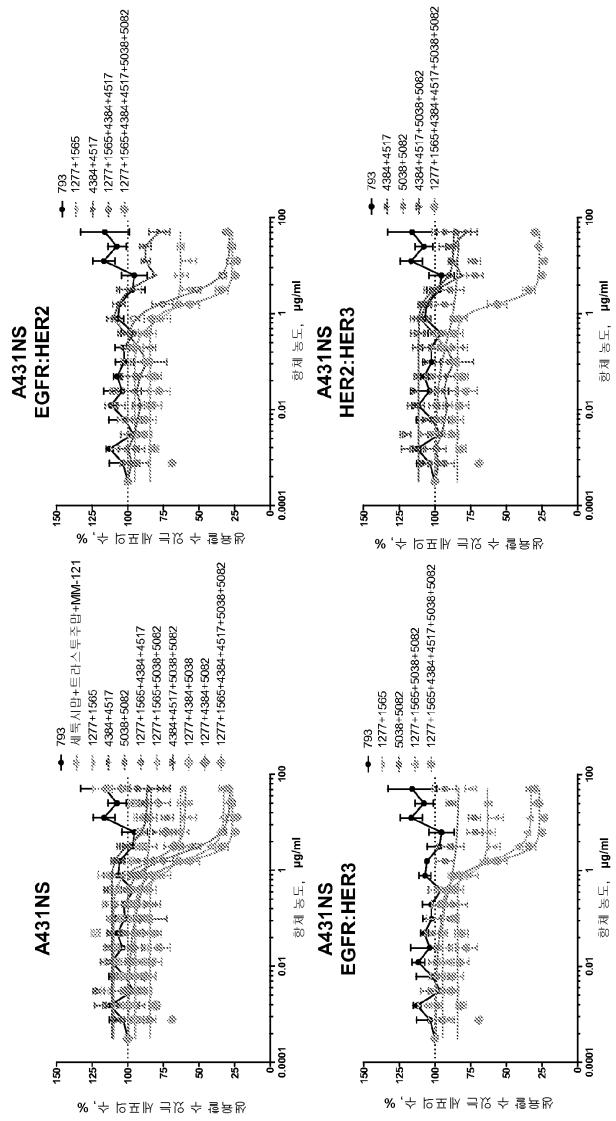
도면19



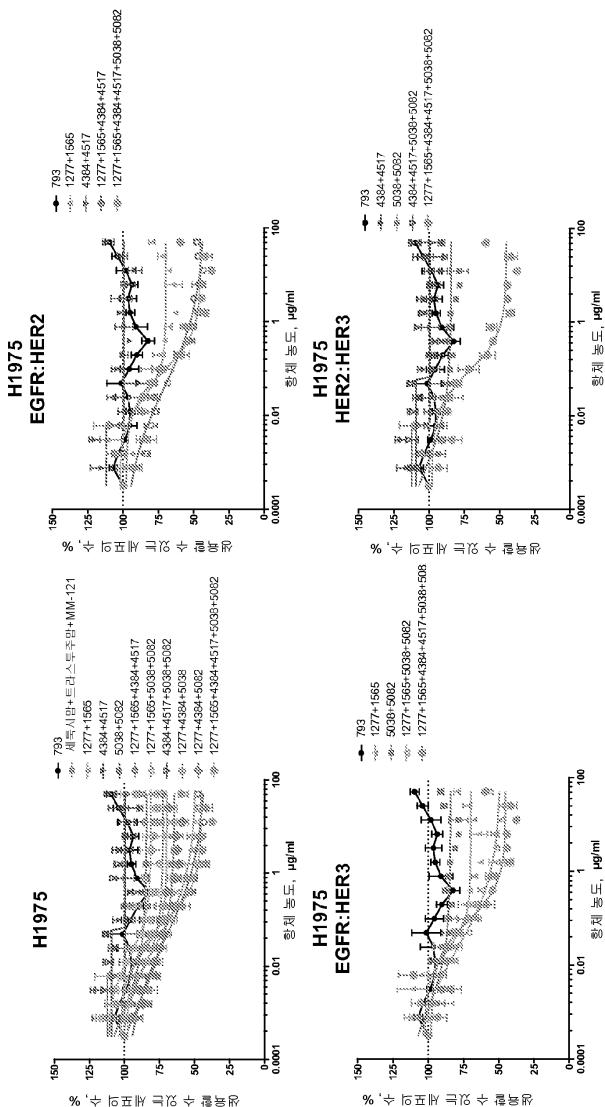
도면20



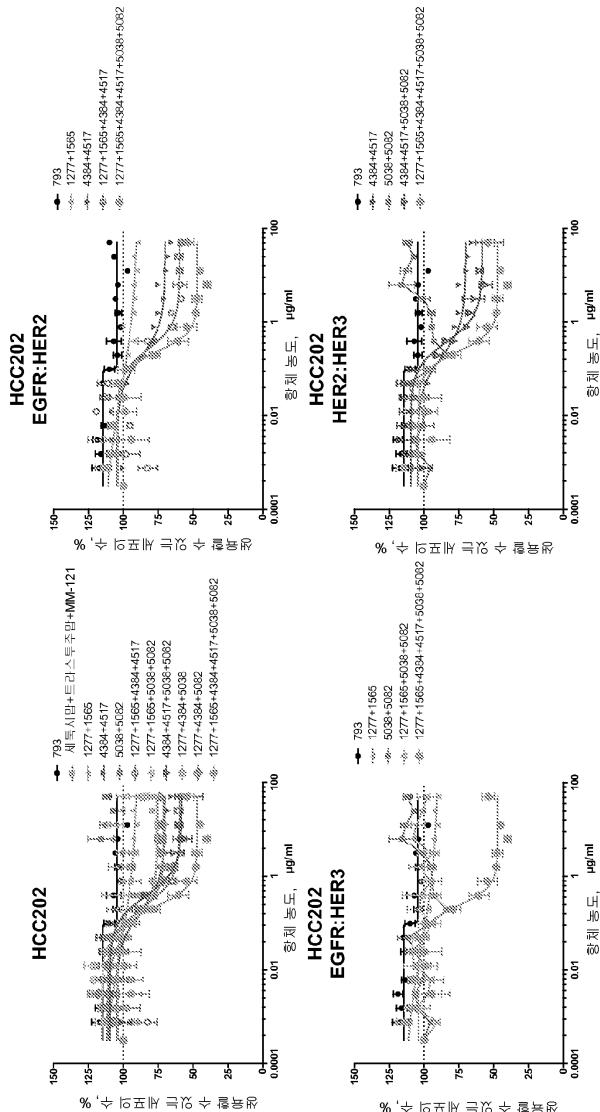
도면21



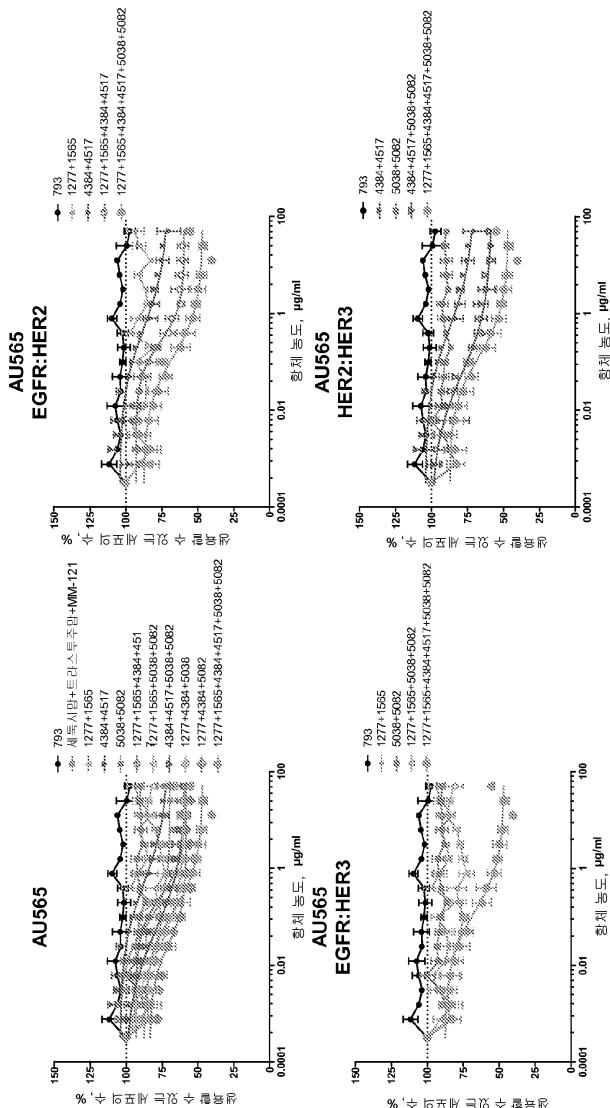
도면22



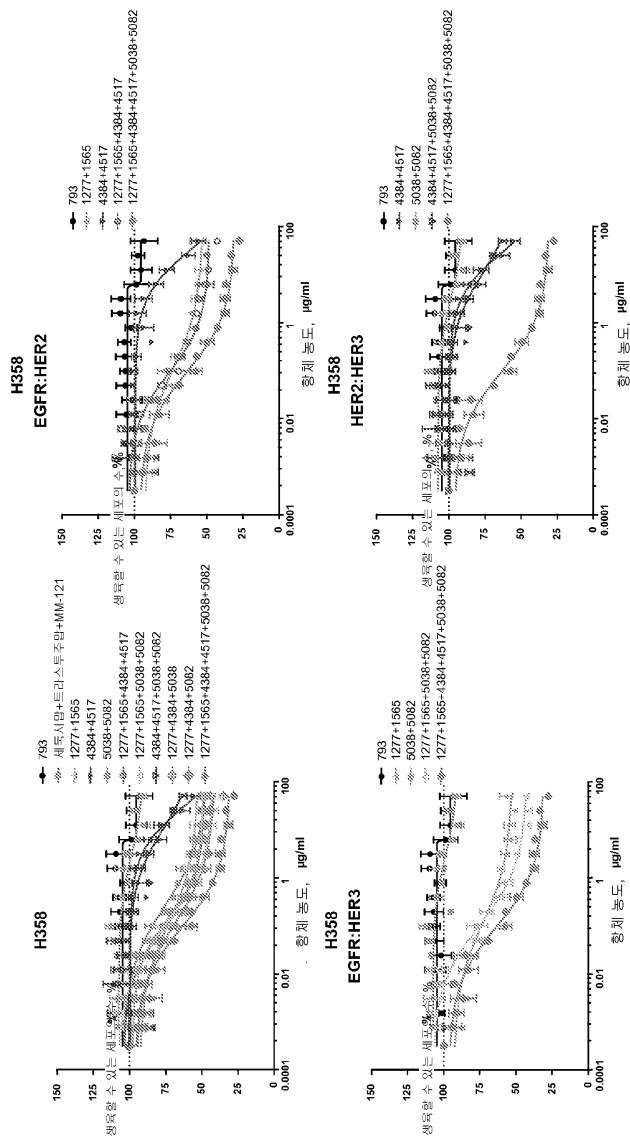
도면23



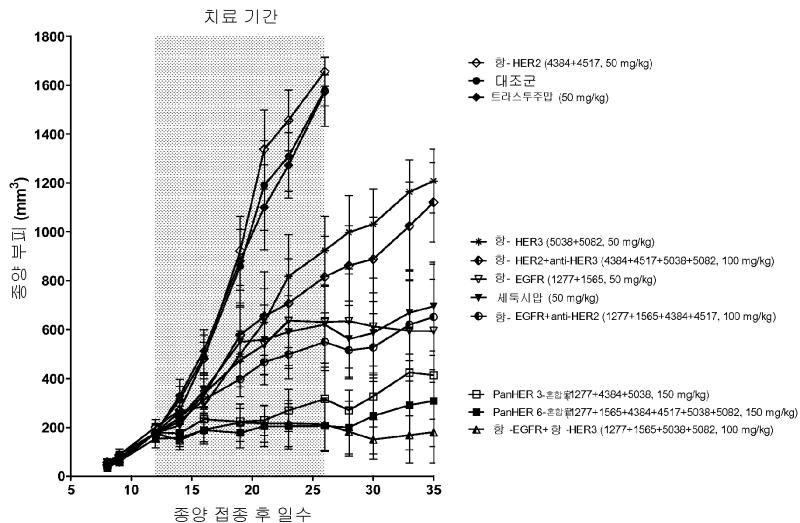
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Symphogen A/S

<120> Pan-HER Antibody Mixtures

<130> P141PC00

<150> PA 2010 00988

<151> 2010-11-01

<150> PA 2011 00672

<151> 2011-09-05

<150> US 61/408,782

<151> 2010-11-01

<150> US 61/531,407

<151> 2011-09-06

<160> 150

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cgccggagg tccaaactgca gcaacctggg tctgagctgg tgaggcctgg agcttcagtg

60

aagctgtcct gcaaggcttc tggctacaca ttccaccagct actggatgca ctgggtgaag 120

cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggaaatattt atcctggtag tcgtactact
aactacatg agaagtcaa gagcaaggcc acactgactg tagacacatc ctccagcaca
gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtacaaga
aatggggatt actacgttag tagcgggat gctatggact actgggtca aggaacctca
gtcaccgtct cg 372

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro

1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu

50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

115 120

<210> 3

<211> 648

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ctagccgaca ttcatatgtac tcagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga	60
gtcaccatca gttgcaggac aagttaggac attggcaatt atttaaactg gtatcagcag	120
aaaccagatg gaactgtttaa actcctgtat tactacacat caagattaca ctcaggagtc	180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagatttt ctctcaccat taacaacgtg	240
gagcaagagg atgttgccac ttactttgc caacactata atacggttcc tccgacgttc	300
ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc	360
ccgccccatctg atgaggcgtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcggtaac	480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	540
ctgacgcgtga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagctt acgcctgcga agtcacccat	600
cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt	648
<210> 4	
<211> 216	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 4	
Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly	
20 25 30	
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu	
35 40 45	
Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Asn Val	
65 70 75 80	
Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Thr Val	
85 90 95	
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val	
100 105 110	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys	

115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
160		
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 5

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

cgcgcccagg tccaaactgca gcagcctgg gctgaactgg tggagcctgg gggttcagtg	60
aagctgtctt gcaaggcttc tggctacacc ttccaccatc actggatgca ctgggtgaag	120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggata ggtgagatata atccttagcag cggtcgtaat	180
aactacaatg agaaggttcaa gagtaaggcc acactgactg tagacaaatc ctccagcaca	240
gcctacatgc aattcagcag cctgacatct gaggactctg cggtcttata ttgtgtttaaga	300
tactatggtt acgacgaagc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcg	360

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<400> 6

Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro

1 5 10 15

Gly Gly Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20	25	30
Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Glu		
50	55	60
Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr		
65	70	75
Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr		80
85	90	95
Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser		
115	120	

<210> 7
<211> 663
<212> DNA
<213> Mus musculus

ctagccgaca tcgtgatgac acaagctgca ttctccaatc cagtcactct tggaacatca gcttccatct cctgcagggtc tagtaagagt ctccatata gtaatggcat cacttatttg tattggatc tgcagaagcc aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaa cttgcctcag gagtcccaga caggttcagt agcagtgggt caggaactga tttcacactg agaatcagca gagtgaggc tgaggatgtg ggtgttatt actgtgctca aaatctagaa cttccgtaca ctttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca tctgtttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgt	60 120 180 240 300 360 420
---	--

tgccctgtga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgaaagggt ggataacgcc ctccaaatcggt gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agccctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgt	480 540 600 660 663
---	---------------------------------

<210> 8

<211> 221

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

1 5 10 15

Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu

20 25 30

His Ser Asn Gln Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly

50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

65 70 75 80

Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

100 105 110

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

115 120 125

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

195 200 205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

cgcggcgaag tgcagctgg	ggagtctggg ggaggcttag	tgaagcctgg agggccctg	60
aaactctcct gtgcagcctc	tggattcaact ttcatgtttt atgcctgtc ttgggttcgc	120	
cagactccag agaggaggct ggagtgggtc gcatccatta gtggtgttgg tagcacctac	180		
tttccagaca gtgtgaaggg ccgtttcacc atgtccagag ataatgccag gaacatcctg	240		

tacctccaaa tgagcagtct gaggtcttag gacacggcca tgtattactg tgcaagaggt	300
tctgtatggtt acttctatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcg	360

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro

1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Ser Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu

35 40 45

Trp Val Ala Ser Ile Ser Gly Val Gly Ser Thr Tyr Phe Pro Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

115 120

<210> 11

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

ctagccgaca ttgtgctgac tcagtctcct gcttccttag ctgtatctt gggcagagg	60
gccaccattt catgcaggc cagcaaaagt gtcagttatcat ctggctatag ttttatgcac	120
tggtaccaac tgaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctatcttgc atccaaccta	180
gaatctgggg tccctgccag gttcagtgcc agtgggtctg ggacagactt caccctcaac	240

atccatcctg tggaaagagga ggtatgtgca acctattact gt cagcacag tagggagtt	300
ccgttaacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gaaactgtggc tgccatct	360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgggtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc	480
caatcggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccaccc atcagggcct gagctcgcccc gtcacaaga gttcaacag gggagagtgt	660

<210> 12

<211> 220

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn

65 70 75 80

Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His

85	90	95
Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		

115	120	125	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
130	135	140	
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
165	170	175	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			

180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220

<210> 13

<211> 366

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

cgcgccgaag tgcagctgg ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggccctg	60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct tacagtacct atgacatgtc ttgggttcgc	120

cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatta gtagtggtgg ttagccccc	180
tactatcccg acactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caaaaacacc	240
ctataacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtattt ctgtgcgagg	300
tctcgctatg gaaaactacgg ggacgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtacc	360
gtctcg	366

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro

1	5	10	15
Gly	Gly	Ser	Leu
Lys	Leu	Ser	Cys
Ala	Ala	Ser	Gly
Tyr	Phe	Ala	Tyr
Ser			Ser
Asp	Met	Trp	Val
Arg	Gln	Thr	Pro
Glu			Lys
Leu			Arg
Trp	Val	Ala	Tyr
Ile	Ser	Ser	Gly
Gly	Asp	Ala	Ala
Tyr	Tyr	Pro	Asp
Asn			
Ala			
Lys			
Thr	Val	Gly	Arg
Phe			Phe
Thr	Ile	Ser	Arg
Asp			Asp
Asn			Asn
Ala			Asn
Lys			Thr
65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Gln
Met	Ser	Ser	Leu
Lys	Ser	Glu	Asp
Asp	Thr	Ala	Met
Tyr			Tyr
Tyr	Cys	Ala	Arg
Ser	Arg	Tyr	Gly
Asn	Tyr	Gly	Asp
Ala	Met	Asp	Tyr
100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly
Thr	Ser	Val	Thr
Val			Val
Ser			Ser
115	120		

<210> 15

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

ctagccgatg ttgtgatgac acagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60

gcctccatct	cttgcatc	tagtcagac	ttgtacaca	gtaatggtaa	cacctattta	120
cattggtacc	tgcagaagcc	aggccagtct	ccaaagctcc	tgcacataaa	agtttccaaac	180
cgattttctg	gggtcccaga	caggttcagt	ggcagtggat	cagggacaga	tttcacactc	240
aagatcagca	gagtggagtc	tgaggatctg	ggagtttatt	tctgctctca	aaatacacat	300
gtgtacacgt	tccgggggg	gacaaagtgg	gaaataaaac	gaactgtggc	tgcaccatct	360
gtcttcatct	tccggccatc	tgtatgagcag	ttgaaatctg	gaactgcctc	tgttgtgtgc	420
ctgctgaata	acttctatcc	cagagaggcc	aaagtacagt	ggaagggtgga	taacgccctc	480

caatcggtta actcccgagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 <210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

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

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

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

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
 85 90 95

Gln Asn Thr His Val Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 17

<211>

> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

cgccgcgaag tgcagctgg	ggagtctggg ggaggcttag	tgaagcctgg agagtcc	60
aaactctcgt gtcgcgcctc	tggattcgtt ttcagttact	ctgacatgtc ttgggttcgc	120
cagactccgg agaagaggct	ggagtgggtc gcatacatga	gtagtgcgt tgatgtcacc	180
ttcttattcag acactgtgaa	ggccgattc accatctcca	gagacaatgc caagaacacc	240
ctgtatctgc aagtgagcag	tctgaagtct gaggacacag	ccatatatta ctgtgttaaga	300
caccgggacg tggctatgga	ctactgggt caaggaacct	cagtcaccgt ctcg	354

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro

1 5 10 15

Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser

20 25 30

Tyr Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu

35 40 45

Trp Val Ala Tyr Met Ser Ser Ala Gly Asp Val Thr Phe Tyr Ser Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Arg Asp Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser

115

<210> 19

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

ctagccgatg ttgtgatgac ccagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa	60
gcctccatct ctgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta	120
cattggtacc tgcaagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttcaac	180
cgatttctg gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc	240
aagatcagca gagtgaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat	300
gttccgacgt tcggtgagg caccaagctg gaaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct	360

gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tggatgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc	480
caatcggta actcccgagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccaccc atcaggcct gagctcgccc gtcacaaga gcttcaacag gggagagtgt	660

<210> 20

<211> 220

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

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

1 5 10 15

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val

20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Asp Phe Thr Leu		
65	70	75
Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser		
85	90	95
Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
115	120	125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
130	135	140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
145	150	155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220
<210> 21		
<211> 370		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 21		
ggcgcgccga ggtccaactg caacagtctg ggactgaatt ggtgaagcct ggggcttcag 60		
tgatactgtc ctgttaaggcc tctggctaca ctttaccatcg ctactggatg cagtgggtga 120		
agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga ttggaaatat taatccatgc aatggtgaa 180		
ctagttcaa tgaggagttc aagagtaggg ccacactgac tgtagacaaa tcctccagta 240		
cagcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tattgtgcaa 300		

gagacggggg ccttacgac ggatactact ttgacttctg gggccaaggc accactctca	360		
cagtctcgag	370		
<210> 22			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 22			
Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro			
1	5	10	15
Gly Ala Ser Val Ile Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr			
20	25	30	
Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu			
35	40	45	
Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Phe Asn Glu			
50	55	60	
Glu Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr			
65	70	75	80
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe			
100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
115	120		
<210> 23			
<211> 663			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 23			
gctagccaac attgtatga cacagtctca caaattcatg tccacattaa taggagccag		60	
ggcttcattc acctgcagg ccagtcagg tgtggatacg gctgttagcct ggtatcaaca		120	
gaaaccaggta caatctccta aattattaat ttattggca tccaccggc acactggagt		180	
ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagattc tctctcaccg ttagcaatgt		240	

gcagtcgtac	gacttaaacag	attatttctg	tcagcaatat	agcagctatc	ctctcacgtt	300
cggcgtggg	accaagctgg	agctgaaacg	aactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	360
cccgccatct	gatgagcagt	tgaatctgg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgctgaataa	420
cttcatccc	agagaggcca	aagtacagtg	gaagggtggat	aacgccctcc	aatcggttaa	480
ctccccaggag	agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	540
cctgacgctg	agcaaaggcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgct	aagtccaccca	600

tcagggcctg	agctcgcccg	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	aataagccgc	660
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

cgc					663
-----	--	--	--	--	-----

<210> 24

<211> 216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Leu Ala Asn Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Gly Ala Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp

20	25	30
----	----	----

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu

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

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe

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

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Val Ser Asn Val

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Ser Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr

85	90	95
----	----	----

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 25

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

gaagtgcagc tgcagcagtc tggcccgag ctggtaaac ctggcgctc cgtgaagatc 60

tcctgcaccc cctccggcta caccttacc gactactaca tgaactgggt gaaacagtcc 120

cacggaaaatg ccctggaaatg gatcgaggac atcaacccca acaacggcgg caccaactac 180

aaccagaatg ggaaggcggaa ggccaccctg accatccaca agtcctccag caccgcctac 240

atggaaatgc ggtccctgac ctccgaggac tccgcgtgt acttctgtgt gcctggcgcc 300

ctgcggctt acttcgatta ctggggccag ggcaccaccc tgacagtctc g 351

<210> 26

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Trp

50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile His Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser

115

<210> 27

<211> 642

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 27

gacatcgtga tgaccaggc cctgaagttc atgtccgcct ccgtggcgaa ccgggtgtcc 60

atcacatgca aggccccc gatatgttct gccgcgtgg cctggatca gcagaaggct 120
 ggccagtccc ccgagctgct gatctactgg gcctctaccc ggcacaccgg cgtccccac 180
 agattcaccg gctctggctc cggcaccgac tacaccctga ccatctccag cgtgcaggcc 240
 gaggacctgg ccctgtacta ctgccaggcag cactacacca cccccccac ctccggcgaa 300
 ggcaccaagc tgaaatcaa gggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat ctcccccaccc 360
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgac agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
 ccccgcgagg ccaagggtgca gtggaaagggtg gacaacgccc tgcaatccgg caactccag 480

gaatccgtga ccgaggcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccaggc 600
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Leu Lys Phe Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ala Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 29

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<

400> 29

caggtgcagc tgcagcagcc tggcacagag ctggtaaaac ctggcgccctc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttacc tcccactgga tgcactgggt gaaacagcgg 120
 cctggacagg gcctggaatg gatcgcaac atcaaccctt ccaacggcgg caccaactac 180
 aacgagaagt tcaagtcccg ggccaccctg accgtggaca aggcctccctc caccgcctac 240
 atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcgc cagagcctac 300
 tacgacttca gtgggttcgt gtactggggc cagggcaccc tggtgacagt ctgc 354

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ala Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Tyr Asp Phe Ser Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser

115

<210> 31

<211> 639

<212> DNA

<213> Mus musculus

<

<400> 31

gatatccaga tgacccagac ctccctcagc ctgtccgcct ccctggcgaa cagagtgacc	60
atctcctgcc ggtcctccca ggacatctcc aactacctga actggtatca gcagaaaacc	120
gacggcaccg tgaagctgct gatgtacatc tcccgctgc actccggcgt gccctccaga	180
ttctccggct ctggctccgg caccgagta cccctgacca tcagcaacct ggaacaggaa	240
gatatcgcta cctacttctg tcagcaggcc aacaccctgc ccctgacctt cggcgtggc	300
accaagctgg aactgaagcg gaccgtggcc gctccctcg tggcatctt cccaccctcc	360
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtgggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc	420

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctcccaggaa	480
tccgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac cctgaccctg	540
tccaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgct aagtgaccca ccagggctg	600
tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgc	639

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Met

35 40 45

Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu

65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 33

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 33

cagggtgacac tggaaagagtc tggcgccgag ctgatgaagc ctggcgccctc cgtgaagctg	60
tccttgcaagg ccacccggcta caccttcacc ggctactgga tcgagtgggt gaaacagcgg	120
cctggacacg gccttggaaatg gatcggagag atcctgcctg gctccggctc caccaactac	180
aacgagaagt tcaagggcga ggccacctt accgcccaca cctcctccaa caccgcctac	240
atgcacacctgt cttcccttgac caccgaggac tccgccatct actactgcgc cagatgggc	300
gacggctct tcgcttattt gggccagggc accctggta cagtctcg	348

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Glu Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser

115

<210> 35

<211> 642

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

gatatcgtga tgacccagtc ccagaaattc atgtccacct ccgtggcgaa ccgggtgtcc	60
atcacatgca aggctccccaa acacgtgggc accgcgtgt cctggatca gcagaageccc	120
ggccagtccc ccaagctgct gatcttctcc accttcaacc ggtacaccgg cgtccccgac	180
agattcaccg gctctggctc cggcacccgac ttccacctga ccatctccaa catgcagtcc	240
gaggacctgg ccgactactt ctgccagcag taccggctt accccttac cttccggcagc	300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccaccc	360

tccgacgagc agctgaagtc cggcacccgccc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaagggtg gacaacgccc tgcagtcgg caactcccag	480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccaggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc	642

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37

gaagtgcagc tggtgaaatc tggcgccgac ctggigaac ctggcggtc cctgaagctg	60
tcctgcgccc cctccggctt caccttctcc agctacggca tgtcctgggt gcgactgacc	120
cccgacaagg gcgttggaaatg ggtggcaacc atctccggcg gaggctccta cacctactac	180
cccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccggata tcgccaagtc caccctgtac	240
ctgcagatgt cctccctgaa gtccgaggac accggcggtt actactgcgc ccggaaaggc	300

aactacggca attacggcaa gctggcctac tggggccagg gcacccctcg gacagtctcg	360
---	-----

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Ser Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Gly Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Lys Leu Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

115 120

<210> 39

<211> 642

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

gatatccaga tgacccagtc ccccgcctcc ctgtccgtgt ctgtggcgaa gacagtggacc	60
atcacctgtc gggcctccga gaacatctac tccaacctgg cctggtatca gcaggaacag	120
ggcaagtccc cccagctgct ggtgtacgcc gccaccaatc tggccgacgg cgtccccctcc	180
agattctccg gctctggctc cgccacccag tactccctga agatcaactc cctgcagtcc	240
gaggacttcg gctctacta ctgccagcac ttctgggca cccccctggac cttcgccgga	300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccaccc	360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgccc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgcgagg ccaagggtgca gtggaaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caactccag	480
aatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaagg ccgactacgaa gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccaggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc	642

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 41		
<211> 345		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 41		
gaagtgcagc tgcagcagtc tggcgccgac ctgggtaaac ctggcgccctc cgtgaagctg		60
tcctgcacca cctccggctt caacatcaag gacatttca tccactgggt gaaagagcgg		120
cccgagcagg gcctggaatg gatcggacgg atcgaccccg ccaacgacaa ccctaagtac		180
gaccctaagt tccagggcaa ggccaccatc tccgcccaca cctccagcaa caccgcctac		240
ctgcggctgt cctccctgac ctctgaggac accgcccgtgt actactgcgc tggccgcct		300
gcctacttcg actattgggg ccagggcacc accctgacag tctcg		345
<210> 42		
<211> 115		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 42		
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala		

1	5	10	15	
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile				
	20	25	30	
Phe Ile His Trp Val Lys Glu Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile				
	35	40	45	
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Pro Lys Tyr Asp Pro Lys Phe				
	50	55	60	
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr				
	65	70	75	80
Leu Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
Ala Gly Gly Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu				
	100	105	110	
Thr Val Ser				
	115			
<210> 43				
<211> 642				
<212> DNA				
<213> Mus musculus				
<400> 43				
gatatcgtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ccgtggcgaa ccgggtgtcc	60			
atctcctgca aggcctccca ggacgtgatc gcccgggtga cctggtatca gcagaagccc	120			
ggccagtcggccaa ccaagctgct gatctaactgg gcctccaccc ggcacaccgg cgtgccagac	180			
agattcaccg gtcggcggcag cggcacccgac tacaccctga ccatctccag catgcaggcc	240			
gaggacctgg ccctgtacta ctgccagcag cactactcca ccccctggac cttcgccgga	300			
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttccccaccc	360			
tccgacgagc agctgaagtc cggcacccgac tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420			
ccccggcagg ccaaggtgca gtgaaagggtg gacaacgccc tgcagtcgg caactccag	480			
aatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc	540			
ctgttcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccaggc	600			
ctgttccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc	642			
<210> 44				

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Ala Ala

20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 45

<211> 361

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 45

cgcgccgagg tccaactgca acagtctgga ccagaactgg tcatgcctgg ggcttcagtg	60
aagatatacct gcaaggcttc tggctacagc ttccacaagct actatgtaca ctgggtgaag	120
cagaggcctg gacagggact tgagtggatt ggatggattt atcctggaag tggtcatact	180
aagtacaatg agaagttcaa ggacaaggcc acactgacgg cagacacatc ctccagcact	240

gcctacatgc aactcagcag cctaacatct gaggactctg cggtcttatta ctgtgcaaga	300
ccccctact atagtaacta cgccgatgtc tggggcacag ggaccacggg caccgtctcg	360
a	361

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Met Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20	25	30
----	----	----

Ser Tyr Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

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

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly His Thr Lys Tyr Asn Glu

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

Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

85	90	95
----	----	----

Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr Ala Asp Val Trp Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120

<210> 47

<211> 678

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 47

ctagccgaca ttgtatgac tcagtctcca tcctccctga ctgtgacagc aggagagaag	60
gtcaactatga gctgcaagtc cagtcagagt ctgttaaaca gtggaaatca aaagaactac	120
ttgaccttgtt accaggcaga accaggcagc cctccaaac ttttatcta ctggcatcc	180
acaagggaat ctgggtccc tgatcgcttc acaggcagtg gatctggAAC agatttact	240

ctcaccatca gcagtgtgca ggctgaagac ctggcagttt attactgtca gagtgattat	300
agtttatccgt acacggtcg aggaaaaacc aagctggaaa taaaacgaac tgtggctgca	360
ccatctgtct tcatcttccc gccatctgtat gagcagttga aatctggAAC tgcctctgtt	420
gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagttggaa ggtggataac	480
gccctccaaat cggtaactc ccaggaggt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc	540
tacagcctca gcagcacccct gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac	600
gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tgcgggtca caaagagctt caacaggga	660

gagtgtaat aagggcc	678
-------------------	-----

<210> 48

<211> 222

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20	25	30
----	----	----

Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 49

<211> 364

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 49

cgccggagg tgaagctggt tgagtcagga cctggcctcg tggaaaccttc tcagtctctg 60

tctctcacct gctctgtcac tggctactcc atcaccagtg gttttactg gacctggatc	120
cggcagtttc caggcaacaa attggaatgg atgggcttca taagctacga tggttagcaat	180
aactacaacc catctctcaa aaatcgaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag	240
ttttcctga agttgaattc tgtgactact gaggacacag ccacatatta ctgtgcaaga	300
ggcggaggct actatggtaa cctcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc	360
tcga	364

<210> 50

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Arg Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20 25 30

Ser Gly Phe Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

35 40 45

Glu Trp Met Gly Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro

50 55 60

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Leu Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

115 120

<210> 51

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 51

ctagccgata ttgtatgac tcaaactaca tcctccctgt ccgcctctct	gggagacaga	60
gtcaccatca gttcaggcc aagtcaaggac attagcaatt atgtaaactg	gttcatcgag	120
aaaccaggta gaactgttaa gtcctgtatc ttccacacat caagattaca	ctcaggagtc	180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat	tagcaccctg	240
gaacaggaag atattgccat ttactttgc caacaggta ttacgcttc	gtggacgttc	300
ggtgtggcga ccaagctgga aataaacga actgtggctg caccatctgt	cttcattttc	360

ccgccccatctg atgaggcgtt gaaatctgg aactgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420

ttcttatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

ctgacgcgtga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtt ataagcggcc 660

<210> 52

<211> 216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Asp Ile Ser

20	25	30
----	----	----

Asn Tyr Val Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu

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

Leu Ile Phe His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Gln Glu Asp Ile Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ile Thr Leu

85	90	95
----	----	----

Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 53

<211> 358

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 53

cgcgccgagg tgcagctgaa ggagt cagga cctggcctcg taaaaaccttc tcagtcctcg	60
tcttcaccc gctctgtcac cggctactcc atcaccatgt ctattactg gaactggatc	120
cggcagttc cagggaaaca aatggaaatgg atggctaca taggctacga tggtcgtaat	180
acctacaacc catctctcaa aaatcgaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag	240
ttttcctga aattgaattc tctgactact gaggacacag ccacatatta ttgttcaaga	300

gagggggact acggttactc tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcga	358
---	-----

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Arg Ala Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20	25	30
----	----	----

Ser Ala Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Val

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Asn Pro

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

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

65	70	75	80
Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Ser Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

115

<210> 55

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 55

ctagccgata ttgtatgac gcaagctaca tcctccctgt ctgcctctct	60
ggagacaga gtcaccgtca gttgcaggc aagt caggac attaacaatt atttaaattt gtatcagcag	120
aaggcagatg gaactgttaa actcctgatc tactacat caagattaca gtcaggagtc	180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga atagattatt ctctcaccat tagcaacctg	240
gaggcaggaag atttgtcac ttactttgc caacagatg aaacgcttcc gtggacgttc	300

ggtgaggca ccaagctgga gctgaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc	360
ccgccccatctg atgaggcgtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcctcca atcgggtAAC	480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	600
caggcctga gctcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta ataagcggcc	660

<210> 56

<211> 216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Gly Asp Arg Val Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn

20	25	30
----	----	----

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ile Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu

65 70 75 80

Glu Gln Glu Asp Phe Val Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Glu Thr Leu

85 90 95

Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 57

<211> 367

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 57

cgcggcgagg tgcagctgca gcagtctgga cctgaactgg taaagcctgg ggcttcagtg 60

aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcaactagct atctttgca ctgggtgaag 120

cagaaggcctg ggcaggccct tgagtggatt ggatatatta atccttacaa tggatgtgct 180

aagtataatg agaagttgaa aggcaaggcc acactgactt cagacaaatc ctccagcaca 240

gcctacatgg aggtcagcag cctgaccctct gaggactctg cggtcttatta ctgtgcaaga 300
gagggtgatt acgtgaggtt ctatggtagt gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
gtctcgaa 367

<210> 58
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 58

Arg	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro
1		5			10										

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

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

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

Lys Leu Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr 65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Val Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser 115 120

<210> 59
<211> 675
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 59

ctagccgaca	tttgtctgac	tcagtcgcca	tcatctctgg	ctgtgtctgc	aggagaaaag	60
gtcactatga	gctgttaagtc	cagtcaaagt	gttttataca	tttcaaata	gaggaattac	120

ttggcctgg accagcagaa accagggcag ttcctaaac tactgatcta ctggcatcc	180
 actaggaaat ctgggtccc tgatcgctc acaggcagt gatctggac agatttact	240
cttaccatca gcagtgtaaa agctgaagac ctggcagttt attactgtca tcaacacctc	300
tcctcgata ctttcggagg ggggaccaag ctggaaatca aacgaactgt ggctgcacca	360
tctgtttca tctcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggactgc ctctgttg	420
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgaaaggt ggataacgcc	480
ctccaatcg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	540
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	600
 tgcgaaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagctcaa cagggagag	660
tgttaataag cgccc	675
<210> 60	
<211> 221	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 60	
Leu Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser	
1 5 10 15	
Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu	
20 25 30	
Tyr Ile Ser Asn Glu Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
 35 40 45	
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser	
50 55 60	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75 80	
Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
His Gln His Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu	
 100 105 110	
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser	
115 120 125	

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

195 200 205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr

1 5

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr Trp

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn

1 5

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Ile Ser Gly Val Gly Ser Thr

1 5

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

1 5 10 15

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Gly Phe Ala Tyr Ser Thr Tyr Asp

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ala Ala

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Cys Ala Arg Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp

1 5 10 15

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser Asp

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Met Ser Ser Ala Gly Asp Val Thr

1 5

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Cys Val Arg His Arg Asp Val Ala Met Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Cys Ala Arg Asp Gly Gly Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp

1 5 10 15

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

Cys Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 84

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Asp Phe Ser Trp Phe Val Tyr Trp

1 5 10

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Trp

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

Ile Ser Gly Gly Ser Tyr Thr

1 5

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Cys Ala Arg Lys Gly Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Lys Leu Ala Tyr Trp

1 5 10 15

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile Phe

1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Pro

1 5

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

Cys Ala Gly Gly Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly His Thr

1 5

<210> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr Ala Asp Val Trp

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr

1 5

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Leu Phe Asp Tyr Trp

1 5 10 15

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Tyr

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn

1 5
<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 102
Cys Ser Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 103
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Leu

1 5

<210> 104
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 104

Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala

1 5

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 105

Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Val Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

1 5 10 15

<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 106

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr

1 5

<210> 107

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

Tyr Thr Ser

1

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr

1 5 10

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

Gln Met Ser

1

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe

1 5 10

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe

1 5 10

<210> 113

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Leu Ala Ser

1

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 114

Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 115

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 116

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 116

Lys Val Ser

1

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 117

Cys Ser Gln Asn Thr His Val Tyr Thr Phe

1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 118

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 119

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

Lys Val Ser

1

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 120

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 121

Gln Asp Val Asp Thr Ala

1 5

<210> 122

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

Trp Ala Ser

1

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 123

Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

Gln Asp Val Ser Ala Ala

1 5

<210> 125

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

Trp Ala Ser

1

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 127

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 128

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 128

Tyr Ile Ser

1

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Gln Asn Val Gly Thr Ala

1 5

<210> 131

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 131

Ser Thr Ser

1

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

Cys Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Phe Thr Phe

1 5 10

<210> 133

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 133

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 134

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

Ala Ala Thr

1

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr Phe

1 5 10

<210> 136

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 136

Gln Asp Val Ile Ala Ala

1 5

<210> 137

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 137

Trp Ala Ser

1

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 138

Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe

1 5 10

<210> 139

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 139

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 140

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 140

Trp Ala Ser

1

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 141

Cys Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe

1 5 10

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 142

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 143

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 143

His Thr Ser

1

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 144

Cys Gln Gln Gly Ile Thr Leu Pro Trp Thr Phe

1 5 10

<210> 145

<211> 6

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 145

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 146

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 146

Tyr Thr Ser

1

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 147

Cys Gln Gln Ser Glu Thr Leu Pro Trp Thr Phe

1 5 10

<210> 148

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 148

Gln Ser Val Leu Tyr Ile Ser Asn Glu Arg Asn Tyr

1 5 10

<210> 149

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 149

Trp Ala Ser

1

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 150

Cys His Gln His Leu Ser Ser Tyr Thr Phe

1

5

10