



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0058512
 (43) 공개일자 2009년06월09일

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Int. Cl. <i>C07K 16/32</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A01K 67/027</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7004290 (22) 출원일자 2009년02월27일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2009년02월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/075078 국제출원일자 2007년08월02일 (87) 국제공개번호 WO 2008/019290 국제공개일자 2008년02월14일</p> <p>(30) 우선권주장 60/835,514 2006년08월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인 아스트라제네카 아베 스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제</p> <p>(72) 발명자 카티리지 수잔 앤 영국 체셔 에스케이10 4티지 맥클레스필드 엘더레이 이 파크 아스트라제네카 알 앤드 디 엘더레이 동 지앙잉 미국 캘리포니아주 92122 샌디에고 리서치 플레이스 5200 바이오젠 아이텍 인코포레이티드 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 김성기, 김진희</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

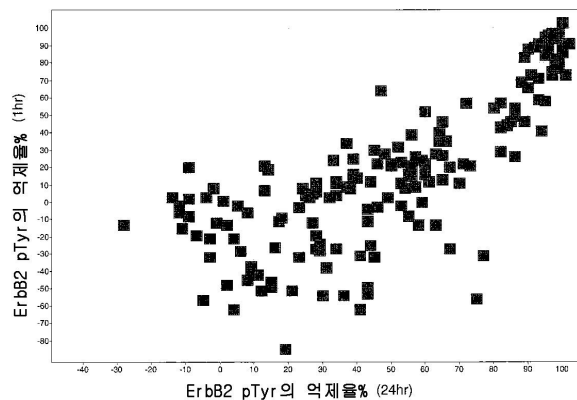
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) E R B B2에 대한 인간 항체

(57) 요약

본 발명은 ErbB2, 바람직하게는 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하는 인간 항체 및 이의 항원 결합 부분을 포함한 항체에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 ErbB2를 억제한다. 본 발명은 또한 키메라, 이종특이적, 유도체화, 단쇄 항체 또는 융합 단백질의 부분인 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 항-ErbB2 항체로부터 유래된 단리된 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 또는 그것의 부분, 및 상기 면역글로불린을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 진단 및 치료를 위해 항체 및 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 항-ErbB2 항체를 포함하는 중 및/또는 경 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자를 이용한 유전자 요법의 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 트랜스제닉 동물 또는 식물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

히킨스 마크

영국 체셔 에스케이10 4티지 맥클레스필드 앨더레이
이 파크 아스트라제네카 알 앤드 디 앨더레이 내

폴츠 이안

캐나다 브이5에이 1브이7 브리티쉬 콜롬비아 버너
비 엔터프라이즈스트리트 7990 암젠 브리티쉬 콜롬
비아 인코포레이티드

장 자스팔 싱

캐나다 브이5에이 1브이7 브리티쉬 콜롬비아 버너
비 엔터프라이즈스트리트 7990 암젠 브리티쉬 콜롬
비아 인코포레이티드

특허청구의 범위

청구항 1

ErbB2에 특이적으로 결합하는 표적화된 결합제.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 인간 세포에 결합하는 성질;
- (b) 사이노몰거스(cynomolgus) ErbB2를 발현하는 세포에 결합하는 성질;
- (c) 헤르셉틴[®] 과 부분적으로 경쟁하나, 2C4와는 경쟁하지 않는 성질;
- (d) 50 ng/ml 미만의 EC50으로 MCF7 세포 내 ErbB2 인산화를 억제하는 성질;
- (e) 50 ng/ml 미만의 EC50으로 SKBR3 세포 내 세포 증식을 억제하는 성질;
- (f) 13.5 nM 이하의 KD로 ErbB2에 결합하는 성질; 또는
- (g) $2.14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하의 ErbB2에 대한 오프 레이트(k_{off})를 나타내는 성질 중 하나 이상을 보유하는 표적화된 결합제.

청구항 3

제2항에 있어서, 13.5 nM 이하의 KD로 ErbB2에 결합하고, ErbB2의 활성화를 억제하는 표적화된 결합제.

청구항 4

제1항에 있어서, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 단클론성 항체인 표적화된 결합제.

청구항 5

- (a) ErbB2에의 결합에 대해 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁하는 항체;
- (b) ErbB2에의 결합에 대해 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁하는 항체;
- (c) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 동일한 ErbB2의 에피토프에 결합하는 항체;
- (d) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 실질적으로 동일한 KD로 ErbB2에 결합하는 항체; 및
- (e) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 실질적으로 동일한 오프 레이트로 ErbB2에 결합하는 항체

로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성질을 가지는, 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하여 이를 억제하는 표적화된 결합제.

청구항 6

- (a) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43,

1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하고/하거나;

(b) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 표적화된 결합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 표적화된 결합체.

청구항 8

제4항에 있어서, 항체가

(a) 서열번호 2에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 4에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(b) 서열번호 6에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 8에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(c) 서열번호 10에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 12에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(d) 서열번호 14에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 16에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(e) 서열번호 18에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 20에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(f) 서열번호 22에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 24에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(g) 서열번호 26에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 28에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(h) 서열번호 30에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 32에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(i) 서열번호 34에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 36에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체;

(j) 서열번호 38에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 40에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체; 및

(k) 서열번호 42에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 44에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 포함하는 항체

로 구성된 군으로부터 선택되는, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 9

제7항에 있어서, 항체가 서열번호 46에 제시된 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 47에 제시된 경쇄 아미노산 서열, 또는 둘다를 추가로 포함하는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체가 임의의 아이소타입으로부터 유래된 것인 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 11

제4항에 있어서, 인간 VH 3-21 유전자, 인간 VH 3-7 유전자, 인간 VH 4-31 유전자, 또는 인간 VH 3-13 유전자

를 이용하는 중쇄를 포함하는 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 12

제4항에 있어서, 인간 VK B3 유전자, 인간 VK L1 유전자, 인간 VK A2 유전자, 또는 인간 VK A1 유전자를 이용하는 경쇄를 포함하는 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 13

제9항에 있어서, 인간 VK B3 유전자, 인간 VK L1 유전자, 인간 VK A2 유전자, 또는 인간 VK A1 유전자를 이용하는 경쇄를 추가로 포함하는 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 14

제4항에 있어서, VL 도메인, VH 도메인, 또는 둘다는 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 VL 도메인, VH 도메인 또는 둘다와 각기 아미노산 서열이 90% 이상 동일한 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 15

1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 FR1, FR2, FR3 또는 FR4 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함하는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 16

제4항에 있어서, 항체가

(a) 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 중쇄 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열;

(b) 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 경쇄 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열; 또는

(a) 및 (b) 둘다를 포함하는 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 17

제4항에 있어서, 상기 항원 결합 부분이 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, 및 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 단쇄 항체(scFv 또는 scFv2), 키메라 항체, 디아보디, 이중특이적 항체, 및 폴리펩티드에 대한 특이적 항원 결합을 제공하기에 충분한 항체의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 18

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 표적화된 결합제 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 부가적 치료제 또는 진단제를 포함하는 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, ErbB2에 특이적으로 결합하고, ErbB2에의 결합에 대해 1.14.1, 1.18.1, 1.20.1, 1.24.3, 1.39.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.100.1, 및 1.140.1로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁하지 않는 항체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 표적화된 결합체를 생성하는 단리된 세포주.

청구항 22

제4항의 항체의 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분, 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분, 또는 둘다를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제22항에 있어서,

- (a) 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열;
- (b) 서열번호 2를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (c) 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열;
- (d) 서열번호 4를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (e) 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열;
- (f) 서열번호 6을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (g) 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열;
- (h) 서열번호 8을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (i) 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열;
- (j) 서열번호 10을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (k) 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열;
- (l) 서열번호 12를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (m) 서열번호 13의 뉴클레오티드 서열;
- (n) 서열번호 14를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (o) 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열;
- (p) 서열번호 16을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (q) 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열;
- (r) 서열번호 18을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (s) 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열;
- (t) 서열번호 20을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (u) 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열;
- (v) 서열번호 22를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (w) 서열번호 23의 뉴클레오티드 서열;
- (x) 서열번호 24를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (y) 서열번호 25의 뉴클레오티드 서열;
- (z) 서열번호 26을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (aa) 서열번호 27의 뉴클레오티드 서열;
- (bb) 서열번호 28을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;

(cc) 서열번호 29의 뉴클레오티드 서열;
(dd) 서열번호 30을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(ee) 서열번호 31의 뉴클레오티드 서열;
(ff) 서열번호 32를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(gg) 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열;
(hh) 서열번호 34를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(ii) 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열;
(jj) 서열번호 36을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(kk) 서열번호 37의 뉴클레오티드 서열;
(ll) 서열번호 38을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(mm) 서열번호 39의 뉴클레오티드 서열;
(nn) 서열번호 40을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(oo) 서열번호 41의 뉴클레오티드 서열;
(pp) 서열번호 42를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
(qq) 서열번호 43의 뉴클레오티드 서열; 및
(rr) 서열번호 44를 코딩하는 뉴클레오티드 서열
로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 24

제23항에 있어서, 발현 조절 서열을 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 25

선택적으로 핵산 분자에 작용적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는, 제22항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 26

제25항의 벡터 또는 제22항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

제26항의 숙주 세포를 적당한 조건 하에 배양하는 단계 및 표적화된 결합체를 회수하는 단계를 포함하는, 표적화된 결합체의 생성 방법.

청구항 28

제22항의 핵산을 포함하고, 상기 핵산을 발현하는 인간 이외의 트랜스게닉 동물 또는 트랜스게닉 식물.

청구항 29

항체를 제28항의 인간 이외의 트랜스게닉 동물 또는 트랜스게닉 식물로부터 단리하는 단계를 포함하는, 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 단리 방법.

청구항 30

(i) ErbB2, ErbB2의 면역원성 부분, 또는 ErbB2를 발현하는 세포 또는 조직으로 인간 항체를 생성할 수 있는 인간 이외의 트랜스게닉 동물을 면역화하는 단계;
(ii) 트랜스게닉 동물이 ErbB2에 대한 면역 반응을 나타내도록 하는 단계; 및

(iii) 항체를 회수하는 단계

를 포함하는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 인간 단클론성 항체의 제조 방법.

청구항 31

제30항의 방법에 의해 생성되는 단리된 항체.

청구항 32

ErbB2-매개 장애 증상의 치료, 예방 또는 경감이 필요한 대상에게 제1항의 표적화된 결합체를 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상에서 ErbB2-매개 장애 증상을 치료, 예방 또는 경감시키는 방법으로서, 상기 표적화된 결합체는 ErbB2를 억제하는 것인 방법.

청구항 33

(a) 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 또는 경쇄 및 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자 둘다의 유효량을 투여하는 단계; 및,

(b) 핵산 분자를 발현하는 단계

를 포함하고, ErbB2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 이용하여 ErbB2-매개 장애 증상의 치료, 예방 또는 경감이 필요한 대상에서 ErbB2-매개 장애 증상을 치료, 예방 또는 경감시키는 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, ErbB2-매개 장애가 암인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 암이 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암, 전립선암, 위암, 자궁내막암, 타액선암, 폐암, 신장암, 결장암, 갑상선암, 췌장암 및 신경교아세포종으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 36

ErbB2 발현 암 세포의 증식의 억제가 필요한 대상에게 제1항의 표적화된 결합체를 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상에서 ErbB2 발현 암 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 37

ErbB2 발현 세포를 제1항의 표적화된 결합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 상기 세포 내 ErbB2 활성을 억제하는 방법으로서, 상기 세포 내 ErbB2 활성은

- (a) ErbB2의 인산화;
- (b) MAPK 경로의 활성화;
- (c) PI3K 경로의 활성화;
- (d) CDC2의 억제; 및
- (e) 이들의 조합

으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 38

ErbB2 발현 세포를 제1항의 표적화된 결합체와 접촉시키는 단계를 포함하는 상기 세포 내 ErbB2 활성을 조절하는 방법으로서, 상기 세포 내 ErbB2 활성은 p38-TSP-1 경로의 활성화인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 세포가 대상의 세포인 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 세포가 암 세포인 방법.

청구항 41

제37항에 있어서, ErbB2의 인산화가 48시간 억제되는 방법.

명세서

기술분야

<1> **관련 출원에 대한 상호 참조**

<2> 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에 전체 내용이 본원에 참조 인용되는, 2006년 8월 4일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제60/835,514호에 대해 우선권을 주장한다.

<3> **기술분야**

<4> 본 발명은 항-ErbB2 항체, 특히 인간 항체, 및 항-ErbB2 항체를, 예를 들어 암의 치료를 위해, 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<5> ErbB 계열(family)의 수용체 티로신 키나제는 세포 성장, 분화 및 생존의 중요 매개자이다. 수용체 계열에는 상피 성장 인자 수용체(EGFR 또는 ErbB1), HER2(ErbB2 또는 p185neu), HER3(ErbB3) 및 HER4(ErbB4)를 포함한 4개의 구분된 구성원이 포함된다.

<6> erbB 1 유전자에 의해 코딩되는 EGFR은 인간 악성 종양에 인과적으로 관련되었다. 특히, EGFR의 증가된 발현은 신경교아세포종뿐만 아니라, 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암 및 위암에서 관찰되었다. 증가된 EGFR 수용체 발현은 종종 자가분비성 자극 경로에 의해 수용체 활성화를 초래하는 동일한 종양 세포에 의한, EGFR 리간드, 형질전환 성장 인자 알파(TGF- α)의 증가된 생성과 관련된다(문헌 [Baselga and Mendelsohn, Pharmac. Ther. 64: 127-154(1994)]). EGFR 또는 그것의 리간드, TGF- α 및 EGF에 대해 지정되는 단클론성 항체는 상기와 같은 악성 종양의 치료에서 치료제로서 평가되었다. 예를 들어, 문헌 [Baselga and Mendelsohn, 이하 상기와 같음]; 문헌 [Masui et al., Cancer Research 44:1002-1007(1984)]; 및 문헌 [Wu et al., J. Clin. Invest. 95: 1897-1905(1995)]를 참조한다.

<7> ErbB 계열의 두 번째 구성원인 p185neu은 본래 화학적으로 처리된 래트의 신경아세포종으로부터의 형질전환 유전자의 산물로서 동정되었다. 활성화된 형태의 neu 전발암유전자는 코딩된 단백질의 막형단 영역에서 (발린에서 글루탐산으로의) 점 돌연변이로부터 비롯된다. neu의 인간 상동체의 증폭이 유방암 및 난소암에서 관찰되고, 나쁜 예후와 상관된다(문헌 [Slamon et al., Science, 235:177-182(1987)]; 문헌 [Slamon et al., Science, 244:707-712(1989)]; 및 미국 특허 제4,968,603호). 지금까지, 인간 종양에 대해 보고된 neu 전발암유전자에서의 점 돌연변이와 유사한 점 돌연변이는 없다. ErbB2의 과발현(빈번하나, 유전자 증폭으로 인해 균일하지는 않음)이 또한 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광의 암종들에서 관찰되었다. 특히, 문헌 [King et al., Science, 229:974(1985)]; 문헌 [Yokota et al., Lancet: 1:765-767(1986)]; 문헌 [Fukushige et al., Mol. Cell Biol., 6:955-958(1986)]; 문헌 [Guerine et al., Oncogene Res., 3:21-31(1988)]; 문헌 [Cohen et al., Oncogene, 4:81-88(1989)]; 문헌 [Yonemura et al., Cancer Res., 51:1034(1991)]; 문헌 [Borst et al., Gynecol. Oncol., 38:364(1990)]; 문헌 [Weiner et al., Cancer Res., 50:421-425(1990)]; 문헌 [Kern et al., Cancer Res., 50:5184(1990)]; 문헌 [Park et al., Cancer Res., 49:6605(1989)]; 문헌 [Zhou et al., Mol. Carcinog., 3:254-257(1990)]; 문헌 [Aasland et al., Br. J. Cancer 57:358-363(1988)]; 문헌 [Williams et al., Pathobiology 59:46-52(1991)]; 및 문헌 [McCann et al., Cancer, 65:88-92(1990)]를 참조한다.

<8> ErbB2는 전립선 암에서 과발현될 수 있다(문헌 [Gu et al., Cancer Lett. 99: 185-9(1996)]; 문헌 [Ross et al., Hum. Pathol. 28:827-33(1997)]; 문헌 [Ross et al., Cancer 79:2162-70(1997)]; 및 문헌 [Sadasivan et

al., J. Urol. 150:126-31(1993)].

- <9> 래트 p185neu 및 인간 ErbB2 단백질 산물에 대해 지정된 항체가 기재되었다. 드레빈(Drebin) 및 그의 동료들은 래트 neu 유전자 산물, p185neu에 대한 항체를 제기하였다. 예를 들어, 문헌 [Drebin et al., Cell 41:695-706(1985)]; 문헌 [Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290(1991)]; 및 제W094/22478호를 참조한다. 문헌 [Drebin et al., Oncogene 2:273-277(1988)]은, p185neu의 2개의 구분된 영역과 반응성인 항체의 혼합물이 누드 마우스에 이식된 neu-형질전환된 NIH-3T3 세포에 대한 상승효과적 항-종양 효과를 초래함을 보고한다. 미국 특허 제5,824,311호(1998년 10월 20일 허여)도 또한 참조한다.
- <10> 문헌 [Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3): 1165-1172(1989)]는, 인간 유방 종양 세포주 SK-BR-3를 이용하여 특징화되는 항-ErbB2 항체의 패널의 생성을 기재한다. 항체에의 노출 후의 SK-BR-3 세포의 상대적 세포 증식을, 72시간 후에 단층의 결정 자외선 염색에 의해 결정하였다. 이 검정법을 이용하여, 세포 증식을 56% 억제한 4D5로 불리는 항체에서 최대 억제가 획득되었다. 패널 내 다른 항체는 이 검정법에서 보다 적은 정도로 세포 증식을 감소시켰다. 항체 4D5는 ErbB2-과발현 유방 종양 세포주가 TNF- α 의 세포독성 영향에 감작화한다는 것이 추가로 밝혀졌다. 미국 특허 제5,677,171호(1997년 10월 14일 출원)도 또한 참조한다. 문헌 [Hudziak et al.]에 논의된 항-ErbB2 항체가 또한 문헌 [Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558(1990)]; 문헌 [Kotts et al., In Vitro 26(3):59A(1990)]; 문헌 [Sarup et al., Growth Regulation 1:72-82(1991)]; 문헌 [Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11(3):117-127(1991)]; 문헌 [Kumar et al., Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986(1991)]; 문헌 [Lewis et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993)]; 문헌 [Pietras et al., Oncogene 9:1829-1838(1994)]; 문헌 [Vitetta et al., Cancer Research 54:5301-5309(1994)]; 문헌 [Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665(1994)]; 문헌 [Scott et al., J. Biol. Chem. 266:14300-5(1991)]; 문헌 [D'souza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206(1994)]; 문헌 [Lewis et al., Cancer Research 56: 1457-1465(1996)]; 및 문헌 [Schaefer et al., Oncogene 15: 1385-1394(1997)]에 특징화되어 있다.
- <11> 쥐과 항-ErbB2 항체 4D5의 재조합 인간화 양태(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 또는 헤르셉틴(HERCEPTIN)[®]; 미국 특허 제5,821,337호)는 강한 사전 항암 요법이 투입된 ErbB2-과발현 전이 유방암을 앓는 환자에 있어 임상적으로 활성을 가진다(문헌 [Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744(1996)]). 헤르셉틴[®]은 ErbB2 단백질을 과발현하는 종양을 갖는 전이 유방암을 앓는 환자의 치료를 위해, 1998년 9월 25일에 미국 식품의약부로부터 시판 허가를 받았다.
- <12> 각종 성질들을 갖는 다른 항-ErbB2 항체가 문헌 [Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937(1991)]; 문헌 [McKenzie et al., Oncogene 4:543-548(1989)]; 문헌 [Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369(1991)]; 문헌 [Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362(1990)]; 문헌 [Stancovski et al., PNAS(USA) 88:8691-8695(1991)]; 문헌 [Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589(1992)]; 문헌 [Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408(1993)]; 제W094/00136호; 문헌 [Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776(1992)]; 문헌 [Hancock et al., Cancer Res. 51:4575-4580(1991)]; 문헌 [Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373(1994)]; 문헌 [Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765(1994)]; 문헌 [Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267: 15160-15167(1992)]; 미국 특허 제5,783,186호; 및 문헌 [Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109(1997)]에 기재되었다.
- <13> 상동성 스크리닝으로 인해, 2개의 다른 ErbB 수용체 계열 구성원, ErbB(미국 특허 제5,183,884호 및 제 5,480,968호, 및 문헌 [Kraus et al., PNAS(USA) 86:9193-9197(1989)]) 및 ErbB4(유럽 특허 출원 제599,274호; 문헌 [Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750(1993)]; 및 문헌 [Plowman et al., Nature, 366:473-475(1993)])이 동정되었다. 이들 수용체 양자 모두는 적어도 일부 유방암 세포주 상에서 증가된 발현을 나타낸다.
- <14> ErbB 수용체는 일반적으로 세포에서 각종 조합으로 발견되고, 이종이량체화가 각종 ErbB 리간드에 대한 세포 반응의 다양성을 증가시키는 것으로 생각된다(문헌 [Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132(1995)]). EGFR은 적어도 6개의 상이한 리간드; 상피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장 인자 알파(TGF- α), 암파이어굴린, 헤파린 결합 상피 성장 인자(HB-EGF), 베타셀룰린 및 에피데르말린에 의해 결합된다(문헌 [Groenen et al., Growth Factors 11:235-257(1994)]). 단일 유전자의 대체 스플라이싱으로부터 비롯된 한 계열의 헤레굴린 단백질은 ErbB3 및 ErbB4에 대한 리간드이다. 헤레굴린 계열에는 알파, 베타 및 감마 헤레굴린(문헌 [Holmes et al., Science, 256:1205-1210(1992)]; 미국 특허 제5,641,869호; 및 문헌 [Schaefer et

al., Oncogene 15:1385-1394(1997)]; neu 분화 인자(NDF), 아교 성장 인자(GGF); 아세틸콜린 수용체-유도 활성(ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유도 인자(SMDF)가 포함된다. 검토를 위해, 문헌 [Groenen et al., Growth Factors 11:235-257(1994)]; 문헌 [Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262(1996)] 및 문헌 [Lee et al., Pharm. Rev. 47:51-85(1995)]를 참조한다. 최근, 3개의 부가적 ErbB 리간드; 즉 ErbB3 또는 ErbB4에 결합하는 것으로 보고된 뉴레굴린-2(NRG-2)(문헌 [Chang et al., Nature 387 509-512(1997)]; 및 문헌 [Carraway et al., Nature 387:512-516(1997)]; ErbB4에 결합하는 뉴레굴린-3(문헌 [Zhang et al., PNAS(USA) 94(18):9562-7(1997)]; 및 ErbB4에 결합하는 뉴레굴린-4(문헌 [Harari et al., Oncogene 18:2681-89(1999)])을 동정하였고, HB-EGF, 베타셀룰린 및 에피레굴린이 또한 ErbB4에 결합한다. EGF 및 TGF α 는 ErbB2에 결합하지 않으나, EGF는 EGFR 및 ErbB2를 자극하여 이종이량체를 형성하고, 이는 EGFR을 활성화하며, 이종이량체에서 ErbB2의 인산전달반응을 초래한다. 이량체화 및/또는 인산전달반응은 ErbB2 티로신 키나제를 활성화하는 것으로 보인다. 문헌 [Earp et al., 이하 상기와 동일함]를 참조한다. 마찬가지로, ErbB3가 ErbB2와 공동 발현될 때, 활성 신호전달 착물이 형성되고, ErbB2에 대해 지정된 항체가 이 착물을 붕괴할 수 있다(문헌 [Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665(1994)]). 부가적으로, 헤레굴린(HRG)에 대한 ErbB3의 친화도는 ErbB2와 공동 발현될 때 보다 높은 친화도 상태로 증가된다. 또한, ErbB2-ErbB3 단백질 착물에 대해 문헌 [Levi et al., Journal of Neuroscience 15: 1329-1340(1995)]; 문헌 [Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435(1995)]; 및 문헌 [Lewis et al., Cancer Res., 56: 1457-1465(1996)]을 참조한다. ErbB4는 ErbB3과 같이 ErbB2와 활성 신호전달 착물을 형성한다(문헌 [Carraway and Cantley, Cell 78:5-8(1994)]).

<15> HER-2/neu 전발암유전자의 산물인 HER2는 인간 상피 성장 인자 수용체(HER) 계열의 티로신 키나제 수용체의 두 번째 구성원이고, 리간드 오픈 수용체인 것으로 제안되어 왔다. HER2와 또 다른 HER 계열 구성원인 HER1, HER3 또는 HER4 사이의 리간드-의존성 이종이량체화는 HER2 신호전달 경로를 활성화한다. HER2의 세포내 신호전달 경로는 MAPK-비의존성 S6 키나제 및 포스포리파제 C-감마 신호전달 경로뿐만 아니라 ras-MAPK 및 PI3K 경로를 수반하는 것으로 생각된다(문헌 [Graus-Porta et al., Mol. Cell Biol. 1995 March; 15(3): 1182-1191]; 문헌 [Grant et al., Front Biosci. 2002 Feb 1; 7:d376-89]).

<16> HER2 신호전달은 또한 전혈관신생 인자, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 인터류킨-8(IL-8), 및 항혈관신생 인자, 트롬보스폰딘-1(TSP-1)에 영향을 준다. 내인적으로 낮은 수준의 HER2를 발현하는 MCF-7 및 T-47D 유방암 세포 내 HER2의 재발현은 VEGF 및 IL-8의 상승된 발현 및 TSP-1의 감소된 발현을 초래한다. HER2의 인간화 항-HER2 항체(트라스투주맙 또는 헤르셉틴[®]) 또는 HER2에 대한 레트로바이러스-매개 소 간섭 RNA(siHER2)를 이용한 억제제는 VEGF 및 IL-8 발현을 감소시키나, 높은 수준의 HER2를 발현하는 BT474 유방암 세포에서는 TSP-1 발현을 증가시켰다. 그러므로, HER2 신호전달은 구분된 신호전달 경로를 통해 전혈관신생 및 항혈관신생 인자 사이의 평형에 영향을 미친다. 트라스투주맙은 혈관신생 및 종양 성장을, 적어도 부분적으로는 HER2-p38-TSP-1 경로의 활성화 및 HER2-PI3K-AKT-VEGF/IL-8 경로의 억제를 통해, 억제한다(Wen et al., Oncogene. 2006 May 22; Epub). 부가적으로, ErbB2 막 RTK는 Cdc2를 직접 인산화함으로써 탁솔-유도 아포토시스에 대한 내성을 부여할 수 있다(문헌 [Tan et al., Mol. Cell. 2002 May; 9(5):993-1004]).

발명의 상세한 설명

<17> **발명의 개요**

- <18> 본 발명의 특정 실시양태들이 이하 기재된다.
- <19> 한 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2에 특이적으로 결합하는 표적화된 결합제, 예를 들어 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다. 표적화된 결합제는 하기 성질들 중 하나 이상을 가질 수 있다:
- <20> (a) 인간 세포에 결합함;
- <21> (b) 사이노몰거스(cynomolgus) ErbB2를 발현하는 세포에 결합함;
- <22> (c) 부분적으로 헤르셉틴[®] 과 경쟁하나, 2C4와는 경쟁하지 않음;
- <23> (d) 50 ng/ml 미만의 EC50으로 MCF7 세포 내 ErbB2 인산화를 억제함;
- <24> (e) 50 ng/ml 미만의 EC50으로 SKBR3 세포 내 세포 증식을 억제함;

- <25> (f) 13.5 nM 이하의 KD로 ErbB2에 결합함; 또는
- <26> (g) $2.14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하의 ErbB2에 대한 오프 레이트(k_{off})를 가짐.
- <27> 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체는 13.5 nM 이하의 KD로 ErbB2에 결합하고, ErbB2의 활성화를 억제한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 표적화된 결합체는 항체이다. 한 실시양태에서, 상기 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다.
- <28> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기의 성질들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성질을 가지는, 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하여 그것을 억제하는 표적화된 결합체, 예를 들어 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다:
- <29> (a) ErbB2에 대한 결합을 위해 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁함;
- <30> (b) ErbB2에 대한 결합을 위해 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁함;
- <31> (c) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 동일한 ErbB2의 에피토프에 결합함;
- <32> (d) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 실질적으로 동일한 KD로 ErbB2에 결합함; 및
- <33> (e) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 실질적으로 동일한 오프 레이트로 ErbB2에 결합함.
- <34> 또 다른 실시양태에서, 상기 표적화된 결합체는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다.
- <35> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2에 특이적으로 결합하는 표적화된 결합체, 예를 들어 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는데, 여기에서
- <36> (a) 표적화된 결합체는 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하고;
- <37> (b) 표적화된 결합체는 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하여,
- <38> (c) 표적화된 결합체는 (a)의 중쇄 및 (b)의 경쇄를 포함하거나; (c)의 표적화된 결합체에서 중쇄 및 경쇄 CDR 아미노산 서열은 동일한 항체로부터 선택된다.
- <39> 또 다른 실시양태에서, 상기 표적화된 결합체는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다. 또 다른 실시양태에서, 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 서열번호 46에 나타난 중쇄 아미노산 서열, 서열번호 47에 나타난 경쇄 아미노산 서열, 또는 양자 모두를 추가로 포함한다.
- <40> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 임의의 아이소타입으로부터의 것일 수 있다.
- <41> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 VH 3-21 유전자, 인간 VH 3-7 유전자, 인간 VH 4-31 유전자, 또는 인간 VH 3-13 유전자를 이용하는 중쇄를 포함한다.

- <42> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 VH 3-21 유전자, 인간 VH 3-7 유전자, 인간 VH 4-31 유전자, 또는 인간 VH 3-13 유전자를 이용하는 중쇄를 포함한다.
- <43> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 VK B3 유전자, 인간 VK L1 유전자, 인간 VK A2 유전자, 또는 인간 VK A1 유전자를 이용하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 그것의 부분을 포함한다.
- <44> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 인간 VK B3 유전자, 인간 VK L1 유전자, 인간 VK A2 유전자, 또는 인간 VK A1 유전자를 이용하는 경쇄를 추가로 포함한다.
- <45> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 VL 도메인, VH 도메인 또는 양자 모두는 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 VL 도메인, VH 도메인 또는 양자 모두와 각기 아미노산 서열이 90% 이상 동일하다.
- <46> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체의 FR1, FR2, FR3 또는 FR4 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함하는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다.
- <47> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은
- <48> (a) 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 중쇄 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열;
- <49> (b) 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 경쇄 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열; 또는
- <50> (a) 및 (b)의 양자 모두
- <51> 를 포함하는, 인간 단클론성 항체 또는 항원 결합 부분을 포함한다.
- <52> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 항원 결합 부분이 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, 및 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단쇄 항체(scFv 또는 scFv2), 키메라 항체, 디아보디, 이중특이적 항체, 및 폴리펩티드에 대한 특이적 항원 결합을 제공하기에 충분한 항체의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는, 본원에 기재된 인간 단클론성 항체 또는 항원 결합 부분을 포함한다.
- <53> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 표적화된 결합제, 예를 들어 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 부분, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 포함한다. 조성물은 부가적 치료제 또는 진단제를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 ErbB2에 대한 결합을 위해 1.14.1, 1.18.1, 1.20.1, 1.24.3, 1.39.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.100.1, 및 1.140.1로 구성된 군으로부터 선택되는 항체와 경쟁하지 않는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 제2 항체를 추가로 포함한다.
- <54> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 표적화된 결합제, 항체 또는 항원 결합 부분, 또는 상기 항체 또는 상기 부분의 중쇄 또는 경쇄를 생성하는 단리된 세포주를 포함한다.
- <55> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분, 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분, 또는 양자 모두를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 포함한다. 단리된 핵산은,
- <56> (a) 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열;
- <57> (b) 서열번호 2를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <58> (c) 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열;
- <59> (d) 서열번호 4를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <60> (e) 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열;

- <61> (f) 서열번호 6을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <62> (g) 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열;
- <63> (h) 서열번호 8을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <64> (i) 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열;
- <65> (j) 서열번호 10을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <66> (k) 서열번호 11의 뉴클레오티드 서열;
- <67> (l) 서열번호 12를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <68> (m) 서열번호 13의 뉴클레오티드 서열;
- <69> (n) 서열번호 14를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <70> (o) 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열;
- <71> (p) 서열번호 16을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <72> (q) 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열;
- <73> (r) 서열번호 18을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <74> (s) 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열;
- <75> (t) 서열번호 20을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <76> (u) 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열;
- <77> (v) 서열번호 22를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <78> (w) 서열번호 23의 뉴클레오티드 서열;
- <79> (x) 서열번호 24를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <80> (y) 서열번호 25의 뉴클레오티드 서열;
- <81> (z) 서열번호 26을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <82> (aa) 서열번호 27의 뉴클레오티드 서열;
- <83> (bb) 서열번호 28을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <84> (cc) 서열번호 29의 뉴클레오티드 서열;
- <85> (dd) 서열번호 30을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <86> (ee) 서열번호 31의 뉴클레오티드 서열;
- <87> (ff) 서열번호 32를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <88> (gg) 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열;
- <89> (hh) 서열번호 34를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <90> (ii) 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열;
- <91> (jj) 서열번호 36을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <92> (kk) 서열번호 37의 뉴클레오티드 서열;
- <93> (ll) 서열번호 38을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <94> (mm) 서열번호 39의 뉴클레오티드 서열;
- <95> (nn) 서열번호 40을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <96> (oo) 서열번호 41의 뉴클레오티드 서열;

- <97> (pp) 서열번호 42를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- <98> (qq) 서열번호 43의 뉴클레오티드 서열; 및
- <99> (rr) 서열번호 44를 코딩하는 뉴클레오티드 서열
- <100> 로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- <101> 본 발명은 표적화된 결합제, 핵산 분자에 작용적으로 연결된 발현 조절 서열을 임의적으로 포함하는, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 벡터 또는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함한다.
- <102> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 숙주 세포 또는 세포주를 적당한 조건 하에 배양하는 단계 및 상기 항체 또는 항원 결합 부분을 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 표적화된 결합제, 단클론성 항체 또는 항원 결합 부분의 생성 방법을 포함한다
- <103> 본 발명은 본원에 기재된 핵산을 발현하는, 상기 핵산을 포함하는 인간 이외의 트랜스게닉 동물 또는 트랜스게닉 식물을 추가로 포함한다. 본 발명은 또한 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 단리 방법을 포함한다. 본 방법은 항체를 인간 이외의 트랜스게닉 동물 또는 트랜스게닉 식물로부터 단리하는 단계를 포함한다.
- <104> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은
- <105> (i) ErbB2, ErbB2의 면역원성 부분, 또는 ErbB2를 발현하는 세포 또는 조직으로 인간 항체를 생성할 수 있는 인간 이외의 트랜스게닉 동물을 면역화하는 단계;
- <106> (ii) 트랜스게닉 동물이 ErbB2에 대한 면역 반응을 개시하도록 하는 단계; 및
- <107> (iii) 항체를 회수하는 단계
- <108> 를 포함하는, ErbB2에 특이적으로 결합하는 인간 단클론성 항체의 제조 방법을 포함한다.
- <109> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 표적화된 결합제, 항체 또는 항원 결합 부분 또는 조성물을 ErbB2-매개 장애의 증상의 치료, 예방 또는 경감이 필요한 대상에게 투여하는 단계(여기에서, 상기 표적화된 결합제, 항체 또는 항원 결합 부분은 ErbB2를 억제함)를 포함하는, ErbB2-매개 장애의 증상을 치료, 예방 또는 경감시키는 방법을 포함한다.
- <110> 또 다른 측면에서, 본 발명은
- <111> (i) 유효량의, 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 표적화된 결합제, 예를 들어 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 또는 양자 모두를 코딩하는(즉, 항체의 경쇄 및 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는) 단리된 핵산 분자를 투여하는 단계; 및,
- <112> (ii) 핵산 분자를 발현하는 단계
- <113> 를 포함하는, 암과 같은 ErbB2-매개 장애의 증상의 치료, 예방 또는 경감이 필요한 대상에게 있어, ErbB2에 특이적으로 결합하는 표적화된 결합제, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 이용하여 암과 같은 ErbB2-매개 장애의 증상을 치료, 예방 또는 경감시키는 방법을 포함한다.
- <114> ErbB2-매개 장애는 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암, 전립선암, 위암, 자궁내막암, 타액선암, 폐암, 신장암, 결장암, 갑상선암, 췌장암 및 신경교아세포종으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- <115> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2 발현 암 세포의 증식의 억제가 필요한 대상에게 표적화 결합제, 예를 들어 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 부분 또는 조성물을 투여하는 단계(여기에서, 상기 표적화된 결합제는 ErbB2를 억제함)를 포함하는, 상기 대상에게 있어 ErbB2 발현 암 세포의 증식을 억제하는 방법을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 표적화된 결합제는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다.
- <116> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2를 발현하는 세포, 예를 들어 대상 또는 암 세포를 본원에 기재된 표적화된 결합제 또는 조성물과 접촉시키는 단계(여기에서, 세포 내 ErbB2 활성화는
- <117> (a) ErbB2의 인산화;

- <118> (b) MAPK 경로의 활성화;
- <119> (c) PI3K 경로의 활성화;
- <120> (d) CDC2의 억제; 및
- <121> (e) 이들의 조합
- <122> 으로 구성된 군으로부터 선택됨)를 포함하는, 상기 세포 내 ErbB2 활성을 억제하는 방법을 포함한다.
- <123> 한 실시양태에서, ErbB2의 인산화는 48시간까지 억제된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 표적화된 결합체는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 인간화, 키메라 또는 인간 단클론성 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다.
- <124> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2 발현 세포를 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 부분 또는 조성물과 접촉시키는 단계(여기에서, 세포 내 ErbB2 활성은 p38-TSP-1 경로의 활성화임)를 포함하는, 상기 세포 내 ErbB2 활성을 조절하는 방법을 포함한다.
- <125> 한 실시양태에서, 항원 결합 부위는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 중 임의의 것의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있고, 이 때 개시된 CDR 내 20개, 16개, 10개, 9개 이하, 예를 들어 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 정도의 아미노산 부가, 치환, 결실 및/또는 삽입을 가진다. 그러한 변형은 잠재적으로 CDR 내의 임의의 잔기에서 이루어질 수 있다.
- <126> 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4, 4(a) 및/또는 표 5에 나와 있는 바와 같은 CDR1, CDR2 또는 CDR3 서열 중 임의의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4 및/또는 4(a)에 나와 있는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 5에 나와 있는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4 또는 3(a)에 나와 있는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 표 5에 나와 있는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함할 수 있다. 당업자는 CDR 결정을 용이하게 달성할 수 있음을 주목한다. 예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), vols. 1-3]를 참조하거나, 또는 본원에 정의된 바와 같다.
- <127> 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4, 4(a) 또는 표 5에 나와 있는 바와 같은 완전 인간 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 중 임의의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4 및 4(a)에 나와 있는 바와 같은 완전 인간 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 5에 나와 있는 바와 같은 완전 인간 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합체 또는 항체는 표 4 및 4(a)에 나와 있는 바와 같은 완전 인간 단클론성 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 표 5에 나와 있는 바와 같은 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 서열을 포함할 수 있다.

실시예

- <400> 실시예 1
- <401> 면역화 및 역가측정
- <402> 면역화

<403> 인간 ErbB2의 세포의 도메인 및 인간 IgG1의 Fc 영역을 함유하는 재조합 인간 ErbB2-ECD/Fc γ 1 융합 단백질을 면역원으로 사용하기 위해 R&D 시스템즈 인코포레이티드(R&D Systems, Inc.)(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재, 카탈로그 #1129-ER/CF)로부터 취득하였다. 제노마우스[®] 마우스(제노마우스 계통 XM3B-3, 압제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.)(미국 캘리포니아주 프레몬트 소재))를 발바닥 주입으로 순차적으로 면역화함으로써 ErbB2에 대한 단클론성 항체를 개발하였다. 첫 번째로 마우스 당, 티터맥스 골드(Titermax Gold)(시그마(Sigma), 카탈로그 #T2684, 로트 #K1599) 내 10 μ g 재조합 인간 ErbB2-ECD/Fc γ 1을 주입하였다. 하기 10회 증폭(boost)을, 마우스 당, 5 μ l의 아주-포스(Adju-Phos)(인산알루미늄 젤, 카탈로그 #1452-250, HCI 바이오섹터(HCI Biosector))와 혼합된 15 μ l의 qCpG(이뮤노이지 마우스 아주반트(ImmunEasy Mouse Adjuvant, 카탈로그 제 303101; 키아젠(Qiagen)) 내 10 μ g의 재조합 인간 ErbB2-ECD/Fc γ 1을 이용하여 주입하였다. 각 주입의 총 체적은 마우스 당, 50 μ l였고, 발바닥 당, 25 μ l였다. 마우스를 5주 동안 매주 2회 면역화하였고, 39일째에 융합을 수행하였다.

<404> 역가에 의해 수확하기 위한 동물의 선택

<405> 면역화된 제노마우스 마우스를 8번째 증폭 후에 채혈하고, 혈청 내 항-ErbB2 항체 역가를 FACS(형광-활성화 세포 분류기) 분석에 의해 결정하였다.

<406> 이 목적을 위해, 인간 ErbB2 발현 벡터를 작제하였고, 마우스 프리-B B300.19 세포를 형질감염시켜, 인간 ErbB2 단백질을 발현하였다. 인간 ErbB2 cDNA를 인간 포피유사 암종 A431 세포(ATCC, 카탈로그 #CRL-1555)로부터 RT-PCR에 의해 유도하여, HindIII 및 NotI 엔도뉴클레아제 제한 절단 부위를 통해 pCR3.1 발현 벡터(인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 #K3000)에 클로닝하였다. 발현 벡터는 전장 인간 ErbB2를 코딩하는 3768bp의 삽입부를 함유하였다. 상기 플라스미드를 전기천공 방법을 이용하여 B300.19 세포에 형질감염시켰다. 푸로마이신(2.5 μ g/ml)의 존재 하에 hErbB2 단백질을 발현하는 안정한 B300.19 클론을 선택한 후, 키메라 항-hErbB2 항체(2C4로도 본원에서 칭해지고, 문헌 [Cancer Immunol. Immunotherapy(2006) 55:717-727, 제목: "Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab"]에 상세히 기재된 바와 같이 제조됨) 및 이에 이어 염소 항-마우스 IgG PE(칼텍(Caltag), 카탈로그 #M30004-4)을 이용하여 FACS에 의해 스크리닝하였다. FACS에서 최고 기하학적 평균을 제공하는 B300.19/hErbB2 클론 #44를 혈청 역가 결정을 위해 선택하였다.

<407> 면역화되고 채혈된 마우스로부터의 혈청을 1:50, 1:250 또는 1:1250 희석율로 FACS 완충액(2% FBS를 갖는 PBS) 중에 적정하였다. B300.19/hErbB2 클론 #44 세포(양성 세포) 및 B300.19 모 세포(음성 세포)를 1시간 동안 일련으로 희석된 혈청과 함께 항온 배양한 후, 다시 30분 동안 Cy5-접합 염소 항-인간 IgG(잭슨 이뮤노리서치 랩스(Jackson ImmunoResearch Labs)/JIR, 카탈로그 #109-176-098)와 함께 항온 배양하였다. 항-ErbB2 mAb 2C4를 양성 대조군으로 사용한 반면, 인-하우스로 생성된 항-KLH G1 항체(Gmix)를 G1 아이소타입 대조군으로 사용하였다. 심의 세정 후, 세포를 FACS 완충액에 재현탁하고, BD FACS 기기 상에서 분석하였다. 데이터 분석 후, 각 샘플의 기하학적 평균을 결정하였고, 이는 하기 표 2에 나와 있다. ErbB2 음성 세포에서의 기하학적 평균에 대한 ErbB2 양성 세포에서의 기하학적 평균의 비는 ErbB2에 대한 특이적 결합 능력과 상관된다. G1 아이소타입 대조군 항-KLH Gmix, 2차 대조군 항체 염소 항-마우스 IgG Cy5(JIR, 카탈로그 #115-176-071) 및 염소 항-인간 IgG PE 단독을 포함한 음성 대조군에서 1 미만의 기하학적 평균비가 산출되었다. 양성 대조군 mAb 2C4 및 모든 10마리의 면역화된 마우스로부터의 혈청에서 2.98 내지 7.55의 비가 산출되었으며, 이에 따라 모든 마우스들이 인간 ErbB2에 대해 체액성 면역 반응을 전개하였다.

<408> [표 2] 혈청 역가: 10마리의 마우스(XM3B-3 계통)

<409>

| 샘플 마우스 ID | 기하학적 평균 | | | 기하학적 평균 비 |
|--------------|---------|------------------|------------------|--------------|
| | 검정 희석율 | 양성 세포 기하학적 평균 | 음성 세포 기하학적 평균 | |
| 5152-1 | 1:50 | 324 | 62.2 | 5.21 |
| | 1:250 | 251 | 45.1 | 5.57 |
| | 1:1250 | 177 | 26.5 | 6.68 |
| 5152-2 | 1:50 | 308 | 75 | 4.11 |
| | 1:250 | 209 | 39.9 | 5.24 |
| | 1:1250 | 146 | 23.4 | 6.24 |

| | | | | |
|---------|--------|------|------|------|
| 5152-3 | 1:50 | 304 | 85.3 | 3.56 |
| | 1:250 | 199 | 40.1 | 4.96 |
| | 1:1250 | 157 | 21.1 | 7.44 |
| 5152-4 | 1:50 | 331 | 111 | 2.98 |
| | 1:250 | 227 | 42.8 | 5.30 |
| | 1:1250 | 166 | 22 | 7.55 |
| 5152-5 | 1:50 | 196 | 55.1 | 3.56 |
| | 1:250 | 142 | 26.4 | 5.38 |
| | 1:1250 | 91.7 | 16.2 | 5.66 |
| 5152-6 | 1:50 | 214 | 66.9 | 3.20 |
| | 1:250 | 129 | 33.1 | 3.90 |
| | 1:1250 | 92.4 | 17.5 | 5.28 |
| 5152-7 | 1:50 | 278 | 88.1 | 3.16 |
| | 1:250 | 157 | 38.1 | 4.12 |
| | 1:1250 | 122 | 20.5 | 5.95 |
| 5152-8 | 1:50 | 240 | 58.3 | 4.12 |
| | 1:250 | 168 | 27.2 | 6.18 |
| | 1:1250 | 94.3 | 16 | 5.89 |
| 5152-9 | 1:50 | 208 | 46.2 | 4.50 |
| | 1:250 | 137 | 24.1 | 5.68 |
| | 1:1250 | 89.9 | 15.9 | 5.65 |
| 5152-10 | 1:50 | 256 | 82.9 | 3.09 |
| | 1:250 | 157 | 40.5 | 3.88 |
| | 1:1250 | 131 | 22.7 | 5.77 |

<410>

실시예 2

<411>

림프구의 회수, B-세포 단리, 융합 및 하이브리도마의 생성

<412>

림프절(LN)을 면역화된 마우스로부터 수집하여, 3 ml 무균 FASC 완충액(PBS, 2% FBS) 내로 가공하였다. LN 세포를 40 μm 셀 필터를 통해 여과하고, 3분 동안 400 g으로 스핀-다운하여, 3 ml 프레쉬 FACS 완충액에 재현탁하였다. 세포를 계수한 후, CD90(파밍젠(Pharmingen), 카달로그 #553002), CD4(파밍젠, 카달로그 #553728), CD8(파밍젠, 카달로그 #553029) 및 IgM(파밍젠, 카달로그 #555781)에 대한 비오틴화 항체를 첨가하였다. 세포 및 상기 항체를 완만하게 혼합하였고, 10분 동안 빙상에서 항온 배양하였다. 세포를 다시 스핀-다운하였고, FACS 완충액으로 1회 세정하였다. SA 다이날 비이드(SA Dynal bead)(M-280)를 4:1의 비드 대 표적 세포의 비로 세포에 첨가하였고, 실온에서 12분 동안 회전하면서 항온 배양하였다. 15 ml 관 내 세포/비이드를 2분 동안 다이날 자기의 자기장 내에 두었다. IgM-분획을 함유하는 상등액을 새 관으로 옮겼고, 자기 단계를 1회 더 반복하였다. 세포 상등액을 최종 관으로 옮겼고, IgM-세포를 계수하고, 융합을 위해 분취하였다.

<413>

상기로부터의 세정된 풍부화 B 세포를 ATCC로부터 구매한 비-분비성 골수종 P3X63Ag8.653 세포(카달로그 #CRL 1580)(문헌 [Kearney et al., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550])을 1:1의 비로 혼합함으로써 융합을 수행하였다. 세포 혼합물을 800×g에서 원심분리에 의해 완만하게 펠렛화하였다. 상등액을 완전히 제거한 후, 세포를 2 내지 4 ml의 프로나제(Pronase) 용액(칼바이오켄(CalBiochem), 카달로그 #53702; PBS 중 0.5 mg/ml)으로 2분 이하 동안 처리하였다. 이어서, 3 내지 5 ml의 FBS를 첨가하여, 효소 활성을 중지하였고, 현탁액을 전기 세포 융합 용액(ECFS: 0.3 M 수크로스, 0.1 mM 아세트산마그네슘, 0.1 mM 아세트산칼슘, 이들 모두는 시그마 제품임)을 이용하여 40 ml의 총 체적으로 조정하였다. 상등액을 원심분리 후에 제거하였고, 세포를 40 ml ECFS에 재현탁하였다. 이 세정 단계를 반복하였고, 세포를 또 다시 2×10⁶ 세포/ml의 농도로 ECFS에 재현탁시켰다.

<414>

표준 기기 셋팅에 따라, 융합 생성기(모델 ECM2001, 제네트로닉스 인코포레이티드(Genetronic, Inc.)(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재))를 이용하여 전기-세포 융합을 수행하였다. ECF 후에, 세포 현탁액을 융합 체임버로부터 주의하여 제거하여, L-글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, OPI(옥살로아세테이트, 피루베이트, 소 인슐린)(이 모두 시그마 제품임) 및 IL-6(베링거 만하임(Boehringer Mannheim))으로 보충된, DMEM(JRH 바이오사이언시스(JRH Biosciences)), 15% FBS(하이클론(Hyclone)) 함유의 동일한 체적의 하이브리도마 배양 배지를 함유하는

무균 관에 옮겼다. 세포를 15 내지 30분 동안 37°C에서 항온 배양한 후, 400×g(1000 rpm)에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포를 2×10⁵ B 세포 층/96-웰 플레이트 및 200 μl/웰의 최종 플레이팅에 기초하여, 하이브리도마 선택 배지(0.5×HA(시그마, 카달로그 #A9666)로 보충된 하이브리도마 배양 배지)에 완만하게 재현탁하였다. 세포를 완만하게 혼합하였고, 96-웰 플레이트에 피펫팅하여 성장하도록 하였다. 7일째 또는 10일째에, 배지의 1/2을 제거하였고, 세포에 하이브리도마 선택 배지를 공급하였다.

<415>

실시예 3

<416>

FMAT/FACS에 의한 항체의 스크리닝

<417>

14일 동안 배양한 후, 하이브리도마 상등액을 FMAT(형광분석 미세체적 검정 기술)에 의해 ErbB2-특이적 항체에 대해 스크리닝하였다. 간략히, B300.19/hErbB2(양성 세포) 또는 B300.19(ErbB2-음성 세포)의 4275개의 세포를 15 μl의 FACS 완충액 중에서 400 ng/ml Cy5 염소 항-인간 IgG(JIR, 카달로그 #109-176-098)와 혼합한 후, 15 μl의 하이브리도마 상등액과 함께 3시간 동안 실온에서 항온 배양하였다. 양성 대조군 항체는 항-hErbB2(2C4)이었고, 이를 SA-Cy5(JIR 카달로그 #016-170-084, 350 ng/ml)와 조합하여 Cy5 염소 항-마우스 IgG 감마(JIR, 카달로그 #115-176-071) 또는 염소 항-마우스 IgG-Biot(서던 바이오테크놀로지(Southern Biotechnology)/SB 카달로그 #1030-08, 400 ng/ml)로 검출하였다. 항-KLH G1 항체(Gmix, 인-하우스)를 아이소타입 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem) 제의 FMAT 8100 HTS 시스템에서 판독하였다. 데이터 분석 후에 형광 신호 및 계수 모두를 결정하였고, ErbB2-양성 세포에는 결합하나 음성 세포에는 결합하지 않음을 나타낸 362개 양성 하이브리도마를 동정하였다.

<418>

FMAT 스크리닝에서의 362개의 양성 상등액을 두 세트(한 세트는 hIgG 중쇄 검출을 위한 것이고, 다른 세트는 인간 Ig 카파 경쇄 검출을 위한 것임)에서 FACS에 의해 추가 스크리닝하여, 양자 모두 Ig 감마 사슬 및 Ig 카파 사슬 모두에 대한 완전 인간 조성물을 입증하였다. 2.5×10³개의 B300.19/hErbB2 세포 또는 B300.19 모 세포를 FACS 완충액에서 1:2로 희석된 하이브리도마 상등액과 함께 1시간 동안 4°C에서 항온 배양한 후, PBS로 세정하였다. 이어서, 세포를 Ig 감마 검출을 위해 1시간 동안 4°C에서 염소 항-인간 감마 Cy5와 함께 항온 배양하였고, Ig 카파 검출을 위해 1시간 동안 4°C에서 염소 항-인간 카파 PE(SB 카달로그 #2063-09)와 함께 항온 배양하였다. 세정 후, 세포를 FACS 분석 전에 1% 파라포름알데히드/PBS에 고정하였다. 검정법에서 1:50 희석율의 플러깅된 혈청을 양성 대조군으로 사용한 반면, 1:10으로 희석된 Gmix(항-KLH IgG)를 음성 아이소타입 대조군으로 사용하였다. 양성 세포와 음성 세포의 기하학적 평균 값 사이의 비를 표로 작성하였고, 1.95 초과 비를 제공하는 하이브리도마를 히트(hit)로 간주하였다. 총 152개의 완전 인간 항-hErbB2 IgG/카파 항체를 본 스크리닝에서 확인하였다.

<419>

실시예 4

<420>

MCF7 세포 내 헤레굴린-β 유도 ERBB2 인산화의 억제

<421>

ErbB2는 다른 ErbB 계열 구성원, 예컨대 ErbB3과의 이량체화를 통해 활성화할 때 인산화된 티로신이다. ErbB3에 대한 헤레굴린-β 결합은 ErbB2 및 ErbB3 모두를 발현하는 인간 유방 아테노암종 MCF7 세포에서 ErbB2 티로신 인산화를 유도할 수 있다. ErbB2 활성화를 차단하는 항체를 동정하기 위해, 본 발명자들은 세포-기재 ErbB2 인산화 검정법에서 152 인간 ErbB2-결합 항체를 스크리닝하였다.

<422>

MCF7 세포를 96-웰 플레이트에서 25,000개 세포/웰로 씨딩하고, 하룻밤 동안 완전 성장 배지(10% FCS)에서 배양하였다. 그 다음 날, 세포 배양 플레이트를 PBS로 1회 세정하였고, 배양 배지를 무-페놀 레드 및 무-혈청 배지로 교체하였다. 세포를 하룻밤 동안 혈청-기아한 후, 25 μl의 무-페놀 레드 배지와 혼합된 25 μl의 하이브리도마 상등액과 함께 1시간 동안 항온 배양한 후, 10분 동안 10 nM 헤레굴린-β로 처리하였다. 대안적으로, 세포를 혈청-기아하지 않았으나, 헤레굴린-β 처리 전에 하이브리도마 상등액과 함께 하룻밤(~24시간) 동안 항온 배양하였다.

<423>

세포 용해물을 제조한 후, 세포를 빙냉 PBS로 2회 세정하고, 100 μl/웰의 용해 완충액(50 mM 트리스(Tris)-HCl(pH 7.7), 1% 트릭스톤(Trixton) X-100, 10% 글리세롤, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 40 ug/ml PMSF, 1 uM 펙스타틴, 0.5 ug/ml 류펩틴, 10 ug/ml 대두 트립신 억제제, 0.2 mM NaVO₄, 1 mM NaMoO₄, 5 mM b-글리세로포스페이트)과 함께 4°C에서 30분 동안 항온 배양하였다. 제공된 프로토콜에 따라, R&D 시스템 제의 인간 인산화-ErbB2 ELISA 키트, 인간 인산화-ErbB2 듀오세트(DuoSet) IC, 카달로그 #DYC 1768)를 이용하여 인산화-ErbB2 수준을 측정하였다. 항체의 부재 하에 헤레굴린-자극 세포 및 비자극 세포 내 pErbB2의 수준에 기초하여

억제율 %을 계산하였다.

<424> 도 1은 1시간 동안 대(vs.) 24시간 하룻밤 동안 MCF7 세포와 함께 예비-항은 배양할 때 시험한 152개의 항체 중 성화 활성의 상관을 도시한다. 152개 항체 중 51개가, 세포를 1시간 동안 상등액과 예비-항은 배양했을 때 30% 초과 억제율을 나타냈다. 이 항체는 ErbB3으로 ErbB2의 이량체화를 차단함으로써 ErbB2 인산화를 억제하기 쉽다. 상당히 더 많은 항체들이, 세포를 하룻밤 동안 하이브리도마 상등액과 예비-항은 배양하였을 때 30% 초과 억제율을 나타냈다. 이들 중 일부는 ErbB2 하향-제어를 유도하는 것과 같은 다른 기작에 의해 그러한 결과를 나타낼 수 있다.

<425> 실시예 5

<426> 사이노 ERBB2에 대한 교차-반응성의 결정

<427> 인간 이외의 영장류 사이노물거스 ErbB2에 대한 상기 항체의 중 교차-반응성을 결정하기 위해, 사이노물거스 ErbB2를 발현하는 CHO-K1 세포를 생성시켰다. 간략히, 사이노(cyno) ErbB2 cDNA를 사이노물거스 난소 조직으로부터 유래시켜, HindIII 및 XbaI 제한 엔도뉴클레아제 부위를 통해 pCR3.1 발현 벡터로 클로닝하였다. 발현 벡터인 3767 bps의 삽입부를 포함하는 사이노-ErbB2(FL)/pCr3.1을 제공된 프로토콜에 따라 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000(인비트로젠, 카달로그 #11668)을 이용하여 CHO-K1 세포에 형질감염시켰다. 사이노-ErbB2를 발현하는 CHO-K1의 안정한 클론을 1 mg/ml의 G418의 존재 하에 선택하였다. 마우스 항-인간 c-ErbB2/c-neu(Ab-2)(온코젠(Oncogene), 카달로그 #OP14) 및 염소 항-마우스 IgG-PE(칼텍, 카달로그 #M30004-4)를 이용하여 FACS에 의해 발현을 확인하였다.

<428> CHO-K1/사이노 E4rbB2 클론 #4를 사용하여, 인간 ErbB2-결합 항체의 교차 반응성을 측정하였다. CHO-K1/사이노 모 CHO-K1 또는 ErbB2 클론 #4의 200,000개의 세포를 1시간 동안 4°C에서 1:2로 희석된 하이브리도마 상등액 또는 2 µg/ml 양성 대조군 항체 Ab-2(온코젠, 카달로그 #OP14)과 함께 항은 배양하였다. 세포를 PBS로 1회 세정 한 후, 1시간 동안 4°C에서 2차 검출 항체인 5 µg/ml의 염소 항-인간 IgG Cy5 또는 염소 항-마우스 IgG Cy5와 함께 항은 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세정하였고, 1% 파라포름알데히드/PBS에 고정 한 후, FACS에 의해 분석하였다. 각 염색에 대해, 양성 세포와 음성 세포의 기하학적 평균 값 사이의 비를 표로 작성하였고, 1.95 초과 비를 양성으로 간주하였다. 8개의 항체가 사이노 ErbB2와 교차 반응하지 않는 것으로 나타났고, 이를 이후 분석에서 배제하였다.

<429> 실시예 6

<430> 고 항원 및 제한 항원 ELISA

<431> 하룻밤 동안 1시간 동안 세포와 항은 배양하였을 때, 사이노 ErbB2 교차 반응성을 나타내고 또한 ErbB2 인산화의 >30% 억제율을 보인 113개의 항-ErbB2 항체를 추가로 높은 항원(HA) 및 제한 항원(LA) ELISA에 의해 특징 분석하였다.

<432> HA ELISA는 플레이트 상에 코팅된 높은 농도의 항원으로 수행되고, 농도-의존성 반응이며; 한편 LA ELISA는 플레이트 상에 코팅된 제한된 양의 항원으로 수행되고, 따라서 이는 친화도 의존성 반응이다. HA/LA 분석으로부터 항체의 상대적 친화도 등급이 달성되었다.

<433> 재조합 인간 ErbB2 ECD-Fc γ 1 융합 단백질이 이 목적을 위해 사용될 수 없기 때문에, 인간 ErbB2 ECD-myc/His 융합 단백질을 인-하우스로 생성시켰다. 인간 ErbB2/ECD cDNA를 A431 세포로부터 유래시켜, NheI 및 XhoI 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 통해 pSecTag2Hygro 발현 벡터(인비트로젠, 카달로그 #V910-20)에 클로닝하였다. 발현 벡터인 huErbB2(ECD)/pSecTag2BHygro는 ErbB2(ECD) 단독에 대한 1956 bp의 삽입부 크기 및 hErbB2(ECD) 및 c-myc/His 택에 대한 2034 bp의 삽입부 크기를 포함하였다. 293펙틴(293fectin)(인비트로젠 카달로그 #12347-019)을 이용하여 플라스미드를 293T 현탁액 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 형질감염 1일 후에 부티르산나트륨으로 처리하여, 발현 수준을 증폭시켰다. 형질감염 후 4일째에, 정제 전에 상등액을 ErbB2(ECD) 발현으로 처리하였다. ELISA 검출을 위해, 1 µg/ml의 염소 항-ErbB2(R&D 시스템, 카달로그 #AF1129)를 사용하여 플레이트를 코팅하였고, 1 µg/ml의 마우스 항-ErbB2(R&D 시스템, 카달로그 #MAB 1129)가 1차 검출 항체였고, 2차 항체는 염소 항-마우스 IgG-HRP(칼텍, 카달로그 #M30107)였다. 상등액을 수집하고, 5배로 농축한 후, 하룻밤 동안 투석 완충액(50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 200 mM NaCl)으로 투석하였다. 이미다졸을 5 mM의 최종 농도가 되도록 상등액에 첨가하였고, 상등액을 실온에서 3시간 동안 1/100 체적의 Ni-NTA 수퍼플루오레진 혼합물(키아젠, 카달로그 #30430)과 함께 항은 배양하였다. 수지를 50 mM NaHPO₄, 300 mM NaCl 및 20 mM 이

미다졸을 함유하는 완충액으로 세정한 후, 250 mM 이미다졸, 50 mM NaHPO₄ 및 300 mM NaCl을 함유하는 용출 완충액으로 세정하였다. 정제된 단백질을 PBS로 최종 투석하여 활성을 보존하였다. 정제된 단백질 huErbB2(ECD)/c-myc-His는 655개의 아미노산을 가지고, 이론적 MW는 72.2 kDa이며, 4 내지 20% 트리스-글리신 SDS-PAGE 겔 상에 약 100 kDa 수행된다. 단백질 동일성을 마우스 단클론성 항-ErbB2(R&D 시스템, 카달로그 #MAB1129)를 이용한 후, 2차 염소 항-마우스 IgG-HRP(칼텍, 카달로그 #M30107)를 이용하여 웨스턴 블롯에 의해 확인하였다.

<434> HA에 대해서는, PBS 중 10 µg/ml 인간 ErbB2 ECD-myc/His를 하룻밤 동안 4°C에서 ELISA 플레이트에 코팅하였다. LA에 대해서는, 100, 500, 250, 125, 62 및 31 ng/ml의 인간 ErbB2 ECD-myc/His를 코팅하였다. 항원으로 코팅된 플레이트를 3회 세정하고, 실온에서 적어도 30분 동안 1% 무지방 탈지유로 블로킹한 후, 3회 다시 세정하였다. 각 하이브리도마 세포주 샘플을 1:25 희석율로부터 출발하여 7개 점에 대해 1% 무지방 탈지유/PBS 1:3으로 적정하였다. 일련 희석된 하이브리도마 샘플 또는 대조군(헤르셉틴[®])을 HA로 코팅된 플레이트로 옮겼고, 1:25로 희석된 하이브리도마 샘플을 LA로 코팅된 플레이트로 옮겼다. 샘플을 18.5시간 동안 하룻밤 동안 실온에서 플레이트 상에 항온 배양하였다. 그 다음 날, 플레이트를 3회 세정하였고, 실온에서 1시간 동안 50 µl의 400 ng/ml 이뮤노퓨어 염소 항-인간 IgG(Fc)-HRP(피어스(Pierce) 카달로그 #31416)와 함께 항온 배양하였다. 이어서, 플레이트를 심의 세정하고, 종이 타월에 두드려 건조시켜, 웰 내 잔류 HRP를 제거하였다. HRP 기질 TMB(증진된 K-블루 TMB, 네오젠(Neogen) 카달로그 #308177)를 각 웰에 첨가하였고, 30분 동안 항온 배양하였다. 1 N HCl을 첨가하여 반응을 중지하였다. 450 nm에서의 광학 밀도를 마이크로플레이트 리더(티터텍 멀티스칸 어센트(Titertek Multiskan Ascent))에서 판독하였다.

<435> ELISA에서 HA 중의 기지 농도의 헤르셉틴[®]으로 생성된 표준 곡선으로부터 상등액 내 하이브리도마 ErbB2-특이적 항체의 농도를 유도하였다. 도 2에 나와 있는 바와 같이, 31 ng/ml 항원에서의 LA OD 신호를 각 하이브리도마 샘플에 대해 HA로부터의 항체 농도에 대해 플로팅하였다. 이 플롯에서 하단 우측 코너에 있는 항체에 비해 상단 좌측 코너에 있는 항체가 비교적 높은 친화도를 가진다.

<436> 실시예 7

<437> 하이브리도마 클로닝

<438> 사이노 교차 반응성 시험, ErbB2 인산화 억제 검정 및 LA/HA ELISA로부터의 데이터에 기초하여, 31개 하이브리도마 세포주를 각 클로닝을 위해 선택하였다. 이들의 활성이 표 3에 요약되어 있다.

<439> [표 3] 클로닝을 위해 선택된 하이브리도마 세포주의 예비 특성화 데이터

<440>

| 세포주 ID | 1시간 pTyr 억제율% | 24시간 pTyr 억제율% | 사이노 교차 반응성 | HA 평균(ug/ml) | 31 ug/ml에서의 LA |
|--------|---------------|----------------|------------|--------------|----------------|
| 1*14 | 103 | 100 | 있음 | 7.27 | 3.99 |
| 1*15 | 86 | 100 | 있음 | 0.61 | 2.31 |
| 1*18 | 85 | 96 | 있음 | 1.22 | 3.03 |
| 1*20 | 91 | 96 | 있음 | 1.5 | 2.84 |
| 1*22 | 84 | 95 | 있음 | 1.06 | 1.61 |
| 1*37 | 96 | 96 | 있음 | 1.3 | 3.33 |
| 1*39 | 82 | 99 | 있음 | 0.68 | 2.57 |
| 1*62 | 82 | 98 | 있음 | 0.51 | 2.8 |
| 1*96 | 97 | 99 | 있음 | 6.48 | 4.6 |
| 1*99 | 97 | 99 | 있음 | 6.18 | 4.05 |
| 1*100 | 95 | 95 | 있음 | 2.85 | 3.54 |
| 1*108 | 90 | 100 | 있음 | 4.41 | 2.64 |
| 1*124 | 94 | 97 | 있음 | 2.86 | 3.42 |
| 1*128 | 96 | 98 | 있음 | 5.86 | 3.83 |
| 1*140 | 97 | 97 | 있음 | 4.39 | 3.54 |
| 1*148 | 96 | 97 | 있음 | 3.29 | 3.35 |
| 1*149 | 83 | 89 | 있음 | 0.43 | 1.54 |
| 1*19 | 73 | 97 | 있음 | 0.4 | 1.77 |

| | | | | | |
|-------|----|-----|----|------|------|
| 1*24 | 77 | 99 | 있음 | 1.77 | 2.35 |
| 1*33 | 73 | 101 | 있음 | 0.9 | 2.07 |
| 1*41 | 26 | 86 | 있음 | 1.3 | 3.2 |
| 1*43 | 43 | 82 | 있음 | 1.3 | 3.57 |
| 1*44 | 78 | 98 | 있음 | 3.64 | 2.38 |
| 1*69 | 57 | 72 | 있음 | 0.34 | 1.6 |
| 1*71 | 27 | 65 | 있음 | 3.1 | 2.62 |
| 1*74 | 66 | 90 | 있음 | 0.20 | 1.22 |
| 1*79 | 71 | 93 | 있음 | 0.26 | 1.77 |
| 1*95 | 58 | 95 | 있음 | 0.23 | 1.14 |
| 1*104 | 21 | 73 | 있음 | 1.7 | 2.36 |
| 1*107 | 57 | 82 | 있음 | 0.25 | 1.15 |
| 1*111 | 78 | 98 | 있음 | 0.77 | 1.97 |

- <441> 각 하이브리도마 세포주 내의 세포를 FACS 아리아(Aria)(BD)에서 1 세포/웰로 96-웰 플레이트에 분류하여, 약 2 주 동안 배양하였다. 단일 클론으로부터의 상등액을 높은 수준의 ErbB2을 발현하는 BT474 세포 상에서 FMAT에 의해 ErbB2-결합 활성에 대해, 또한 ELISA에 의해 인간 IgM 및 마우스 IgM의 존재뿐만 아니라, 인간 Ig 감마 및 카파 사슬 조성물에 대해 스크리닝하였다.
- <442> FMAT을 위해, 384개 웰 FMAT 플레이트에서의 40 μ l FACS 완충액 내 6000개의 BT474 세포(ATCC)를 실온에서 2시간 동안 15 μ l의 상등액과 함께 항온 배양한 후, 실온에서 6시간 동안 10 μ l의 4.5 μ g/ml 염소-항-인간 IgG Cy5와 함께 항온 배양한 후, FMAT 기계 8200에서 판독하였다. 형광도 및 계수 데이터 모두를 분석하였다. 헤르셉틴[®]이 스크리닝에서 양성 대조군으로 사용되었다.
- <443> 인간 항체 사슬 조성물 분석을 위해, 배지 결합 96-웰 플레이트(코스타르(Costar) 3368)을 4°C에서 하룻밤 동안 PBS 중 2 μ g/ml 염소 항-인간 IgG Fc로 코팅하고, 실온에서 30분 동안 1% 모유/PBS로 블로킹하였다. 상등액을 1% 모유/PBS 중 1:5로 희석하였고, 2개의 코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 1% 모유/PBS 중 250 ng/ml의 비오틴화 염소 항-인간 카파(벡터 카탈로그 #BA3060) 또는 1% 모유/PBS 내 250 ng/ml의 비오틴화 염소 항-인간 람다(서던 바이오테크 카탈로그 #2070-08)를 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양한 후, 실온에서 1시간 동안 1% 모유/PBS 중 1 μ g/ml의 스트렙타비딘 퍼옥시다제 접합체와 함께 항온 배양하였다. 플레이트를 항온 배양 단계 사이에 심의 세정하였다. 50 μ l의 퍼옥시다제 기질 TMB를 첨가하여, 실온에서 30분 동안 항온 배양하였고, 효소 반응을 50 μ l의 1 M HCl로 퀸칭하였다. 450 nm에서의 광학 밀도를 마이크로플레이트 리더(티터텍 멀티스칸 어센트)에서 판독하였다.
- <444> 본 발명자들은 이하와 같이 인간 IgM의 부재를 확인하였다. 배지 결합 96-웰 플레이트(코스타르 3368)를 하룻밤 동안 4°C에서 PBS 중 1 μ g/ml 염소 항-인간 IgM으로 코팅하고, 실온에서 30분 동안 1% 모유/PBS로 블로킹하였다. 상등액을 1% 모유/PBS 중 1:5로 희석하였고, 코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 1% 모유/PBS 중 666 ng/ml의 당나귀 항-인간 IgM POD(애큐리트 케미칼 (Accurate Chemical) 카탈로그 #JNH035043)를 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 상기 기재된 바와 같이 POD 기질을 첨가함으로써 플레이트를 개발하였다.
- <445> 본 발명자들은 이하와 같이 인간 IgM의 부재를 확인하였다. 배지 결합 96-웰 플레이트를 하룻밤 동안 4°C에서 PBS 중 1 μ g/ml 염소 항-마우스 람다(서던 바이오테크 1060-01)로 코팅하고, 실온에서 30분 동안 1% 모유/PBS로 블로킹하였다. 상등액을 1% 모유/PBS 중 1:5로 희석하였고, 코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 1% 모유/PBS 중 400 ng/ml의 염소 항-인간 IgG(Fc) POD(피어스 카탈로그 #31413)를 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 상기 기재된 바와 같이 POD 기질을 첨가함으로써 플레이트를 개발하였다.
- <446> 상기 기재된 ELISA에서, 일차 항체가 없는 웰로부터의 신호를 배경으로 사용하였고, 배경 대비 3배인 신호를 제공하는 샘플을 양성으로 간주하였다.
- <447> FMAT에 의해 ErbB2에 대한 천연 결합을 나타냈고 ELISA에 의해 인간 감마 사슬 및 카파 사슬에 대해 양성인 단 클론성 항체를, 클로닝 후에 20개의 하이브리도마 세포주로부터 유래시켰다. 각 모 세포주로부터의 3개의 서브클론을 시퀀싱하였다. 달리 지시되지 않는 한, 3개 모두의 서브클론이 동일하였다. 예를 들어, 모 클론 1.14의

서브클론 1.14.1, 1.14.2 및 1.14.3 모두는 동일한 서열을 가졌고, 2개-번호 모 이름 또는 3개-번호 서브클론 이름과 상호 혼용되어 지칭된다. 11개의 특유의 단클론성 항체를 동정하여, 세포-기재 작용성 검증으로 추가 특 징화하였다.

<448>

실시예 8

<449>

ERBB2 단클론성 항체의 구조적 분석

<450>

항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 시퀀싱하였다. 항-ErbB2 항체에 대한 완전 서열 정보가 각 감마 및 카파 사슬 조합에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 있는 서열 목록에 제공되어 있다. 면역글로불린 사슬의 가변 (V) 영역을 B-세포 개체발생 중에 작용성 가변 영역(V_HD_H 또는 V_KJ_K)에 결합된 다중 배선 DNA 세그먼트에 의해 코딩된다. 가변 중쇄를 분석하여, V_H 계열, D-영역 서열 및 J-영역 서열을 결정하였다. 이어서, 서열을 번역하여, 1차 아미노산 서열을 결정하였고, 배선 V_H, D 및 J-영역 서열과 비교하여 체세포 초돌연변이를 평가하였다. 중 가변 경쇄 서열을 유사하게 분석하였다.

<451>

표 4 및 표 4(a)는 항체 중쇄 영역을 그것의 동족 배선 중쇄 영역과 비교하는 표이다. 표 5은 항체 카파 경쇄 영역을 그것의 동족 배선 경쇄 영역과 비교하는 표이다. 표 4와 표 4(a) 사이의 차이는 중쇄 CDR1를 정의하는 데 사용되는 정의이다. 표 4(a)에 개시된 중쇄 CDR1은 카바트(Kabat) 정의의 것이다. 대안적으로, CDR1은 표 4에 나와 있는 바와 같은 FR1 서열의 마지막 4개 잔기를 포함하도록 하기 위한 대안적 정의를 이용하여 정의될 수 있다.

<452>

ErbB2에 대해 특이적인 20개의 개별 항체의 분석은, 이들 중 몇가지가 동일하고, 단지 11개의 특유의 단클론성 항체만이 클로닝에서 비롯된 것이고, 11개 항체들 중 8개가 서열이 매우 유사하며, 동일한 배선 V_H 및 V_K 유전 자로부터 비롯된 것이다.

<453>

또한 한 특정 항체가 아미노산 수준에서 각각의 배선 서열과 상이할 경우, 항체 서열이 배선 서열로 다시 돌연 변이화될 수 있음을 인식해야 한다. 그러한 교정 돌연변이가 표준 분자 생물학적 기법을 이용하여 돌연변이화된 위치들 중 임의의 위치 중 1개, 2개, 3개 이상의 위치 또는 이들의 조합 위치에서 일어날 수 있다. 비제한적 예로서, 표 4는 1.24.3의 중쇄 서열이 아미노산 33에서 상응하는 배선 서열과 CDR1 영역에서 T가 S로 되어 있다는 점에서 상이함을 보여준다. 따라서, 1.24.3의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 T가 S로 바뀌도록 변형되어, 돌연변이의 부위에 배선 서열을 생성시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 1.140.1의 중쇄 서열은 아미노산 42에서 상응하는 배선 서열과 FR2 영역에서 R가 G로 되어 있다는 점에서 상이함을 보여준다. 따라서, 1.140.1의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 R이 G로 바뀌도록 변형되어, 돌연변이의 부위에 배선 서열을 생성시킬 수 있다.

<454>

또 다른 비제한적 예로서, 표 5은 1.140.1의 경쇄 서열이 상응하는 배선 서열과, FR1 영역에서의 T에서 N으로의 돌연변이(돌연변이 1), CDR1 영역에서의 F에서 L으로, F에서 Y로, 또한 C에서 Y로의 돌연변이(돌연변이 2, 3 및 4), FR2 영역에서의 R에서 K로, 또한 N에서 K로의 돌연변이(돌연변이 5 및 6), CDR3 영역에서 F에서 Y로, G에서 S로, 또한 S에서 T로의 돌연변이에 의해 상이함을 보여준다. 따라서, 1.140.1의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 돌연변이 1이 바뀌도록 변형되어, 돌연변이 1의 부위에서 배선 서열을 생성시키도록 할 수 있다. 또한, 1.140.1의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 돌연변이 2가 바뀌도록 변형되어, 돌연변이 2의 부위에서 배선 서열을 생성시키도록 할 수 있다. 또한, 1.140.1의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 돌연변이 3이 바뀌도록 변형되어, 돌연변이 3의 부위에서 배선 서열을 생성시키도록 할 수 있다. 또한, 1.140.1의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산은 돌연변이 1, 돌연변이 2, 돌연변이 3, 돌연변이 4, 돌연변이 5 및 돌연변이 6이 바뀌도록 변형되어, 이들에서 배선 서열을 생성시키도록 할 수 있다. 하기 표 6은 1.140에 대한 배선으로부터의 상기 변이의 위치를 설명한다. 각 행은 굵은 체로 나타낸 위치에서의 배선 잔기 및 비-배선 잔기의 특유의 조합을 나타낸다. 표 6은 또한 항체 1.39에 대한 경쇄 분석이 배선 돌연변이에 대해 1.140과 동일하기 때문에, 항체 1.39에도 적용된다. 또한, 항체 1.96에 대한 경쇄 분석은 배선 돌연변이에 대해 1.140과 동일하나, 예외적으로 항체 1.96은 FR4에서 항체 서열 및 배선 서열 사이에 차이가 있다. 이 예에서, 항체 서열의 L은 F의 배선 서열로 다시 돌연변이화될 수 있고, 이 돌연변이는 표 6에 나와 있는 조합들 중 임의의 조합과 조합될 수 있다.

<455>

한 실시양태에서, 본 발명은 CDR 영역, 즉, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에서의 아미노산들 중 하나 이상을 변형시키는 것을 특징으로 한다. 한 예에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄, 경쇄 또는 양자 모두의 CDR3이 변형된다. 전형적으로, 아미노산은 유사한 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환되거나(보존적 아미노산 치환), 배선으로 다시 치

환되거나, 알려진 또는 루이신과 같은 임의의 적절한 아미노산으로 치환될 수 있다. 한 실시양태에서, 1.24.3 CDR3, QQYSSPFT(서열번호 48)는 하나 이상의 아미노산에서, 예를 들어 CDR3 서열의 돌연변이화에 의해 QQYSSPFT(서열번호 49)로 다시 변형될 수 있다.

<456> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 쌍을 이루지 않은 시스테인을 제거하도록 항체를 변형시키는 것을 특징으로 한다. 쌍을 이루지 않은 시스테인의 예가 항체 1.39.1에서는 아미노산 38에, 항체 1.96.1에서는 아미노산 38에서, 또한 항체 1.140.1에서는 아미노산 38에서 나타난다. 이 시스테인은, 예를 들어 C를 Y로 돌연변이화하거나, C를 세린과 같은 임의의 적절한 아미노산으로 돌연변이화함으로써 배선으로 다시 돌연변이화될 수 있다.

<457> [표 4] 중쇄 분석

| 쇄 명칭 | 서열 번호 | V | D | J | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|------|---------|--------|-------|------|------------------------------|------------|----------------|---------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | 54 | 배선 | | | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 14 | VH3-21 | D5-24 | JH4B | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.18.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.20.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.19 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.24.3 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.22.2 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.71.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.39.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.96.2 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.99 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.104 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.107 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.128 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.100.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.140.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.124 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.148 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | GDDGYNY YFPDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.43.1 | 배선 | | | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.41 | VH3-7 | D5-24 | JH6B | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 1.22.1 | " | " | " | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS | GFPTSSYSMN | WVRQAPGKGLHWVS | SISSSSSYIY YADSVKG | RFTISRDNANKNSLYLQW NSLRAEDPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 59 | 배선 | | | QVQLVQSGEGLVIVQPSQTLSLTCTVVS | GGSTISMS | WIRQHPGKGLHWIG | YIYSSGGSYIY NPISLKS | RVTLSVDTSKNQPSLKL SSVTAADPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |
| | 2 | VH4-31 | D3-10 | JH6B | QVQLVQSGEGLVIVQPSQTLSLTCTVVS | GGSTISMS | WIRQHPGKGLHWIG | YIYSSGGSYIY NPISLKS | RVTLSVDTSKNQPSLKL SSVTAADPTAVYYCAR | ##DGYNY #YFDY | WGQGTLL VTVSS |

<458>

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------|----|--------|-------|------|---------------------------------|---------------|-------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------|
| | 56 | 배신 | | | EVQIVSSGGGIIVQ PGSIRLISCAS | GPFS SYDMH | WROANG KGLEWVS | AIGTADPIY PGSVKQ | RPTSRERAKNSLYLQM NSLRAGDTAVYYCAR | #QYSS## YTYGMD V | WGQTT VTVSS |
| 1. 71. 2 = 1. 71. 3 | 42 | VH3-13 | D6-19 | JHGB | EVQIVSSGGGIIVQ PGSIRLISCCTAS | GPFS SYDMH | WROANG KGLEWVS | AIGTADPIY PGSVKQ | RPTSRERAKNSLYLQM NSLRAGDTAVYYCAR | EGYSSGR YFYXGMD V | WGQTT VTVSS |

[표 4a] 이 륙 판 지

| 세 명칭 | 시열 번호 | V | D | J | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|-----------------------------------------------|----------|--------|-------|------|----------------------------------------|--------|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------|-----------------|
| | 54 | 배신 | | | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | #DGYNY #YFDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.14.1 | 14 | VH3-21 | DS-24 | JH4B | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.18.1 | 26 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLSARDTAVYSCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.20.1 =1.19 | 30 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLSARDTAVYSCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.24.3 =1.22.2 =1.71.1 | 18 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.39.1 | 22 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.96.2 =1.99 =1.104 =1.107 =1.128 | 34 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |
| 1.100.1 | 38 | " | " | " | EYQIYESGGGLVK PGGSLRLSCAASG FTFS | SYSTEM | WVROAPG KGLEWVS | SISSSSSYTY YADSVKQ | RFTISRDNKNSIYLQM NSLRARADTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WQGGTL VTVSS |

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----|----|-------|------|------------------------------------------|------------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1.140.1 =1.124 =1.148 | 6 | " | " | " | EVOLVESGGGLVQ PGSLRLSCAASG FTPS | SYSMN | WVRQAPR KGLEWYS | SISSSSSYY YADSVKQ | RFTISRDNANKSLYLQW NSLRAEDTAVYYCAR | GGDGYNY YFPDY | WGQGTI VTVSS |
| | | | | | | | | | | | |
| 1.43.1 =1.41 =1.22.1 | 10 | 배선 | D5-24 | JH6B | EVOLVESGGGLVQ PGSLRLSCAASG FTPS | SYWMH | WVRQTPG KGLEWVA | NIKQDGSSEKI YDPSVKQ | RFTISRDNANKSLYLQW NSLRAEDTAVYYCAS | FRDYGM V | WGQGTI VTVSS |
| | | | | | | | | | | | |
| 1.44.1 | 2 | 배선 | D3-10 | JH6B | QVQLQESGGGLVQ PSQTLISLTCTVSA GISIS | SGGY MS | WVRQHPG KGLEWVG | YIYYSGGSTYY NPSIKS | RFTISVDTSKNPFSLK SSVTAADTAVYYCAR | EGPITIV KGVYY YGM YGM | WGQGTI VTVSS |
| | | | | | | | | | | | |
| 1.71.2 =1.71.3 | 42 | 배선 | D6-19 | JH6B | EVOLVESGGGLVQ PGSLRLSCAASG FTPS | SYDMH | WVRQATG KGLEWVS | ALGTAADPTFY PGSVKQ | RFTISRDNANKSLYLQW NSLRAEDTAVYYCAR | EGISSGR YFYGM V | WGQGTI VTVSS |
| | | | | | | | | | | | |

| 세 명칭 | 서열 번호 | V | J | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|-----------------------------------------------|-------|----|--------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|---------|------------------------------------------|------------|------------|
| | 51 | 배선 | | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVLSSNNKNY LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYYSSTPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.14.1 | 8 | B3 | JK3 (YK4) | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LT | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTINML QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.18.1 | 28 | " | " | DIWMTQSP GSLVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ SPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.20.1 =1.19 | 32 | " | " | DIWMTQSP GSLVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ SPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.24.3 =1.22.2 =1.71.1 | 40 | " | " | DIWMTQSP DSLAVSLD ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYSSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.39.1 | 36 | " | " | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.96.2 =1.99 =1.104 =1.107 =1.128 | 24 | " | " | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.100.1 | 20 | " | " | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |
| 1.140.1 =1.124 =1.148 | 8 | " | " | DIWMTQSP DSLAVSLG ERATITC | KSSQSVFPRSNKNK LA | WYQQRPGQ PPMLLY | MASTRBS | GVDDRFSGSGS GTDFTLTISL QAEDVAVYYC | QQYFGSPPT | FGPGTKVDIK |

각 표의 [세 명칭]

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----|----|--------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|---------|-----------------------------------------|-----------|-------------|
| 1.43.1 =1.41 =1.22.1 | 50 | 배선 | | DIQMTQSP SSLSASVG DRVTTTC | RASQGTSMNYLA | WFQKPGK APKSLIY | AASLQGS | GVPRFSGSGS GDFPILKISRL QPEDPASYTC | QQYKGYPII | FGQGTRELEIK |
| | 12 | L1 | JK5 (VK1) | DIQMTQSP SSLSASVG DRVTTTC | RASQGTSMNYLA | WFQKPGK APKSLIY | GASSLQI | GVPRFSGSGS GDFPILKISRL QPEDPASYTC | QYKGYPII | FGQGTRELEIK |
| 1.44.1 | 4 | A2 | JK1 (VK2) | DIQMTQTP LSLSVTPG QPASISIC | KSSQSLIHSDDGNTYI | WYLQKPGQ PPQPLIY | EVSNRFS | GVDRFSGSGS GDFPILKISRV EADYGVYYC | MQSKQLPRI | FGQGTRELEIK |
| | | 배선 | | DVVMTQSP LSLVPYTLG QPASISIC | RSSQSLIYSDGNTYI | WFQKPGQ SPRRLIY | KVSNWDS | GVDRFSGSGS GDFPILKISRV EADYGVYYC | MQGTW#T | FGGQTKVEIK |
| 1.71.2 =1.71.3 | 44 | A1 | JK4 | DVVMTQSP LSLVPYTLG QPASISIC | RSSQSLIYSDGNTYI | WFQKPGQ SPRRLIY | KVSNWDS | GVDRFSGSGS GDFPILKISRV EADYGVYYC | MQGTWPLI | FGGQTKVEIK |

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 22 | 30 | 31 | 32 | 38 | 45 | 51 | 98 | 99 | 100 |
| N | V | L | Y | Y | R | N | Y | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | Y | G | S |
| N | V | L | Y | Y | R | N | Y | G | S |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |
| N | V | L | Y | Y | R | N | F | S | I |

<469>

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 22 | 30 | 31 | 32 | 38 | 45 | 51 | 98 | 99 | 100 |
| N | V | L | R | C | R | K | F | G | I |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| N | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |

<470>

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----|
| N | 22 | F | 30 | F | 31 | Y | 32 | Y | 38 | K | 45 | K | 51 | Y | 98 | S | 99 | S | 100 |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | S | S | S | I |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | K | K | K | K | Y | Y | G | G | S | S |

<481>

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----|
| N | 22 | F | 30 | F | 31 | Y | 32 | Y | 38 | R | 45 | R | 51 | F | 98 | G | 99 | S | 100 |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | N | Y | F | G | G | S | I |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |
| N | F | F | F | Y | Y | Y | Y | Y | Y | R | R | R | R | Y | Y | S | S | S | S |

<482>

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 22 | 30 | 31 | 32 | 38 | 45 | 51 | 98 | 99 | 100 |
| T | V | L | R | C | R | K | F | S | I |
| T | V | L | R | C | R | K | F | G | S |
| T | V | L | R | C | R | K | F | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | S | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |
| T | V | L | R | C | R | N | Y | G | S |

<487>

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 22 | 30 | 31 | 32 | 38 | 45 | 51 | 98 | 99 | 100 |
| T | V | L | R | Y | R | K | Y | G | I |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |
| T | V | L | R | Y | R | K | F | S | S |

<488>

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T | F | L | Y | C | K | K | F | S | S |
| T | F | L | Y | C | K | K | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | K | K | F | G | S |
| T | F | L | Y | C | K | K | F | G | S |
| T | F | L | Y | C | K | K | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | K | K | Y | S | S |
| T | F | L | Y | C | K | N | Y | S | I |
| T | F | L | Y | C | K | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | K | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | Y | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | G | S |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |
| T | F | L | Y | C | R | N | F | S | I |

<527>

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T | F | L | Y | Y | K | K | Y | G | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | Y | G | I |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | G | S |
| T | F | L | Y | Y | K | K | F | G | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |
| T | F | L | Y | Y | K | N | Y | S | S |

<528>

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22 | F | F | F | R | Y | R | N | E | G | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |
| T | E | E | R | R | Y | R | K | E | S | S |

<535>

<536>

실시예 9

<537>

ERBB2-저발현 MCF7 세포 내 헤레굴린- β 유도 ERBB2 인산화 및 세포 증식 억제

<538>

실시예 4에 기재된 바와 같이, 하이브리도마 상등액은 MCF7 세포 내 헤레굴린-유도 ErbB2 인산화를 억제할 수 있었다. 정제된 단클론성 항체를 이용하여, 2개의 억제성 항체 2C4 및 헤르셉틴[®]과 비교하여 ErbB2 항체의 강도를 결정하였다. 간략히, MCF7 세포를 96-웰 플레이트에서 20,000 세포/웰로 씨딩하여, 하룻밤 동안 완전 성장 배지(10% FCS)에서 배양하였다. 그 다음 날, 세포 배양 플레이트를 PBS로 1회 세정하였고, 배양 배지를 무-페놀 레드 및 무-혈청 배지로 치환하였다. 세포를 하룻밤 동안 혈청-기아시킨 후, mAb, 헤르셉틴[®] 또는 2C4(무-혈청 배지에서 1시간 동안 10 μ g/ml에서부터 1:5로 적정함)과 항온 배양한 후, 10분 동안 10 nM 헤레굴린- β 로 처리하였다. 세포 용해물을 실시예 4에 기재된 바대로 제조하였고, 제공된 프로토콜에 따라, RnD 시스템 제의 ELISA 키트(인간 인산화-ErbB2 듀오셋 IC, 카탈로그 #DYC1768)를 이용하여 인산화-ErbB2 수준을 측정하였다. 항체의 부재 하에 헤레굴린-자극 세포 및 비자극 세포 내 pErbB2의 수준에 기초하여, 억제율 %을 계산하였다. 용량 반응 곡선을 프리즘그래프패드(PrismGraphpad) 소프트웨어를 이용하여 플로팅하였다.

<539>

도 3은 대표적 실험으로부터의 용량 반응 곡선을 도시한다. EC50 값을 비선형 회귀 곡선으로부터 유도하였고, 이를 표 7에 나타냈다. 2C4는 ErbB2 인산화를 억제하였고, 한편 헤르셉틴[®]은 거의 효과를 가지지 않았다. 본 발명의 11개의 단클론성 항체 중 8개가 MCF7 세포에 있어 ErbB2 인산화에 대한 억제 활성을 나타냈다. 1.18.1은 2C4보다 양호한 강도를 가지는 것으로 보인다.

<540>

[표 7] MCF7 세포에서 헤레굴린-유도 ErbB2 인산화를 억제함에 있어서의 본 발명의 10개의 정제된 mAb의 강도

<541>

| mAb | EC50(ng/ml) n1 | EC50(ng/ml) n2 |
|-------------------|----------------|----------------|
| 2C4 | 43.6 | 14.6 |
| 헤르셉틴 [®] | >10,000 | >10,000 |
| 1.18.1 | 4.2 | 10.8 |
| 1.20.1 | 15.5 | 17.4 |

| | | |
|---------|---------|---------|
| 1.140.1 | 14.65 | 22.9 |
| 1.96.2 | 28.8 | 34 |
| 1.100.1 | 39.9 | 33.7 |
| 1.14.1 | 33.7 | 22.9 |
| 1.39.1 | 46.9 | 26.3 |
| 1.24.3 | 42.9 | 20.4 |
| 1.43.1 | >10,000 | >10,000 |
| 1.44.1 | >10,000 | >10,000 |
| 1.71.3 | >10,000 | 검출되지 않음 |

<542> 헤레굴린-유도 세포 증식에 대한 단클론성 항체의 효과도 또한 조사하였다. MCF7 세포를 10% FCS, Na-피루베이트, L-글루타민을 갖는 무-페놀 레드 DMEM 배지에서 96-웰 플레이트에 6000 세포/웰로 씨딩하여, 하룻밤 동안 37°C에서 성장시켰다. 그 다음 날, 세포를 냉 PBS로 1회 세정하였고, 배양 배지를 100 μ l의 FCS/무-페놀 레드 배지 + Na-피루베이트로 치환하였으며, 4시간 37°C에서 항온 배양하였다. 이어서, 무-FCS 배지를 제거하였고, 50 μ l의 적정된 mAb 및 50 μ l의 2 nM 헤레굴린- β 를 세포에 첨가하였다. 세포를 항체 및 헤레굴린과 함께 3일 동안 37°C에서 항온 배양한 후, 25 μ l의 셀티터-Glo(CellTiter-Glo) 발광 시약(프로메가(Promega, 카달로그 #G7570))을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 5분 동안 교반한 후, 10분 동안 실온에서 항온 배양하였다. 마이크로리터 플레이트 루미노미터(테칸 제니오스 프로(Tecan GENios Pro))에서 발광도를 관독하였다. 항체의 부재 하에 헤레굴린-자극 세포 및 비자극 세포 내 발광도 수준에 기초하여 억제율 %을 계산하였다.

<543> 도 4에 나와 있는 바와 같이, 용량 반응 곡선을 프리즘그래프패드 소프트웨어를 이용하여 각 항체에 대해 플로팅하였다. EC50 값을 비선형 회귀 곡선으로부터 유도하였고, 이를 표 8에 열거하였다. ErbB2 인산화 검정법에 나타난 바와 같이, ErbB2 인산화를 억제하는 데 효과적이었던 2C4 및 본 발명의 동일한 8개의 항체는 헤레굴린-유도 MCF7 세포 증식의 용량-의존성 억제를 나타낸 반면, ErbB2 인산화를 차단하는데 효과적이지 않은 헤르셉틴® 및 3개 항체는 그러하지 않았다.

<544> [표 8] 헤레굴린-유도 MCF7 세포 증식을 억제함에 있어서의 본 발명의 10개의 정제된 mAb의 강도 및 효능

| mAb | EC50(ng/ml) | 10 μ g/ml에서의 억제율 % |
|---------|-------------|------------------------|
| 2C4 | 404.5 | 90 |
| 헤르셉틴® | >10,000 | 39 |
| 1.18.1 | 414.8 | 94 |
| 1.20.1 | 770.1 | 100 |
| 1.140.1 | 633.3 | 91 |
| 1.96.2 | 2832 | 98 |
| 1.100.1 | 2043 | 95 |
| 1.14.1 | 640 | 96 |
| 1.39.1 | 479.3 | 89 |
| 1.24.3 | 3017 | 81 |
| 1.43.1 | ~10,000 | 53 |
| 1.44.1 | >10,000 | 18 |
| 1.71.3 | >10,000 | nd |

<546> **실시예 10**

<547> **BT474 및 SKBR3 세포의 증식의 억제**

<548> ErbB2-저발현 세포(MCF7)에 대해 효과적인 8개의 증성화 항체를 또한 4-일 세포 증식 검정법에서 ErbB2-고발현 세포를 억제하는 능력에 대해 조사하였다. 10% FCS를 갖는 50 μ l의 성장 배지 내 5천개의 세포(BT474 또는 SKBR3)를 96-웰 플레이트에서 씨딩하였고, 37°C에서 4시간 동안 항온 배양하여, 플레이트에 부착시켰다. 단클론성 항체를 40 μ g/ml로부터 출발하여 2×최종 농도로 성장 배지에서 1:5로 적정하였다. 50 μ l의 2C4, 헤르셉틴® 및 본 발명의 8개 항-ErbB2 mAb를 플레이트에 첨가하였고, 세포를 4일 동안 항체들과 함께 배양하였다. 25

μl의 셀티터-glo 시약을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 5분 동안 교반하고, 10분 동안 실온에서 항온 배양하였다. 마이크로티터 플레이트 루미노미터(테칸 제니오스 프로)에서 발광도를 판독하였다. 항체의 부재 하에 4일 및 0일째에 발광도 신호의 수준에 기초하여 억제율 %을 계산하였다. 용량 반응 곡선을 프리즘그래프패드 소프트웨어를 이용하여 각 항체에 대해 플로팅하였고, EC50 값을 비선형 회귀 곡선으로부터 유도하였다.

<549> 도 5 및 6은 대표적 실험으로부터의 데이터를 도시한다. EC50 및 최대 억제율 % 모두가 표 9 및 10에 열거되어 있다. 보고된 바와 같이, 헤르셉틴®은 BT474 및 SKBR3 세포 증식 모두에 대한 용량-의존성 억제를 나타낸 반면, 2C4은 거의 효과를 가지지 않았다. 시험한 본 발명의 단클론성 항체 모두는 헤르셉틴®에 필적할만한 강도와 함께 BT474 및 SKBR3 세포 증식의 용량-의존성 억제를 나타냈다.

<550> [표 9] BT474 세포 증식을 억제함에 있어서의 본 발명의 8개의 항체의 강도 및 효능

<551>

| Ab | N1 EC50 (ng/ml) | 40 μg/ml에서의 N1 억제율% | N2 EC50 (ng/ml) | 40 μg/ml에서의 N2 억제율% |
|---------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 헤르셉틴® | 144.8 | 61 | 81.8 | 57 |
| 2C4 | >40,000 | -9 | 4750.0 | 18 |
| hIgG1 | >40,000 | -2 | >40,000 | 10 |
| 1.96.2 | 131.3 | 35 | 66.3 | 29 |
| 1.20.1 | 85.3 | 40 | 12.8 | 37 |
| 1.140.1 | 299.8 | 39 | 70.9 | 45 |
| 1.18.1 | 38.1 | 34 | 28.2 | 39 |
| 1.100.1 | 169.4 | 35 | 91.1 | 32 |
| 1.24.3 | 198.3 | 24 | 74.4 | 29 |
| 1.14.1 | 135.7 | 38 | 63.0 | 39 |
| 1.39.1 | 156.4 | 29 | 42.3 | 40 |

<552> [표 10] SKBR3 세포 증식을 억제함에 있어서의 본 발명의 8개의 항체의 강도 및 효능

<553>

| Ab | EC50 (ng/ml) | 36 μg/ml에서의 억제율% |
|---------|--------------|------------------|
| 헤르셉틴® | 54.5 | 59 |
| 2C4 | >36,000 | 18 |
| hIgG1 | >36,000 | 2 |
| 1.96.2 | 41.7 | 43 |
| 1.20.1 | 25.2 | 49 |
| 1.140.1 | 42.7 | 44 |
| 1.18.1 | 26.3 | 46 |
| 1.100.1 | 61.3 | 54 |
| 1.24.3 | 48.5 | 37 |
| 1.14.1 | 35.7 | 52 |
| 1.39.1 | 68.9 | 41 |

<554> 실시예 11

<555> BT474 세포 내 ERBB2 인산화의 억제

<556> ErbB2-고발현 세포주에서의 상기 항체의 작용 기작을 확인하기 위해, 헤르셉틴® 및 2C4와 함께 본 발명의 항체의 1.18.1를 BT474 세포 내 구성적 ErbB2 인산화에 대한 효과에 관하여 시험하였다. BT474 세포를 1일째에 5000 개 세포/웰로, 2일째 및 3일째에 10000개 세포/웰로, 또는 4일째에 20000개 세포/웰로, 완전 배양 배지에서 96-웰 배양 플레이트로 씨딩하였다. 세포를 37°C에서 3 내지 4시간 동안 항온 배양하였고, 플레이트에 부착시켰다. 단클론성 항체를 6개 점에 대해 10 μg/ml로부터 출발하여 완전 배지에서 1:5로 적정한 후, 세포에 첨가하였다. 세포를 1 내지 4일 동안 단클론성 항체와 함께 항온 배양하였다. 5일째에, 세포를 전술된 바와 같은 프로테아제

및 포스파타제 억제제로 보충된 완충액에서 용해시켰다. 세포 용해물 내 인산화-ErbB2 수준을 ELISA에 의해 결정하였다. 세포 증식을 사이퀀트(CyQuant)(인비트로젠)에 의해 측정하였다. 항체의 부재 하에 pErB2에 따라 억제율 %을 결정하였다. 인산화-ErbB2 수준을 세포 수에 대해 정규화함으로써 인산화-ErbB2/세포를 또한 계산하였다. 용량 반응 곡선을 프리즘그래프패드 소프트웨어를 이용하여 각 항체에 대해 플로팅하였고, EC50 값을 비선형 회귀 곡선으로부터 유도하였다.

<557> 도 7 및 8은 상이한 시점에서의 용량 반응을 도시한다. EC50 및 최대 억제율 % 모두가 표 11에 열거되었다. 단클론성 Ab 1.18.1은 48시간째에 pErB2의 억제를 나타내기 시작하였고, 72시간째에 최대 억제에 도달하였다. 그러나, 헤르셉틴®은 72시간까지 유의적 효과를 나타내지 않은 반면, 2C4는 거의 효과를 가지지 않았다. 흥미롭게도, 인산화-ErbB2 수준을 세포 수에 의해 정규화한 경우, 1.18.1에 의한 ErbB2 인산화의 억제가 48시간째에 최대에 도달하였고; 반면 헤르셉틴®은 전술된 바와 같이 ErbB2의 인산화를 억제하는 것으로 나타나지 않았다.

<558> 그 다음, 48시간 후, BT474 세포 내 구성적 ErbB2 인산화에 대한 항체들 중 7개의 영향을 조사하였다. 간략히, 50 µl의 완전 배양 배지 내 10,000개 BT474 세포를 96-웰 플레이트에 씨딩하였고, 3 내지 4시간 동안 37°C에서 배양하여, 플레이트에 부착시켰다. 이어서, 완전 배양 배지에서 2×최종 농도로 제조된 20 µg/ml의 2C4, 헤르셉틴® 및 본 발명의 항-ErbB2 단클론성 항체를 플레이트에 첨가하였고, 48시간 동안 세포와 함께 항은 배양하였다. 세포 용해물을 제조하였고, 인산화-ErbB2 수준을 실시예 4에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 측정하였다. 항체의 부재 하에 pErB2 수준에 따라 억제율 %을 계산하였다. 표 11에 열거된 바와 같이, 본 발명의 모든 7개의 mAb가 48시간째에 BT474 세포 내 ErbB2 인산화의 용량-의존성 억제를 나타냈다. 이와 대비하여, 헤르셉틴® 및 2C4는 거의 효과를 가지지 않았다.

<559> [표 11] 48시간째에 BT474 세포 내 ErbB2 인산화를 억제함에 있어서의 본 발명의 7개 항체의 강도

<560>

| Ab | 10 µg/ml에서의 억제율%(n1) | 10 µg/ml에서의 억제율%(n2) |
|---------|----------------------|----------------------|
| 헤르셉틴® | 5 | 10 |
| 2C4 | 10 | 7 |
| 1.96.2 | 37 | 30 |
| 1.20.1 | 21 | 28 |
| 1.140.1 | 31 | 33 |
| 1.18.1 | 24 | 33 |
| 1.100.1 | 37 | 26 |
| 1.14.1 | 37 | 45 |
| 1.39.1 | 37 | 26 |

<561> 실시예 12

<562> (A) 중해상 비아코어 분석을 이용한 항-ERBB2 항체 친화도의 결정

<563> 항-ErbB2 항체들 중 8개의 결합 친화도를 중해상 비아코어에 의해 측정하였다. 비아코어 2000 기기를 이용하여 모든 실험들을 수행하였다.

<564> 먼저, 3개의 CM5 비아코어 칩 상의 12개의 고밀도 염소 α-인간 IgG 항체 표면을 통상의 아민 커플링을 이용하여 제조하였다. 이어서, mAb를 100 µg/ml 소 혈청 알부민(BSA)를 함유하는 HBS-P 수행 완충액에서 희석하였고, 구체적으로 mAb 1.18.1를 11 µg/mL로, mAb 1.20.1을 9.9 µg/mL로, mAb 1.100.1을 11 µg/mL로, mAb 1.96.2를 9.3 µg/mL로, mAb 1.140.1을 9.2 µg/mL로, mAb 1.14.1을 9.3 µg/mL로, mAb 1.39.1을 10 µg/mL로, mAb 1.24.3을 10 µg/mL로 희석하였다. 각 항원 주입 사이클 전에, 각 mAb를 100 µL/분 유속으로 6 내지 9초 동안 포착하였다. 각 포착 주입 후에 2-분간의 세정 단계를 행하여, 각 mAb 기준선을 안정화하였다. 정제된 인간 ErbB2(ECD)-cMyc/His를 모든 mAb에 대해 307 내지 4.80 nM의 농도 범위(2× 일련 희석)로 90초 동안 주입한 후, 15분 동안 해리시켰으며, 다만 예외로 mAb 1.39.1 및 1.24.3은 20분 동안 해리하였다. 모든 샘플들을 이중 참조를 위해 중간 산재되는 수가지 mAb 포착/완충액 주입 사이클로 무작위로 주입하였다. 고밀도 염소 α-인간 항체 표면을 100 µL/분의 유속으로 각 사이클 후에 146 mM 인산(pH 1.5)의 하나의 12-초 펄스로 재생시켰다. CLAMP를 이용하여 데이터를 1:1 상호작용 모델에 피팅하였다. 생성되는 결합 상수가 하기 표에 열거되어 있다. mAb가 최고 친화도에서 최저 친화도 순으로 열거되어 있다.

[표 12a] 중해상 비아코어 분석에 의한 인간 ErbB2에 대한 본 발명의 8개 항체의 결합 친화도

| mAb | R _{max} | k _a (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _d (s ⁻¹) | K _D (nM) |
|---------|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1.39.1 | 57 | 1.15×10 ⁵ | 2.36×10 ⁻⁴ | 2.0 |
| 1.14.1 | 70 | 1.02×10 ⁵ | 2.56×10 ⁻⁴ | 2.5 |
| 1.96.2 | 51 | 1.03×10 ⁵ | 2.73×10 ⁻⁴ | 2.6 |
| 1.100.1 | 100 | 1.04×10 ⁵ | 3.01×10 ⁻⁴ | 2.9 |
| 1.18.1 | 157 | 1.00×10 ⁵ | 3.02×10 ⁻⁴ | 3.0 |
| 1.140.1 | 66 | 0.94×10 ⁵ | 3.33×10 ⁻⁴ | 3.5 |
| 1.20.1 | 56 | 0.95×10 ⁵ | 3.44×10 ⁻⁴ | 3.6 |
| 1.24.3 | 65 | 1.28×10 ⁵ | 6.55×10 ⁻⁴ | 5.1 |

(B) 고해상 비아코어 분석

비아코어 T100 기기를 이용하여 모든 실험들을 수행하였다. 먼저, 고밀도 염소 α 인간 IgG 항체(칼텍 H10500) 표면을 통상의 아민 커플링을 이용하여 2개의 CM5 비아코어 칩 상에 제조하였다. 각 mAb를 100 µg/ml 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 HBS-P 수행 완충액에 희석하였다. MAb 1.140를 5 µg/mL로, mAb 1.96.2을 5.9 µg/mL로, mAb 1.39.1를 8.7 µg/mL로, mAb 2C4를 2 µg/mL로, 또한 헤르셉틴을 4 µg/mL로 희석하였다.

포착 수준 프로토콜을 5개 모든 mAb에 대해 개발하였다. 각 항원 주입 사이클 전에, 각 mAb를 20 µL/분 유속으로 15 내지 30초 동안에 포착하였다. 각 포착 주입 후에 5-분간의 세정 단계를 행하여, 각 mAb 기준선을 안정화 하였다. mAb 1.140, 1.96.2, 및 1.39.1에 대해 항원 hHer-2(ECD)cMyc(로트 #452)를 4분간 369 내지 5.76 nM(2 × 일련 희석)로 주입한 후, 15분간 해리시켰으며, mAb 2C4 및 헤르셉틴에 대해서는 650 내지 10.2 nM(2 × 일련 희석)의 농도 범위로 주입한 후, 25분간 해리하였다. 모든 샘플들을 이중 참조를 위해 중간 산재되는 수가지 mAb 포착/완충액 주입 사이클로 무작위로 주입하였다. 고밀도 염소 α-인간 항체 표면을 각 사이클 후에 각 사이클 후에 146 mM 인산(pH 1.5)의 하나의 15-초 펄스로 재생시켰다. 모든 주입 사이클에 대해 50 µL/분의 유속을 사용하였다.

모든 센서그램 데이터를 CLAMP를 이용하여 1:1 상호작용 모델에 피팅하였다. 생성되는 결합 상수가 하기 표에 열거되어 있다. mAb가 최고 친화도에서 최저 친화도 순으로 열거되어 있다.

[표 12b]

고해상 비아코어 분석에 의한 인간 ErbB2에 대한 본 발명의 3개 항체의 결합 친화도

| 샘플 | R _{max} | k _a (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _d (s ⁻¹) | K _D (nM) |
|--------|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 2C4 | 105,88 | 1.21×10 ⁴ | 3.91×10 ⁻⁵ | 3.2 |
| 헤르셉틴 | 60 | 2.34×10 ⁴ | 9.80×10 ⁻⁵ | 4.2 |
| 1.140 | 110 | 1.64×10 ⁴ | 1.73×10 ⁻⁴ | 10.6 |
| 1.96.2 | 93 | 1.68×10 ⁴ | 1.94×10 ⁻⁴ | 11.6 |
| 1.39.1 | 120 | 1.60×10 ⁴ | 2.14×10 ⁻⁴ | 13.4 |

실시예 13

항체의 경쟁 비닝

2C4는 보고에 따르면 ErbB2 상의 이량체화 도메인에 결합하는 반면, 헤르셉틴[®]은 ErbB2의 세포외 영역 내 C-말단 도메인에 결합한다(본원에 참조 인용되는 문헌 [Franklin et al., Cancer Cell. 2004 Apr; 5(4):317-28] 및 문헌 [Cho et al., Nature. 2003 Feb 13; 421(6924):756-60]을 참조한다). 항체들 중 8개의 결합 에피토프

가 2C4 또는 헤르셉틴[®]에 대한 에피토프와 중첩되는지의 여부를 결정하기 위해, 경쟁적 비닝 ELISA를 수행하였다.

<577> 코스타르(Costar) 3695 배지 결합 96-웰 플레이트를 PBS 중 0.5 µg/ml 헤르셉틴[®] 또는 2 µg/ml 2C4으로 하룻밤 동안 4°C에서 코팅하였다. 코팅된 플레이트를 세정한 후, 30분 동안 실온에서(RT) 1% 모유/PBS로 블로킹하였다. 항체를 1000 ng/ml, 100 ng/ml 및 10 ng/ml으로 적정하고, 2시간 동안 30 ng/ml hErbB2(ECD)과 함께 예비-항은 배양하였다. 항체/ErbB2 혼합물을 블로킹된 플레이트로 옮겼고, 실온에서 1시간 동안 항은 배양하였다. 결합된 ErbB2를 검출하기 위해, 플레이트를 세정하고, 실온에서 1시간 동안 1 µg/ml의 염소 항-ErbB2(R&D 시스템, 카달로그 #AF1129)와 함께 항은 배양하였다. 2차 항체 토끼 항-염소 IgG Fc POD(피어스 카달로그 #31433, 400 ng/ml)를 플레이트에 첨가하였고, 실온에서 1시간 동안 항은 배양하였다. 심의 세정한 후, 기질 TMB(네오젠 (Neogen))을 첨가하여, 실온에서 10 내지 18분 동안 플레이트와 함께 항은 배양하였다. 1 N HCl을 첨가함으로써 효소 반응을 중지시켰고, 450 nm에서의 광학 밀도를 마이크로플레이트 리더에서 판독하였다. 도 9는 본 발명의 8개의 항-ErbB2 항체, mAb 1.71.3, 또는 인-하우스 생성된 비관련 동위원소 조절 mAb의 존재 하에 ErbB2의 헤르셉틴[®] (A) 및 2C4(B)에 대한 결합능을 도시한다. 본 발명의 항-ErbB2 항체들 중 어느 것도 2C4 또는 헤르셉틴[®]에 대한 ErbB2의 결합을 차단하지 않고, 이는 항체가 2C4 또는 헤르셉틴[®]과 상이한 빈에 속함을 제시한다.

<578> 본원의 모든 공보, 특허 및 특허 출원은, 각 개별 공보 또는 특허 출원이 참조 인용되는 것으로 구체적으로 또한 개별적으로 나타내어진 것과 같은 동일한 정도로 본원에 참조 인용된다. 상기 상세한 설명은 단지 보다 명료히 이해시키고자 제시된 것으로서, 변형이 당업자에게 자명할 경우, 어떠한 불필요한 제한도 가해지지 않음을 이해하도록 한다. 이는, 본원에 제공된 정보들 중 임의의 정보가 종래 기술이거나 현재 청구하고 있는 발명과 관련됨을 인정한다거나, 혹은 구체적으로 또는 함축적으로 인용된 임의의 공보가 종래 기술임을 인정하는 것은 아니다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술의 당업자에 의해 통상 이해되어지는 바와 동일한 의미를 가진다.

<579> 본 발명이 본 발명의 특정 실시양태와 관련하여 기재되었으나, 추가 변형을 할 수 있고, 본 출원은, 일반적으로 본 발명의 원칙을 따르면서, 또한 본 발명이 속하는 기술 내에 공지되거나 통상적인 실무 내에 속하고 또한 본원에 나와 있는 본질적 특성에 적용될 수 있고 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 따르는 본 개시내용으로부터의 상기와 같은 이탈을 포함하는, 본 발명의 임의의 변화, 용도 또는 적합화를 포괄하는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

<128> 도 1은 1시간(Y 축) 예비배양 후 및 24시간(X 축) 예비배양 후의 MCF7 세포 내 헤레굴린-유도 ErbB2 인산화에 대한 152개 하이브리도마 상등액의 영향의 상관관계를 나타내는 그래프이다.

<129> 도 2는 LA/HA ELISA 분석의 데이터 플롯이다. Y축은 31 ng/ml의 hErbB2(ECD)/cMyc-His를 ELISA 플레이트 상에 코팅했을 때의 OD 값에서의 결합 신호를 가리킨다. X축은 10 µg/ml의 ErbB2(ECD)/cMyc-His를 ELISA 플레이트 상에 코팅했을 때의 HA ELISA로부터 유래된 하이브리도마 상등액 중 ErbB2-특이적 항체의 농도를 가리킨다.

<130> 도 3A-3C는 MCF7 세포 내 헤레굴린-유도 ErbB2 인산화에 있어 본 발명의 10개의 항-ErbB2 단클론성 항체(B 및 C) 및 대조군 항체(A)에 대한 용량 반응 곡선을 도시한다.

<131> 도 4A-4C는 MCF7 세포의 헤레굴린-유도 증식에 있어 본 발명의 10개의 항-ErbB2 단클론성 항체(B 및 C) 및 대조군 항체(A)에 대한 용량 반응 곡선을 도시한다.

<132> 도 5A 및 5B는 BT474 세포 증식 검정법에 있어 본 발명의 8개의 항-ErbB2 단클론성 항체(B) 및 대조군 항체(A)에 대한 용량 반응성 곡선을 도시한다.

<133> 도 6A 및 6B는 SKBR3 세포 증식 검정법에 있어 본 발명의 8개의 항-ErbB2 단클론성 항체(B) 및 대조군 항체(A)에 대한 용량 반응성 곡선을 도시한다.

<134> 도 7A-7C는 24, 48, 72 또는 96시간 동안 세포를 mAb와 함께 항은 배양한 후, mAb 1.18.1(A), 헤르셉틴[®](B) 및 2C4(C)에 대한 총 ErbB2 인산화의 용량-의존성 반응을 도시한다.

<135> 도 8A-8C는 24, 48, 72 또는 96시간 동안 세포를 mAb와 함께 항은 배양한 후, mAb 1.18.1(A), 헤르셉틴[®](B) 및 2C4(C)에 대한 정규화 ErbB2 인산화의 용량-의존성 반응을 도시한다.

<136> 도 9A 및 9B는 ELISA에서 본 발명의 시험 항체가 ErbB2 결합을 위해 2C4(B) 또는 헤르셉틴®(A)와 경쟁하지 않음을 가리키는 경쟁 비닝(competitive binning)의 결과를 도시한다.

<137> **발명의 상세한 설명**

<138> 정의 및 일반 기법

<139> 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 용어 및 기술적 용어는 당업자에 의해 통상 이해되어지는 의미를 가지는 것으로 한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형태를 포함하도록 하며, 복수형 용어는 단수형태를 포함하도록 한다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 그것들의 기법이 공지되어 있고 당업계에 통상 사용되는 것들이다.

<140> 본 발명의 방법 및 기법은 일반적으로 당업계에 공지되어 있는 통상적 방법에 따라, 또한 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의되는, 각종 일반적이고 더욱 구체적인 참조문헌에 기재된 바대로 수행된다. 예를 들어, 본원에 참조 인용되는, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)], 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates(1992)], 및 문헌 [Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1990)]를 참조한다. 효소 반응 및 정제 기법은 당업계에서 통상적으로 달성되는 바대로, 또는 본원에 기재된 바대로, 제조자의 상세설명서에 따라 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 약학 화학과 관련하여 사용된 명명법, 및 그것들의 실험 절차 및 기법은 당 분야에 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학 합성, 화학 분석, 약학적 제조, 제형, 전달 및 대상의 치료를 위해 표준 기술이 사용된다.

<141> 각 항체에는 1개 또는 2개의 소수점에 의해 분리된 2개 또는 3개 수를 포함한 확인 번호가 부여되었다. 일부 경우들에서, 하나의 항체의 수가지 클론이 제조되었다. 다수의 클론은 모 서열과 동일한 핵산 및 아미노산 서열을 가지더라도, 상이한 확인 번호를 가지고, 또한 따로 열거될 수 있다. 따라서, 예를 들어 하기의 것들에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 동일하다:

<142> 1.44.1=1.44.2=1.44.3=1.44;

<143> 1.124=1.148=1.140=1.140.1;

<144> 1.41=1.43=143.1=143.2=1.22.1;

<145> 1.14.1=1.14.2=1.14.3=1.14;

<146> 1.100.1=1.100.2=1.100.3=1.100;

<147> 1.107=1.104=1.128=1.96=1.99=1.96.2;

<148> 1.18.1=1.18.2=1.18.3=1.18;

<149> 1.20=1.19=1.20.1;

<150> 1.39=1.39.1=1.39.2=1.39.3;

<151> 1.24=1.22.2=1.71.1=1.24.3;

<152> 1.71.2=1.71.3.

<153> 하기 용어들은 달리 지시되지 않는 한, 하기 의미들을 가지는 것을 이해하도록 한다:

<154> "폴리펩티드"라는 용어는 천연 또는 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩티드 유사체를 포괄한다. 폴리펩티드는 단량체성 또는 중합체성일 수 있다.

<155> "단리된 단백질", "단리된 폴리펩티드" 또는 "단리된 항체"라는 용어는 자체의 기원 또는 유도 공급원으로 인해 (1) 천연 상태로 그것을 동반하는 천연 결합된 성분과 결합하지 않거나, (2) 동일한 종으로부터의 상이한 단백질을 포함하지 않거나, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, (4) 천연 발생되지 않는, 단백질, 폴리펩티드 또는 항체이다. 따라서, 천연 기원 출처인 세포와 상이한 세포계에서 합성되거나 화학적으로 합성된 폴리펩티드는 그것의 천연적으로 결합된 성분으로부터 "단리될" 것이다. 단백질은 또한 당업계에 공지되어 있는

단백질 정제 기법을 이용하여, 단리에 의해 천연적으로 결합된 성분을 실질적으로 포함하지 않을 수 있다.

- <156> 단리된 항체의 예에는 ErbB2를 이용하여 친화도 정제된 항-ErbB2 항체, 시험관내 하이브리도마 또는 다른 세포주에 의해 합성된 항-ErbB2 항체, 및 트랜스제닉 마우스로부터 유래된 인간 항-ErbB2 항체가 포함된다. 표적화된 결합체는 또한 본원에 기재된 유사한 기법들을 이용하여 정제될 수 있다.
- <157> 본원에 사용되는 "폴리펩티드 단편"이라는 용어는 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 결실을 가지나 나머지 아미노산 서열은 천연 발생 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 단편은 적어도 5, 6, 8 또는 10개 아미노산 길이를 가진다. 다른 실시양태에서, 단편은 적어도 14개, 적어도 20개, 적어도 50개, 또는 적어도 70개, 80개, 90개, 100개, 150개 또는 200개 아미노산 길이를 가진다.
- <158> 본원에 사용되는 "조절(modulating)"이라는 용어는 경로의 억제 또는 활성의 임의의 정도량에 대한 것이다.
- <159> 특정 실시양태에서, 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분에 대한 아미노산 치환은, (1) 단백질분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키며, (3) 결합 친화도를 변경하여 단백질 착물을 형성하고, (4) 그러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 작용성 성질을 부여하거나 변형시키나, 여전히 ErbB2에 대한 특이적 결합을 보유하는 치환체이다. 유사체에 정상적으로 발생하는 펩티드 서열과 다른 서열의 각종 돌연변이들이 포함될 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다중 아미노산 치환, 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이 정상적으로 발생하는 서열, 바람직하게는 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩티드의 부분에서 일어날 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 모 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시키지 않아야 하는데; 예를 들어, 치환 아미노산은 모 서열에서 일어나는 면역글로불린 결합 도메인을 구성하는 항-병렬 β-시트를 변경하거나 모 서열을 특징화하는 다른 유형의 2차 구조를 붕괴하지 않아야 한다. 일반적으로, 글리신 및 프롤린은 항-병렬 β-시트에 이용되지 않을 것이다. 당업계에 인식되어 있는 폴리펩티드의 2차 및 3차 구조의 예가, 본원에 참조 인용되는 문헌 [Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984))]; 문헌 [Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991))]; 및 문헌 [Thornton et al., Nature 354:105(1991)]에 기재되어 있다.
- <160> 비-펩티드 유사체는 주형 펩티드의 성질과 유사한 성질을 갖는 약물로서 약학 산업계에 통상 사용된다. 이 유형의 비-펩티드 화합물은 "펩티드 모방체" 또는 "펩티도모방체"로 칭해진다(본원에 참조 인용되는, 문헌 [Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29(1986); Veber and Freidinger, TINS p.392(1985)]; 및 문헌 [Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229(1987)]을 참조한다). 그러한 화합물은 종종 컴퓨터 이용 분자 모델링의 도움으로 개발된다. 치료적으로 유용한 펩티드와 구조적으로 유사한 펩티드 모방체를 사용하여, 동등한 치료 또는 예방 효과를 산출할 수 있다. 일반적으로, 펩티도모방체는 페리다임 폴리펩티드(즉, 요망되는 생화학적 성질 또는 약리학적 활성을 가지는 폴리펩티드), 예컨대 인간 항체와 구조적으로 유사하나, 당업계에 공지되어 있는 방법에 의해 --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂-, --CH=CH--(시스 및 트랜스), --COCH₂-, --CH(OH)CH₂-- 및 --CH₂SO--로 구성된 군으로부터 선택되는 연결기에 의해 임의적으로 치환된 하나 이상의 펩티드 연결기를 가진다. 일치 서열 중 하나 이상의 아미노산의 동일한 유형의 D-아미노산으로의 계통적 치환(예를 들어, L-리신 대신 D-리신으로)이 또한 사용되어, 보다 안정한 펩티드를 생성시킬 수 있다. 또한, 일치 서열 또는 실질적으로 동일한 일치 서열 변형태를 포함하는 제약된 펩티드가 당업계에 공지된 방법에 의해(본원에 참조 인용되는 문헌 [Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387(1992)]); 예를 들어, 펩티드를 고리화하는 분자내 디설피드 가교를 형성할 수 있는 내부 시스테인 잔기를 첨가함으로써 생성될 수 있다.
- <161> 본 발명과 관련하여 "항체"를 지칭하는 경우, 이의 항원 결합 부분도 또한 사용될 수 있음을 통상 이해하여야 한다. 항원 결합 부분은 특이적 결합을 위해 비변형(intact) 항체와 경쟁한다. 일반적으로, 문헌 [Fundamental Immunology, Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y.(1989))](이는 모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조 인용됨)을 참조한다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기법에 의해, 또는 비변형 항체의 효소 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분에는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, 및 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단쇄 항체(scFv 또는 scFv2), 키메라 항체, 디아보디, 및 폴리펩티드에 특이적인 항원 결합을 부여하기에 충분한 항체의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다.
- <162> N-말단 내지 C-말단에 있어, 성숙 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두는 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 영역들을 포함한다. 본원의 각 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌 [Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987 및 1991))], 문헌 [Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)] 또는 문헌 [Chothia et al., Nature 342:878-883(1989)]의 정의에

준한다.

- <163> 번호에 의해 지칭되는 본원에 사용되는 항체는 동일한 번호의 하이브리도마로부터 획득되는 단클론성 항체와 동일하다. 예를 들어, 단클론성 항체 1.18은 하이브리도마 1*18로부터 획득된 것, 또는 그것의 서브클론과 동일한 항체이다. 서브클론은 예를 들어 1.18.1에서와 같이 추가 소수점으로 확인된다.
- <164> 본원에 사용되는 Fd 단편이란, VH 및 CH1 도메인으로 구성된 항체 단편을 의미하고; Fv 단편은 항체의 단일 팔의 VL 및 VF1 도메인으로 구성되며; dAb 단편(문헌 [Ward et al., Nature 341:544-546(1989)])은 VH 도메인으로 구성된다.
- <165> 일부 실시양태에서, 항체는 VL 및 VH 도메인이 단일 단백질 사슬로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커를 통해 단가 분자를 형성하도록 쌍을 이루는 단쇄 항체(scFv)이다. (문헌 [Bird et al., Science 242:423-426(1988)] 및 문헌 [Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988)]). 일부 실시양태에서, 항체는 디아보디인데, 즉 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬 상에서 발견되는 이가 항체이나, 다만 너무 짧아서 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루지 못하도록 하는 링커를 이용함으로써, 도메인이 또 다른 사슬의 상보 도메인과 쌍을 이루도록 강제하고, 2개의 항원 결합 부위를 생성한다.(예를 들어, 문헌 [Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)], 및 문헌 [Poljak R. J. et al., Structure 2:1121-1123(1994)]을 참조한다). 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체로부터의 하나 이상의 CDR이 공유 또는 비공유로 분자 내에 도입되어, 그 분자가 ErbB2에 특이적으로 결합하는 면역접합체(immunoadhesin)가 되도록 할 수 있다. 그러한 실시양태에서, CDR(들)은 보다 큰 폴리펩티드의 부분으로서 도입되거나, 또 다른 폴리펩티드 사슬에 공유 결합되거나, 비공유 도입될 수 있다.
- <166> 하나 이상의 결합 부위를 갖는 실시양태에서, 결합 부위는 상호 동일하거나 상이할 수 있다.
- <167> 본원에 사용되는 "인간 항체"라는 용어는 가변 및 불변 도메인 서열이 인간 서열인 임의의 항체를 의미한다. 그 용어는 인간 유전자로부터 유래된 서열을 가지나, 예를 들어 가능한 면역원성을 감소시키거나, 친화도를 증가시키거나, 바람직하지 않은 폴딩을 유발할 수 있는 시스테인을 제거하기 위한 목적 등으로 변화된 항체를 포괄한다. 그 용어는 인간 세포의 전형예가 아닌 당화를 부여할 수 있는, 인간 이외의 세포에서 재조합에 의해 생성되는 상기와 같은 항체를 포괄한다. 이 항체는 이후 기재된 바와 같이, 각종 방식으로 제조될 수 있다.
- <168> 본원에 사용되는 "키메라 항체"라는 용어는 2개 이상의 상이한 항체로부터의 영역을 포함하는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 키메라 항체의 CDR 중 하나 이상은 인간 항-ErbB2 항체로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, CDR의 모두는 인간 항-ErbB2 항체로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 하나 초과인 인간 항-ErbB2 항체로부터의 CDR은 키메라 항체에서 조합된다. 예를 들어, 키메라 항체는 제1 인간 항-ErbB2 항체의 경쇄로부터의 CDR1, 제2 인간 항-ErbB2 항체의 경쇄로부터의 CDR2, 및 제3 인간 항-ErbB2 항체의 경쇄로부터의 CDR3를 포함할 수 있고, 중쇄로부터의 CDR은 하나 이상의 다른 항-ErbB2 항체로부터 유래될 수 있다. 또한, 프레임워크 영역은, CDR 중 하나 이상이 취해지도록 하는 출처인 하나의 항-ErbB2 항체로부터, 또는 하나 이상의 상이한 인간 항체로부터 유래될 수 있다.
- <169> 일부 실시양태에서, 본 발명의 키메라 항체는 인간화 항-ErbB2 항체이다. 본 발명의 인간화 항-ErbB2항체는 본 발명의 하나 이상의 인간 항-ErbB2 항체의 불변 영역의 적어도 일부분으로부터의 아미노산 서열 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역의 아미노산 서열, 및 인간 이외의 항-ErbB2 항체로부터 유래된 CDR을 포함한다.
- <170> 본원에 사용되는 "억제 항체"(또한 본원에서 "길항자 항체"로도 칭해짐)란, ErbB2를 발현하는 세포, 조직 또는 유기체에 첨가될 때, 하나 이상의 ErbB2 활성을 적어도 약 30% 억제하는 항체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 항체는 ErbB2 활성을 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 또는 100% 초과 억제한다. 일부 실시양태에서, 억제 항체는 헤레굴린과 같은 리간드의 존재 하에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 길항자 항체는 ErbB2의 하나 이상의 활성을 5배 감소시킨다.
- <171> 항체의 "결합 단편"은 재조합 DNA 기법에 의해, 또는 비변형 항체의 효소 또는 화학적 절단에 의해 생성된다. 결합 단편에는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb 및 단쇄 항체가 포함된다. "이중특이적" 또는 "이중작용적" 항체 외의 항체는 각각의 결합 부위가 동일한 것으로 이해한다. 항체는 과량의 항체가 대응-수용체에 결합된 수용체의 양을 적어도 약 20%, 40%, 60% 또는 80%, 및 더욱 통상은 약 85% 초과(시험관내 경쟁 결합 검정으로 측정시) 감소시킬 때 대응-수용체에 대한 수용체의 접촉을 실질적으로 억제한다.
- <172> 항체 또는 면역글로불린 분자의 단편 또는 유사체는 본 명세서의 교시에 따라 당업자에 의해 용이하게 제조될

수 있다. 단편 또는 유사체의 바람직한 아미노-말단 및 카르복시-말단은 작용성 도메인의 경계부 부근에서 일어난다. 구조적 및 작용성 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공공 또는 자산 서열 데이터베이스와 비교함으로써 동정될 수 있다. 바람직하게, 컴퓨터 이용 비교 방법을 사용하여, 알려진 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에서 일어나는 서열 모티프 또는 예측된 단백질 입체형태(conformation) 도메인을 동정한다. 공지된 3차원 구조로 폴딩하는 단백질 서열을 동정하는 방법이 공지되어 있다. 문헌 [Bowie et al., Science 253: 164(1991)]을 참조한다.

<173> 전체 항체의 단편이 결합 항원의 기능을 수행할 수 있는 것으로 나타났다. 결합 단편의 예는 (문헌 [Ward, E. S. et al.(1989) Nature 341, 544-546]) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 Fab 단편; (문헌 [McCafferty et al.(1990) Nature, 348, 552-554]) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (문헌 [Holt et al(2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490]) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (iv) VH 또는 VL 도메인으로 구성된 dAb 단편(문헌 [Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546(1989)], 문헌 [McCafferty et al.(1990) Nature, 348, 552-554], 문헌 [Holt et al(2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490]; (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) 단쇄 Fv 분자(scFv)(여기에서, VH 도메인 및 VL 도메인은 2개의 도메인이 결합하여, 항원 결합 부위를 형성하도록 하는 펩티드 링커에 의해 연결됨)(문헌 [Bird et al.(1988) Science, 242, 423-426], 문헌 [Huston et al.(1988) PNAS USA, 85, 5879-5883]); (viii) 이중특이적 단쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965), 및 (ix) 유전자 융합에 의해 작제되는 다가 또는 다중특이적 단편인 "디아보디"(제W094/13804호; 문헌 [Holliger, P.(1993) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448])이다. Fv, scFv 또는 디아보디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 디설피드 가교의 도입에 의해 안정화될 수 있다(문헌 [Reiter, Y. et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996]). CH3 도메인에 결합된 scFv를 포함하는 미니보디도 또한 제조될 수 있다(문헌 [Hu, S. et al.(1996) Cancer Res., 56, 3055-3061]). 결합 단편의 다른 예는 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함한, 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 몇 개의 잔기가 부가된 점에서 Fab 단편과 상이한 Fab', 및 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 가지는 Fab' 단편인 Fab'-SH이다.

<174> 본원에 사용되는 "억제하는 표적화된 결합제"란, ErbB2를 발현하는 세포, 조직 또는 유기체에 첨가될 때 하나 이상의 ErbB2 활성을 적어도 약 30% 억제하는 표적화된 결합제를 의미한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제는 ErbB2 활성을 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 또는 100% 초과 억제한다. 일부 실시양태에서, 억제하는 표적화된 결합제는 헤레굴린과 같은 리간드의 존재 하에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 표적화된 결합제는 ErbB2의 하나 이상의 활성을 5배 감소시킨다.

<175> 본원에 사용되는 "표면 플라즈몬 공명"이라는 용어는 바이오센서 매트릭스 내 단백질 농도의 변화를, 예를 들어 비아코어(BIACORE)TM 시스템(파마시아 바이오센서 AB(Pharmacia Biosensor AB)(스웨덴 옘살라 및 미국 뉴저지주 피스캐터웨이 소재))을 이용하여 검출함으로써, 실시간 이중특이적 상호작용을 분석하도록 하는 광학 현상을 지칭한다. 추가 설명을 위해, 문헌 [Jonsson U. et al., Ann. Biol. Clin. 51: 19-26(1993)]; 문헌 [Jonsson U. et al., Biotechniques 11:620-627(1991)]; 문헌 [Jonsson B. et al., J. Mol. Recognit. 8:125-131(1995)]; 및 문헌 [Jonsson B. et al., Anal. Biochem. 198:268-277(1991)]을 참조한다.

<176> "KD"라는 용어는 특별한 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭한다.

<177> "에피토프"란 용어는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있거나 그와 다른 방식으로 분자와 상호작용할 수 있는 임의의 단백질 결정자를 포함한다. 에피토프성 결정자는 일반적으로 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 군들로 구성되고, 일반적으로 특이적 3차원 구조적 특성, 및 특이적 전하 특성을 가진다. 에피토프는 "선형" 또는 "입체형태"일 수 있다. 한 선형 에피토프에서, 단백질과 상호작용 분자(예컨대, 항체) 간의 상호작용 점들 모두는 단백질의 일차 아미노산 서열을 따라 선형으로 발생한다. 입체형태의 에피토프에서, 상호작용 점은 상호 분리된 단백질 상에 아미노산 잔기에 걸쳐 일어난다. 항체는 해리 상수가 ≤1 mM, 바람직하게는 ≤100 mM, 가장 바람직하게는 ≤10 nM일 때 항원이 특이적으로 결합한다고 칭해진다. 특정 실시양태에서, KD는 1 pM 내지 500 pM이다. 다른 실시양태에서, KD는 500 pM 내지 1 μM이다. 다른 실시양태에서, KD는 1 μM 내지 100 nM이다. 다른 실시양태에서, KD는 100 mM 내지 10 nM이다. 일단 항원 상의 요망되는 에피토프가 결정되면, 예를 들어 본 발명에 기재된 기법을 이용하여 상기 에피토프에 대한 항체를 생성시키는 것이 가능하다. 대안적으로, 회수 공정 중에, 항체의 생성 및 특징화는 바람직한 에피토프에 대한 정보를 규명할 수 있다. 이 정보로부터, 이어서 동일한 에피토프에 결합하기 위한 항체를 경쟁적으로 스크리닝하는 것이 가능하다. 이를 달성하기 위한 한 방법은, 상호 간에 경쟁적으로 결합하는 항체, 예를 들

어 항원에 대한 결합을 위해 경쟁하는 항체를 찾는 교차-경쟁 연구를 수행하는 것이다. 교차-경쟁에 기초한 항체를 "비닝하는(binning)" 고효율 공정이 국제 특허 출원 번호 제W0 03/48731호에 기재되어 있다.

- <178> 본원에 사용되는 20개의 통상의 아미노산 및 이들의 약어는 통상적 용법을 따른다. 본원에 참조 인용되는 문헌 [Immunology-A Synthesis(2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991))]을 참조한다.
- <179> 본원에 사용되는 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 길이가 10개 이상의 염기로 된 중합체성 형태의 뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드, 또는 변형된 형태의 다른 유형의 뉴클레오티드를 의미한다. 그 용어에는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태가 포함된다.
- <180> 본원에 사용되는 "단리된 폴리뉴클레오티드"라는 용어는 게놈, cDNA 또는 합성 기원, 또는 이들의 조합의 폴리뉴클레오티드로서, 그 기원에 의해 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 (1) "단리된 폴리뉴클레오티드"가 자연적으로 발견되는 폴리뉴클레오티드 중 모두 또는 일부와 결합하지 않거나, (2) 자연적으로 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 작용적으로 연결되거나, 보다 큰 서열의 부분으로서 천연 발생하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- <181> 본원에 사용되는 "천연 발생 뉴클레오티드"라는 용어에는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드가 포함된다. 본원에 사용되는 "변형된 뉴클레오티드"라는 용어에는 변형되거나 치환된 당 기를 갖는 뉴클레오티드 등이 포함된다. 본원에서 지칭되는 "올리고뉴클레오티드 연결기"라는 용어에는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라테이트, 포스포로아미테이트 등과 같은 올리고뉴클레오티드 연결기가 포함된다. 예를 들어, 각기 개시내용이 본원에 참조 인용되는, 문헌 [LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081(1986)]; 문헌 [Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077(1984)]; 문헌 [Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209(1988)]; 문헌 [Zon et al., AntiCancer Drug Design 6:539(1991)]; 문헌 [Zon et al., Oligonucleotide and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991))]; 미국 특허 제 5,151,510호; 문헌 [Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543(1990)]를 참조한다. 올리고뉴클레오티드는 원할 경우, 검출용 표지를 포함할 수 있다.
- <182> "작용적으로 연결된" 서열에는 관심 유전자와 인접한 발현 조절 서열, 및 관심 유전자를 조절하기 위한 거리에서 또는 트랜스 방식으로 작용하는 발현 조절 서열의 양자 모두가 포함된다. 본원에 사용되는 "발현 조절 서열"이란 용어는 그 서열이 결합되어 있는 코딩 서열의 발현 및 가공을 수행하는 데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 발현 조절 서열에는 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진시키는 서열(즉, 코작(Kozak) 일치 서열); 단백질 안정성을 증진시키는 서열; 및 원할 경우, 단백질 분비를 증진시키는 서열이 포함된다. 그러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 상이하며; 원핵생물의 경우, 그러한 조절 서열에는 일반적으로 프로모터, 리보솜내 결합 부위, 및 전사 종결 서열이 포함되고; 진핵생물의 경우, 그러한 조절 서열에는 일반적으로 프로모터 및 전사 종결 서열이 포함된다. "조절 서열"이란 용어는 최소한 발현 및 가공에 필수적으로 존재해야 하는 모든 성분들을 포함하는 것으로 의도되고, 또한 존재하는 것이 유리한 부가적 성분, 예를 들어 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다.
- <183> 본원에 사용되는 "벡터"라는 용어는 그것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 즉, 부가적 DNA 세그먼트가 결합되어 들어갈 수 있는 DNA의 원형 이중 가닥의 조각이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 부가적 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈으로 결합되어 들어갈 수 있는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 그것이 도입되어 들어가는 숙주 세포(예를 들어, 세균 복제 기원을 갖는 세균 벡터 및 유전자부체(episomal) 포유동물 벡터)에서 자가 복제할 수 있다. 다른 실시양태에서, 벡터(예를 들어, 비-유전자부체 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입될 때 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있고, 이로써 숙주 게놈에 따라 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그것이 작용적으로 연결된 유전자의 발현을 지정할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 칭해진다.
- <184> 본원에 사용되는 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")라는 용어는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 의미한다. "재조합 숙주 세포" 및 "숙주 세포"는 특별한 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 의미함을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손을 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있으나, 여전히 본원에 사용되는 "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 포함된다.

- <185> 본원에서 지칭되는 "선택적으로 혼성화하다"라는 용어는 검출가능하게 또한 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및 그것의 단편은 비특이적 핵산에 대한 검출 가능한 결합의 인식가능한 양을 최소화하는 세정 조건 및 혼성화 조건 하에서 핵산 가닥에 선택적으로 혼성화한다. "고도의 엄격도" 또는 "고도로 엄격한" 조건을 사용하여, 당업계에 공지되어 있고 본원에 논의되어 있는 바와 같은 선택적 혼성화 조건을 달성할 수 있다. "고도의 엄격도" 또는 "고도로 엄격한" 조건은 폴리뉴클레오티드를 또 다른 폴리뉴클레오티드와 함께 항온 배양하는 것이며, 여기에서 하나의 폴리뉴클레오티드는 42°C의 혼성화 온도에서 12 내지 16시간 동안 6× SSPE 또는 SSC, 50% 포름아미드, 5× 덴하트(Denhardt's) 시약, 0.5% SDS, 100 μg/ml 변성 단편화 연어 정자 DNA의 혼성화 완충액 내에서 막과 같은 고체 표면에 부착한 후, 1×SSC, 0.5% SDS의 세정 완충액을 이용하여 55°C에서 2회 세정할 수 있다. 또한, 문헌 [Sambrook et al., 이하 상기와 동일함, pp. 9.50-9.55]를 참조한다.
- <186> "CDR 영역" 또는 "CDR"이라는 용어는 Kabat et al.(1991)(문헌 [Kabat, E. A. et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington]), 및 추후 발행판에서 정의되거나 본원에서 정의된 바와 같은, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역을 가리키는 것으로 의도될 수 있다. 항체는 전형적으로 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR을 함유한다. CDR 또는 CDR들이라는 용어는 경우에 따라서, 항체가 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 친화도에 의해 결합에 대한 원인이 될 수 있는 아미노산 잔기의 대부분을 함유하는, 상기 영역 중 하나, 또는 상기 영역 중 두가지 또는 심지어는 전체를 가리키기 위해 본원에 사용된다.
- <187> 6개의 짧은 CDR 서열들 중, 중쇄의 제3 CDR(HCDR3)은 보다 큰 크기 가변성을 가진다(보다 큰 다변성은 본질적으로 이를 일으키는 유전자 배치의 기작으로 인한 것임). 공지되어 있는 최장 크기가 26개 아미노산이나, 그것은 2개의 아미노산 정도로 짧을 수 있다. CDR 길이는 또한 특별한 기저 프레임워크에 의해 수용될 수 있는 길이에 따라 다양할 수 있다. 기능적으로, HCDR3은 항체의 특이성의 결정에 있어 적어도 일부 역할을 한다(문헌 [Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974], 문헌 [Amit et al., Science, 233:747-753, 1986], 문헌 [Chothia et al., J. Mol. Biol, 196:901-917, 1987], 문헌 [Chothia et al., Nature, 342:877-883, 1989], 문헌 [Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990], 문헌 [Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990], 문헌 [Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990], 문헌 [Kabat et al., J. Immunol, 147:1709-1719, 1991]).
- <188> 본원에 지칭되는 "CDR의 세트"라는 용어는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 따라서, HCDR의 세트는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭하고, LCDR의 세트는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭한다. 달리 언급되지 않는 한, "CDR의 세트"는 HCDR 및 LCDR을 포함한다.
- <189> 뉴클레오티드 서열의 문맥에 있어서 "서열 동일성 %"라는 용어는 최대로 상응하도록 배열될 때 동일한 2개 서열 내 잔기를 의미한다. 서열 동일성 비교를 위한 길이는 적어도 약 9개의 뉴클레오티드, 통상 적어도 약 18개의 뉴클레오티드, 더욱 통상은 적어도 약 24개의 뉴클레오티드, 전형적으로는 적어도 약 28개의 뉴클레오티드, 더욱 전형적으로는 적어도 약 32개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 약 36개, 48개 또는 그 이상 개수의 뉴클레오티드의 신장 이상일 수 있다. 뉴클레오티드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다수의 상이한 알고리즘들이 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 서열은 위스콘신(Wisconsin) 팩키지 버전 10.0(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group; GCG), 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 내 프로그램인 FASTA, Gap 또는 베스트피트(Bestfit)을 이용하여 비교될 수 있다. 예를 들어 프로그램 FASTA2 및 FASTA3을 포함하는 FASTA는 질의 서열과 검색 서열 사이의 최량의 중복 영역의 배열 및 서열 동일성 %를 제공한다(본원에 참조 인용되는, 문헌 [Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98(1990)]; 문헌 [Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219(2000)]; 문헌 [Method Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258(1996)]; 문헌 [Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84(1998)]). 달리 특정되지 않는 한, 특별한 프로그램 또는 알고리즘을 위한 디폴트 파라미터가 사용된다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열들 간의 서열 동일성 %는 본원에 참조 인용되는 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같은 Gap 및 그것의 디폴트 파라미터를 이용하거나, FASTA 및 그것의 디폴트 파라미터(워드 크기: 6, 및 스코어링 행렬을 위한 NOPAM 인자)를 이용하여 결정될 수 있다.
- <190> 뉴클레오티드 서열이라는 표현은 달리 특정되지 않는 한, 그것의 보체를 포괄한다. 따라서, 특별한 서열을 갖는 핵산이라는 표현은 그것의 상보적 가닥을, 그것의 상보적 서열과 함께 포괄하는 것으로 이해하여야 한다.
- <191> 본원에 사용되는 "서열 동일성 %" 및 "서열 상동도 %"라는 용어들은 상호 혼용된다.
- <192> 핵산 또는 그것의 단편과 관련한, "실질적 유사성" 또는 "실질적 서열 유사성"이라는 용어는 또 다른 핵산(또는

그것의 상보적 가닥)이 적절한 뉴클레오티드에 삽입되거나 결실되도록 하여 최적으로 배열될 때, 서열 동일성의 임의의 공지된 알고리즘, 예컨대 상기 논의된 바와 같은 FASTA, BLAST 또는 Gap에 의해 측정될 때, 뉴클레오티드 염기의 적어도 약 85%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오티드 서열 동일성이 있다.

<193> 폴리펩티드에 대해 적용되는 "실질적 동일도"라는 용어는 2개의 펩티드 서열이, 최적으로 배열될 때, 예컨대 당 프로그램과 함께 공급되는 디폴트 갭 중량을 이용한 프로그램 GAP 또는 베스트피트에 의해, 적어도 70%, 75% 또는 80% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 특정 실시양태에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다. "보존적 아미노산 치환"이란, 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 작용적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 상호 상이한 경우, 서열 동일성 %는 치환의 보존성 성질을 위해 수정하도록 상향 조정될 수 있다. 이 조정을 행하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Pearson, Methods Mol. Biol. 243:307-31(1994)]을 참조한다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 가지는 아미노산의 거의 예에는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 루이신 및 이소루이신; 2) 지방족-히드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르트산 및 글루탐산; 및 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌이 포함된다. 보존적 아미노산 치환기는 발린-루이신-이소루이신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르테이트 및 아스파라긴-글루타민이다.

<194> 대안적으로, 보존적 치환은 본원에 참조 인용되는 문헌 [Gonnet et al., Science 256: 1443-45(1992)]에 개시되어 있는 PAM250 로그 우도 행렬에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "중등도 보존적" 치환은 PAM250 로그 우도 행렬에서 음의 값을 갖는 임의의 변화이다.

<195> 폴리펩티드에 대한 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 이용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함한 각종 치환, 결실 및 다른 변형에 할당된 유사도 측정을 이용하여 서열에 부합된다. 예를 들어, GCG는 밀접하게 관련된 폴리펩티드, 예컨대 상이한 종의 유기체로부터의 상동성 폴리펩티드 사이의 서열 상동성 또는 서열 동일성, 또는 야생형 단백질과 그것의 뮤테인 사이의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하기 위해 프로그램에 의해 특정된 디폴트 파라미터와 함께 사용될 수 있는 "Gap" 및 "베스트피트"와 같은 프로그램을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [GCG Version 6.1(위스콘신주 위스콘신 대학)]을 참조한다. 폴리펩티드 서열은 또한 디폴트 또는 권장 파라미터를 이용한 FASTA를 이용하여서도 비교될 수 있고, GCG 버전 6.1을 참조한다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 질의 서열과 검색 서열 사이의 최량의 중첩 영역의 배열 및 서열 동일성 %를 제공한다(문헌 [Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98(1990)]; 문헌 [Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219(2000)]). 본 발명의 서열을 상이한 유기체로부터의 다수의 서열을 포함한 데이터베이스와 비교할 때의 또 다른 바람직한 알고리즘은 프로그램에 공급되는 디폴트 파라미터를 이용한 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 blastp 또는 tblastn이다. 예를 들어, 문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)]; 문헌 [Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-402(1997)]을 참조한다.

<196> 상동성에 대해 비교되는 폴리펩티드 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 16개의 아미노산 잔기, 통상 적어도 약 20개의 잔기, 더욱 통상은 적어도 약 24개의 잔기, 전형적으로 적어도 약 28개의 잔기, 바람직하게는 약 35개 초과 잔기일 것이다. 다수의 상이한 유기체들로부터의 서열을 포함하는 데이터베이스를 검색할 때, 아미노산 서열을 비교하는 것이 바람직하다.

<197> 본원에 논의된 바와 같이, 항체 또는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열에서의 작은 변동도 본 발명에 의해 포괄되는 것으로 구상되며, 이에 단 아미노산 서열의 변이는 본원에 기재된 항체 또는 면역글로불린 분자 대비, 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 95%, 가장 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 유지한다. 특히, 보존적 아미노산 치환이 구상된다. 보존적 치환은 관련 측쇄를 갖는 아미노산의 계열 내에서 일어나는 치환이다. 유전적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 하위 계열들로 구분된다: (1) 산성=아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성=리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성=알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비하전 극성=글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 더욱 바람직한 계열은, 세린 및 트레오닌은 지방족-히드록시 계열이고; 아스파라긴 및 글루타민은 아미드-함유 계열이며; 알라닌, 발린, 루이신 및 이소루이신은 지방족 계열이고; 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 방향족 계열이다. 예를 들어, 루이신의 이소루이신 또는 발린으로의 단리된 치환, 아스파르테이트의 글루타메이트

트로의 단리된 치환, 트레오닌의 세린으로의 단리된 치환, 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사 치환은, 특히 그 치환이 프레임워크 부위 내에 아미노산을 수반하지 않을 경우, 수득되는 분자의 결합 기능 또는 성질에 주요 영향을 미치지 않을 것으로 예상하는 것이 합당하다. 아미노산 변화가 작용성 펩티드를 초래하는지의 여부는 폴리펩티드 유도체의 특이적 활성을 검정함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 검정은 본원에 상세히 기재되어 있다. 항체 또는 면역글로불린 분자의 단편 또는 유사체는 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 바람직한 아미노-말단 및 카르복시-말단은 작용성 도메인의 경계부 부근에서 일어난다. 구조적 도메인 및 작용적 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공공 또는 자산 서열 데이터베이스와 비교함으로써 동정될 수 있다. 바람직하게, 컴퓨터 이용 비교 방법을 사용하여, 기지의 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에서 일어나는 서열 모티프 또는 예측된 단백질 입체형태 도메인을 동정한다. 공지된 3차원 구조로 폴딩하는 단백질 서열을 동정하는 방법이 공지되어 있다. 문헌 [Bowie et al., Science 253: 164(1991)]을 참조한다. 따라서, 상기 예는, 당업자라면 본원에 기재된 항체에 따라 구조적 도메인 및 작용성 도메인을 한정하는 데 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 입체형태를 인식할 수 있음을 입증한다.

<198> 항원 결합 부위는 일반적으로 중쇄(VH) 및 경쇄 가변(VL) 면역글로불린 도메인에 의해 형성되고, 항원 결합 표면은 상보성 결정 영역(CDR)으로도 칭해지는 6개의 표면 폴리펩티드 루프에 의해 형성된다. 프레임워크 영역(FR)과 함께, 각 VH(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 각 VLL CDR1, LCDR2, LCDR3)에는 3개의 CDR이 있다.

<199> 전형적으로, VH 도메인은 VL 도메인과 쌍을 이루어 항체 항원 결합 부위를 제공하나, VH 또는 VL 도메인 단독을 이용하여 항원에 결합할 수 있다. VH 도메인(표 4 참조)은 VL 도메인(표 5 참조)과 쌍을 이루어, VH 및 VL 도메인 모두를 포함하는 항체 항원 결합 부위가 형성되도록 할 수 있다. 유사한 실시양태들이 본원에 개시된 다른 VH 및 VL 도메인에 대해 제공된다. 다른 실시양태에서, 표 4에서의 VH 사슬은 표 5에서의 이종성 VL 도메인과 쌍을 이룬다. 경쇄 혼잡(promiscuity)이 당업계에 잘 확립되어 있다. 이에 대해서, 역시 유사한 실시양태가 본원에 개시된 다른 VH 및 VL 도메인에 대해 본 발명에 의해 제공된다. 따라서, 표 4에서의 항체 사슬의 모 항체 사슬 또는 임의의 사슬 사슬의 VH이 표 5에서의 항체 또는 다른 항체의 모 항체 또는 임의의 항체와 쌍을 이룰 수 있다.

<200> 항원 결합 부위는 H 및/또는 L CDR 내에 개시된 세트의 20개, 16개, 10개, 9개, 또는 보다 적은 개수, 예를 들어 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 개수의 아미노산 부가, 치환, 결실, 및/또는 삽입을 갖는, 표 1에서의 항체의 모 항체 또는 임의의 항체의 한 세트의 H 및/또는 L CDR을 포함할 수 있다. 대안적으로, 항원 결합 부위는 개시된 세트의 H 및/또는 L CDR 내에 20개, 16개, 10개, 9개, 또는 보다 적은 개수, 예를 들어 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 개수의 아미노산 치환을 갖는, 표 1에서의 항체의 모 항체 또는 임의의 항체의 한 세트의 H 및/또는 L CDR을 포함할 수 있다.

<201> 바람직한 아미노산 치환은, (1) 단백질분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키며, (3) 결합 친화도를 변경하여 단백질 착물을 형성하고, (4) 그러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 작용적 성질을 부여하거나 변형시키거나, 여전히 ErbB2에 대한 특이적 결합을 보유하는 것들이다. 유사체는 천연 발생하는 펩티드 서열과 다른 서열의 각종 뮤테인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다중 아미노산 치환(바람직하게는 보존적 아미노산 치환)이 정상적으로 발생하는 서열(바람직하게는 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩티드의 부분)에서 일어날 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 모 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시키지 않아야 한다(예를 들어, 치환 아미노산은 모 서열에서 일어나는 나선을 파괴시키거나 모 서열을 특징화하는 다른 유형의 2차 구조를 붕괴하는 경향이 없어야 한다). 당업계에 인식된 폴리펩티드의 2차 및 3차 구조의 예가, 본원에 참조 인용되는 문헌 [Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984))]; 문헌 [Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991))]; 및 문헌 [Thornton et al., Nature 354:105(1991)]에 기재되어 있다.

<202> 본 발명의 다른 한 측면은 표 1에 열거된 항체, 첨부된 서열 목록, 본원에 기재된 항체의 VH 도메인, 또는 표 4 또는 표 4(a)에 나와 있는 HCDR(예를 들어, HCDR1, HCDR2 또는 HCDR3)과 적어도 약 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 가지는 VH 도메인을 포함하는 항체 분자이다. 항체 분자는 또한 표 1에 열거된 항체 중 임의의 항체, 첨부된 서열 목록, 본원에 기재된 항체, 또는 표 5에 나와 있는 LCDR(예를 들어, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3)의 VL 도메인과 적어도 약 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 가지는 VL 도메인을 임의적으로 포함할 수 있다. 2개의 아미노산 서열의 % 동일성을 계산하는 데 사용될 수 있는 알고리즘은 예를 들어 디폴트 파라미터를 이용하는, 예를 들어 BLAST(문헌 [Altschul et al.(1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410]), FASTA(문헌 [Pearson and Lipman(1988) PNAS USA 85: 2444-2448]),

또는 스미쓰-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘(문헌 [Smith and Waterman(1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197]))을 포함한다.

- <203> 또한, 당해 아미노산 서열이 본원에 나와 있고 ERBB2에 대한 항체 및 표적화된 결합체에 이용될 수 있는 것들을 포함한, 본 발명의 VH 및 VL 도메인 및 CDR의 변이체는, 서열 변경하거나 돌연변이하고 요망되는 특성을 있는 항원 표적화에 대해 스크리닝하는 방법에 의해 수득될 수 있다. 요망되는 특성의 예에는, 항원에 대해 특이적인 공지된 항체에 대한 항원의 증가된 결합 친화도; 활성이 공지된 경우, 항원에 대해 특이적인 공지된 항체에 대한 항원 활성의 증가된 중성화; 특정 몰비로의 항원에 대한 공지된 항체 또는 리간드와의 특정된 경쟁적 능력; 착체를 면역석출하는 능력; 특정된 에피토프에의 결합 능력; 본원에 기재된 바와 같은 펩티드-결합 스캔을 이용하여, 예를 들어 선형 및/또는 제한된 입체형태로 스크리닝된 펩티드를 이용하여 동정되는, 선형 에피토프; 비연속 잔기에 의해 형성되는 입체형태적 에피토프; ERBB2 또는 다운스트림 분자의 신규 생물학적 활성을 조절하는 능력이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 그러한 방법들도 또한 본원에 제공된다.
- <204> 본원에 개시된 항체 분자의 변이체를 생성시켜, 본 발명에 사용할 수 있다. 구조/성질-활성 관계에 대한 다변량 데이터 분석 기법을 적용함에 있어 연산 화학의 리드를 따라(문헌 [Wold, et al., Multivariate Data Analysis in chemistry. Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry(Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984]), 공지된 수학적 기법, 예컨대 통계학적 회귀, 패턴 인식 및 분류(문헌 [Norman et al., Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition(April 1998)]; 문헌 [Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995)]; 문헌 [Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective(Oxford Statistic Science Series, No 22(Paper)). Oxford University Press; (December 2000)]; 문헌 [Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999)]; 문헌 [Denison David G. T.(Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Method for Nonlinear Classification and Regression(Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002)]; 문헌 [Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery]))를 이용하여, 정량적 활성-성질 관계를 유도할 수 있다. 항체 서열의 실험적 모델 및 이론적 모델(예를 들어, 가능한 접촉 잔기 또는 계산된 물리화학적 성질의 분석), 작용적 및 3차원적 구조로부터 항체의 성질을 유도할 수 있고, 이 성질들은 단독으로 또한 조합되어 고려될 수 있다.
- <205> 이러한 서열-구조 관계의 연구는 공지된 서열의 항체 내의 상기 잔기, 다만 자체의 CDR의 3차원 구조를 유지하는 데 중요하고 이에 따라 결합 특이성을 유지하는, 공지되지 않은 3차원 구조를 예측하는 데 사용될 수 있다. 이 예측은 리드 최적화 실험으로부터의 산출 결과와 그 예측을 비교함으로써 지지될 수 있다. 구조적 방법에서, 모델은 임의의 자유롭게 이용가능하거나 상업적인 패키지, 예컨대 WAM를 이용하여 항체 분자로 생성될 수 있다. 이어서, 단백질 가시화 및 분석 소프트웨어 패키지, 예컨대 인사이트(Insight) II(어셀리즈 인코포레이티드(Accelrys, Inc.)) 또는 딥 뷰(Deep View)를 사용하여, CDR 내 각 위치에서의 가능한 치환을 평가할 수 있다. 이어서, 이 정보를 사용하여, 치환이 활성에 대해 최소의 또는 유익한 영향을 미치지 않도록 할 수 있다.
- <206> CDR, 항체 VH 또는 VL 도메인 및/또는 표적화된 결합체의 아미노산 서열 내 치환을 행하는 데 요구되는 기법은 일반적으로 당업계에서 이용가능하다. 활성에 대해 최소의 또는 유익한 영향을 미치는 것으로 예측되거나 되지 않을 수 있는 치환으로 변이체 서열이 만들어질 수 있고, 표적에의 결합 및/또는 중성화 능력, 및/또는 임의의 다른 요망되는 성질에 대해 시험할 수 있다.
- <207> 논의된 바와 같이, 서열이 본원에 구체적으로 개시된 VH 및 VL 도메인 중 임의의 것의 가변 도메인 아미노산 서열 변이체가 본 발명에 따라 이용될 수 있다.
- <208> 본원에 사용되는 "표지" 또는 "표지된"이란 용어는 항체 또는 표적화된 결합체에 또 다른 분자가 도입됨을 지칭한다. 한 실시양태에서, 표지는 검출가능한 마커, 예를 들어 방사성표지 아미노산의 도입, 또는 표지된 아비딘(예를 들어, 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타아비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 부분의 폴리펩티드에의 결합이다. 또 다른 실시양태에서, 표지 또는 마커는 치료제, 예를 들어 약물 접합체 또는 독소일 수 있다. 폴리펩티드 및 당단백질의 각종 표지 방법들이 당업계에 공지되어 있고, 사용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예에는, 방사성동위원소 또는 방사핵(예를 들어, 3H, 14C, 15N, 32P, 33P, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I), 형광 표지(예를 들어, FITC, 로

다민, 란탄족 인광체), 효소 표지(예를 들어, 호스레디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광성 마커, 비오틴yl 기, 2차 리포터에 의해 인식되는 소정의 폴리펩티드 에피토프(예를 들어, 루이신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그), 자기 작용제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트, 독소, 예컨대 백일해 독소, 탁술, 사이토카라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미토잔트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀올, 및 푸로마이신 및 그것의 유사체 또는 상동체가 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 표지는 각종 길의 스페이서 암(spacer arm)에 의해 결합되어, 잠재적 입체 장애를 감소시킨다.

<209> 본원에 사용되는 "표적화된 결합제"는 표적 부위에 우선적으로 결합하는 작용제, 예를 들어 항체 또는 그것의 결합 단편이다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합제는 단지 하나의 표적 부위에 대해서만 특이적이다. 다른 실시양태에서, 표적화된 결합제는 하나 초과 표적 부위에 대해 특이적이다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합제는 단클론성 항체일 수 있고, 표적 부위는 에피토프일 수 있다. 이하 기재된 바와 같이, 표적화된 결합제는 항원의 1개 이상의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있는데, 여기에서 상기 도메인은 이중성 단백질 스카폴드, 예를 들어 비-항체 단백질 스카폴드 내에 융합되거나 함유된다.

<210> 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, "포함하다(주어 복수)", 또는 그것의 변형 표현, 예컨대 "포함하다(주어 단수)" 또는 "포함하는"이란 용어는 표시된 정수 또는 정수 군을 포함함을 의미하나, 임의의 다른 정수 또는 정수 군도 배제하지 않음을 이해할 것이다.

<211> 인간 항-ErbB2 항체 및 그것의 특징화

<212> 한 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 표적화된 결합제를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항-ErbB2 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 신호 서열, 아미노산 1-22(유전자은행 ID: P04626)(서열번호 45)없이 인간 ErbB2에 결합하는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 인간 항-ErbB2 항체는 인간 번역글로불린 유전자를 포함하는 계통을 갖는 인간 이외의 트랜스게닉 동물, 예를 들어 설치류를 번역화함으로써 생성되고, 이에 상기 트랜스게닉 동물은 인간 항체를 생성한다.

<213> 본 발명의 항-ErbB2 항체는 인간 카파 또는 인간 람다 경쇄, 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 카파 경쇄를 포함하는 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인(VL)은 부분적으로 인간 VK1, VK2 또는 VK4 계열 유전자에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 경쇄는 인간 VK A1, VK A2, VK B3, 또는 VK L1 유전자를 이용한다.

<214> 각종 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인은 인간 A2 유전자 및 인간 JK1 유전자; 인간 L1 유전자 및 인간 JK5 유전자; 인간 B3 유전자 및 인간 JK3 유전자; 또는 인간 A1 유전자 및 인간 JK4 유전자를 이용한다.

<215> 일부 실시양태에서, ErbB2 항체의 VL은 인간 유전자의 배선 아미노산 서열에 대한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 VL은 배선 아미노산 서열에 대한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 VL은 배선 아미노산 서열에 대한 0, 1 또는 2개의 아미노산 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배선으로부터의 상기 치환들 중 하나 이상은 경쇄의 CDR 영역 내에 있다. 일부 실시양태에서, 배선에 대한 아미노산 치환은 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 VL 중 어느 하나에서의 배선에 대한 치환과 동일한 위치들 중 하나 이상에 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-ErbB2 항체의 VL는 항체 1.14의 VL 내에서 발견되는 배선 대비의 하나 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있거나, 항체 1.18의 VL 내에서 발견되는 배선 대비의 아미노산 치환들 중 하나 이상이 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화는 동일한 위치들 중 하나 이상에 있으나, 기준 항체 내 상이한 치환을 수반한다.

<216> 일부 실시양태에서, 배선에 대한 아미노산 변화는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3의 VL 중 임의의 것에서와 동일한 위치들 중 하나에서 일어나, 변화는 기준 항체의 아미노산에 대한 상기 위치(들)에서의 보존적 아미노산 치환을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 이 항체 중 하나에서의 특별한 위치가 배선에 대해 변화되고 글루타메이트인 경우, 그 통상인은 위치를 아스파르트레이트로 치환할 수 있다. 유사하게,

배선 대비 아미노산 치환이 세린인 경우, 세린을 트레오닌으로 보존적으로 치환할 수 있다. 보존적 아미노산 치환이 상기 논의되어 있다.

- <217> 일부 실시양태에서, 인간 항-ErbB2 항체의 경쇄는 항체 1.44.1(서열번호 4), 1.140(서열번호 8), 1.43.1(서열번호 12), 1.14.1(서열번호 16), 1.100.1(서열번호 20), 1.96.2(서열번호 24), 1.18.1(서열번호 28), 1.20.1(서열번호 32), 1.39.1(서열번호 36), 1.24.3(서열번호 40), 1.71.3(서열번호 44)의 VL 아미노산 서열, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개 이하의 보존적 아미노산 치환 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 상기 아미노산 서열을 포함한다.
- <218> 특정 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 경쇄는 항체 1.44.1(서열번호 4), 1.140(서열번호 8), 1.43.1(서열번호 12), 1.14.1(서열번호 16), 1.100.1(서열번호 20), 1.96.2(서열번호 24), 1.18.1(서열번호 28), 1.20.1(서열번호 32), 1.39.1(서열번호 36), 1.24.3(서열번호 40), 1.71.3(서열번호 44)로부터 선택되는 항체의 VL 영역의 아미노산을 포함하는 항체의 경쇄 CDR 1, CDR2 및 CDR3 영역, 또는 4개 미만 또는 3개 미만의 보존적 아미노산 치환 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 아미노산 치환을 각기 갖는 상기 CDR 영역을 포함한다.
- <219> 중쇄와 관련하여, 일부 실시양태에서, 가변 도메인(VH)은 부분적으로 인간 VH3 또는 VH4 계열 유전자에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 중쇄 VH는 인간 VH3-21, VH3-13, VH4-31 또는 VH3-7 유전자를 이용한다. 각종 실시양태에서, 중쇄 VH는 인간 VH3-21 유전자, 인간 D5-24 유전자 및 인간 JH4B 유전자를 이용한다. 다른 실시양태에서, 중쇄 VH는 인간 VH3-7 유전자, 및 인간 JH6; 인간 VH4-31 유전자, 인간 D3-10 유전자 및 인간 JH6B 유전자; 또는 인간 VH3-13 유전자, 인간 D6-19 유전자 및 인간 JH6B 유전자를 이용한다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 VH 서열은 배선 아미노산 서열에 대한 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입(부가)을 포함한다.
- <220> 일부 실시양태에서, 중쇄의 가변 도메인은 배선 아미노산 서열로부터의 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 돌연변이를 포함하고; 이 중 0, 1, 2 또는 3개는 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중쇄의 가변 도메인은 배선 아미노산 서열 대비의 0, 1, 2 또는 3개의 부가를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이(들)는 배선 아미노산 서열 대비의 비-보존적 치환이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 중쇄의 CDR 영역 내에 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화는 항체 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 143.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 또는 1.148의 VH 중 어느 하나 이상에서의 배선으로부터의 돌연변이와 동일한 위치들 중 하나 이상에서 행해진다. 다른 실시양태에서, 아미노산 변화는 기준 항체에서와 동일한 위치들 중 하나 이상에 있으나, 상이한 돌연변이를 수반한다.
- <221> 일부 실시양태에서, 중쇄는 항체 1.44.1(서열번호 2), 1.140.1(서열번호 6), 1.43.1(서열번호 10), 1.14.1(서열번호 14), 1.100.1(서열번호 18), 1.96.2(서열번호 22), 1.18.1(서열번호 26), 1.20.1(서열번호 30), 1.39.1(서열번호 34), 1.24.3(서열번호 38), 1.71.3(서열번호 42)의 VH 아미노산 서열; 또는 1, 2, 3, 4, 6, 8 또는 10개 이하의 보존적 아미노산 치환 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 상기 VH 아미노산 서열을 포함한다.
- <222> 일부 실시양태에서, 중쇄는 항체 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 143.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 또는 1.148의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역, 또는 5개 미만, 4개 미만, 3개 미만, 또는 2개 미만의 보존적 아미노산 치환 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 아미노산 치환을 각기 가지는 상기 CDR 영역을 포함한다.
- <223> 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 개시된 바와 같은 경쇄 및 상기 개시된 바와 같은 중쇄를 포함한다. 다른 실시양태에서, 경쇄 CDR 및 중쇄 CDR은 동일한 항체로부터의 것이다.
- <224> 일어날 수 있는 한 유형의 아미노산 치환은, 화학적으로 반응성일 수 있는 항체 내 하나 이상의 시스테인을 또 다른 잔기, 예컨대 비제한적 예로서 알라닌 또는 세린로 변화시키는 것이다. 한 실시양태에서, 비-정준(non-canonical) 시스테인의 치환이 있다. 치환은 항체의 가변 도메인 또는 불변 도메인 내의 CDR 또는 프레임워크 영역에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스테인은 정준이다.
- <225> 일어날 수 있는 또 다른 유형의 아미노산 치환은 항체 내 임의의 잠재적 단백질분해 부위를 변화시키는 것이다. 그러한 부위는 항체의 가변 도메인 또는 불변 도메인 내의 CDR 또는 프레임워크 영역에서 일어날 수 있다. 시스테인 잔기의 치환 및 단백질분해 부위의 제거는 항체 산물 내 임의의 이질성의 위험을 감소시키고, 이에 따라 그것의 동질성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 유형의 아미노산 치환은 잔기 중 하나 또는 양자 모두를 변경함으

로써, 잠재적 탈아미드화 부위를 형성하는 아스파라긴-글리신 쌍을 제거한다. 또 다른 유형의 아미노산 치환은 메티오닌 잔기에서 일어나며, 이에 산화 부위가 제거된다.

<226> 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-ErbB2 항체의 중쇄의 C-말단 리신이 절단된다. 본 발명의 각종 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 중쇄 및 경쇄는 신호 서열을 임의적으로 포함할 수 있다.

<227> 한 측면에서, 본 발명은 억제성 인간 항-ErbB2 단클론성 항체 및 이를 생성하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다. 표 1은 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 코딩하는 핵산의 서열 식별자(서열번호), 및 이에 상응하는 도출된 아미노산 서열을 열거한다.

<228> [표 1]

<229>

| 인간 항-ErbB2 항체 | | | | |
|---------------|------------------|-----|-----|-----|
| 단클론성 항체 | 서열 식별자 (서열번호) | | | |
| | 가변 도메인-포함 부분 | | | |
| | 중 | | 경 | |
| | DNA | 단백질 | DNA | 단백질 |
| 1.44.1 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1.140 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1.43 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1.14.1 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 1.100.1 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 1.96 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 1.18.1 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| 1.20 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| 1.39 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| 1.24 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 1.71.3 | 41 | 42 | 43 | 44 |

<230> 항-ErbB2 항체의 부류 및 하위부류

<231> 당업계에 공지된 항-ErbB2 항체의 부류 및 하위부류는 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 항체의 부류 및 하위부류는 항체의 특정 부류 및 하위부류에 대해 특이적인 항체를 이용하여 결정될 수 있다. 그러한 항체는 상업적으로 입수가능하다. 부류 및 하위부류는 ELISA, 또는 웨스턴 블롯(Western Blot)뿐만 아니라 기타 다른 기법에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 부류 및 하위부류는, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 도메인의 전부 또는 일부를 시퀀싱하고, 이들의 아미노산 서열을 면역글로불린의 각종 부류 및 하위부류의 기지의 아미노산 서열과 비교하며, 항체의 부류 및 하위부류를 결정함으로써, 결정될 수 있다.

<232> 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 단클론성 항체이다. 항-ErbB2 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD 분자일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 IgG이고, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 하위부류이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 하위부류 IgG2이다(문헌 [Kabat et al.(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Washington, DC]을 참조한다).

<233> 항-ErbB2 표적화된 결합제 및 항체의 ErbB2에 대한 결합 친화도

<234> 본 발명의 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 높은 친화도로 ErbB2에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 고해상 바이오코어 분석을 이용하여 13.5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 ErbB2에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 고해상 바이오코어 분석을 이용하여, $13. \times 10^{-9}$ M, $13. \times 10^{-9}$ M, $11. \times 10^{-9}$ M, $12. \times 10^{-9}$ M, $10. \times 10^{-9}$ M, $5. \times 10^{-9}$ M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-9} M 또는 5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 ErbB2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로부터 선택되는 항체와 실질적으로 동일한 K_D

로 ErbB2에 결합한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 또는 42에서 발견되는 V_H 영역의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인, 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44에서 발견되는 V_L 영역의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인, 또는 양자 모두를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 K_D로 ErbB2에 결합한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44에서 발견되는 V_L 영역의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인의 CDR 영역을 포함하거나, 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 또는 42에서 발견되는 V_H 영역의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인의 CDR 영역을 포함하거나, 양자 모두를 포함하는 표적화된 결합제 및/또는 항체와 실질적으로 동일한 K_D로 ErbB2에 결합한다.

<235> 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 낮은 해리 속도 상수(k_{off})를 가진다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 1.0×10⁻³ s⁻¹ 이하의 k_{off}, 또는 5.0×10⁻⁴ s⁻¹ 이하의 k_{off}를 가진다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 2×10⁻⁴ s⁻¹ 이하의 k_{off}로 ErbB2에 결합한다. 일부 실시양태에서, k_{off}는 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3로부터 선택되는 항체를 포함한, 본원에 기재된 항체와 실질적으로 동일하다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄의 CDR 영역 또는 경쇄의 CDR 영역, 또는 양자 모두를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 k_{off}로 ErbB2에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 또는 42에서 발견되는 V_H 영역의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인, 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44에서 발견되는 V_L 영역의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인, 또는 양자 모두를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 k_{off}로 ErbB2에 결합한다.

<236> 표적화된 결합제 및 항-ErbB2 항체의 ErbB2에 대한 결합 친화도 및 해리 속도는 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도는 ELISA, RIA, 유세포분석, 표면 플라즈몬 공명, 예컨대 비아코어™에 의해 결정될 수 있다. 해리 속도는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게, 결합 친화도 및 해리 속도는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된다. 보다 바람직하게, 결합 친화도 및 해리 속도는 비아코어™에 의해 측정된다. 통상인은 당업계에 공지된 방법을 이용함으로써 항-ErbB2 항체와 실질적으로 동일한 K_D를 가지는지의 여부를 결정할 수 있다. 실시예 12는 유세포분석에 의해 항-ErbB2 단클론성 항체의 친화도를 결정하는 방법을 예시한다.

<237> 항-ErbB2 항체에 의해 인식되는 ErbB2 에피토프의 동정

<238> 본 발명은 ErbB2에 결합하고 하기 항체들과 동일한 에피토프와 경쟁하거나, 그와 경쟁하고/하거나 그에 결합하는 표적화된 결합제 및/또는 인간 항-ErbB2 단클론성 항체를 제공한다: (a) 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3로부터 선택되는 항체; (b) 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 또는 42에서 발견되는 가변 도메인의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체, (c) 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44의 가변 도메인의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체, 또는 (d) (b)에 정의된 바와 같은 중쇄 가변 도메인 및 (c)에 정의된 바와 같은 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체. 두 항체가 ErbB2에 결합하기 위해 서로 간에 상호 경쟁할 경우, 이들은 경쟁한다고 칭해진다.

<239> 통상인은 당업계에 공지된 방법을 이용하여, 표적화된 결합제 및/또는 항체가 동일한 에피토프에 결합하거나, 항-ErbB2 항체와 결합하기 위해 경쟁하는지의 여부를 결정할 수 있다. 한 실시양태에서, 통상인은 본 발명의 항-ErbB2 항체가 포화 조건 하에서 ErbB2에 결합하도록 한 후, 시험 화합물이 ErbB2에 결합하는 능력을 측정한다. 시험 항체가 항-ErbB2 항체와 동시에 ErbB2에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체는 항-ErbB2 항체와 상이한 에피토프에 결합한다. 그러나, 시험 항체가 ErbB2에 동시에 결합할 수 없는 경우, 시험 항체는 동일한 에피토프, 중첩 에피토프, 또는 인간 항-ErbB2 항체에 의해 결합된 에피토프에 매우 근접하게 있는 에피토프에 결합한다. 이 실험은 ELISA, RIA, 비아코어™ 또는 유세포분석에 의해 수행될 수 있다.

- <240> 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체가 또 다른 항-ErbB2 항체와 경쟁하는지의 여부를 시험하기 위해, 통상인은 두 방향으로, 즉 기준 항체가 시험 항체를 차단하는지, 또한 시험 항체가 기준 항체를 차단하는지의 여부를 결정하는 방식으로 상기 기재된 경쟁 방법을 이용할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, ELISA를 이용하여 실험을 수행한다. K_D 의 결정 방법이 이하 추가 논의된다.
- <241> 항-ErbB2 항체에 의한 ErbB2 활성의 억제
- <242> 각종 실시양태들에서, 본 발명은 ErbB2를 통한 신호전달을 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 리간드-유도 신호전달을 억제한다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 리간드의 ErbB2에의 결합을 차단하지 않으면서 ErbB2의 리간드-유도 신호전달을 억제한다. 또 다른 실시양태에서, ErbB2는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 헤레굴린- β 이다. 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체의 EC_{50} 은 ELISA 또는 RIA에 의해, 또는 하기 기재된 것들과 같은 세포-기재 검정법을 통해 모니터링되는 직접 결합 검정법에서 항체의 항원에의 결합을 검출함으로써 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체 또는 그것의 부분은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하의 EC_{50} 로 ErbB2 수용체를 통한 리간드-유도 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 리간드-유도 신호전달을 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 억제율 측정은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다.
- <243> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2의 인산화를 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 각종 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC_{50} 은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하이다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 인산화를 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 실시예 4, 9, 및 11은 ErbB2 인산화 검정법을 예시한다.
- <244> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 MAPK 경로의 활성화를 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 각종 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC_{50} 은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하이다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 인산화를 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 세포 내 MAPK 경로 활성화를 모니터링하기 위한 검정이 당업계에 공지되어 있다(모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조 인용되는 미국 특허 출원 제20030186382호 및 제20030096333호를 참조한다).
- <245> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 p38-TSP-1 경로의 활성을 조절하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 p38-TSP-1 경로를 활성화한다. 다른 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체는 p38-TSP-1 경로를 억제한다. 각종 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC_{50} 은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하이다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 인산화를 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 세포 내 p38-TSP-1 경로 활성화를 모니터링하기 위한 검정이 당업계에 공지되어 있다(모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조 인용되는 미국 특허 출원 제20060089393호 및 제20020103253호를 참조한다).
- <246> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 PI3K 경로의 활성화를 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 각종 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC_{50} 은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하이다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 인산화를 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 세포 내 PI3K 경로의 활성화를 모니터링하기 위한 검정이 당업계에 공지되어 있다(모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조 인용되는 미국 특허 출원 제20020037276호 및 제20040176385호를 참조한다).
- <247> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 CDC2의 억제를 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 각종 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC_{50} 은 50 ng/ml 이하, 바람직하게는 25 ng/ml 이하, 더욱

바람직하게는 10 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 ng/ml 이하이다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2의 인산화를 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 세포 내 CDC2의 억제를 모니터링하기 위한 검정이 당업계에 공지되어 있다(모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조 인용되는 미국 특허 출원 제20030225098호 및 제20040110775호를 참조한다).

<248> 항-ErbB2 항체를 이용한 세포 증식의 억제

<249> 일부 실시양태에 따라, 본 발명은 생체내 또는 시험관내, 또는 양자 모두에서의 암 또는 형질전환된 세포의 증식을 억제하는 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 증식을 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 억제한다. 한 실시양태에서, 인산화는 동물을 항체로 처리하기 시작한 지 적어도 1일 후에 측정되고, 증식은 동물을 항체로 처리하기 시작한 지 적어도 3일 후에 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 억제는 동물을 항체로 처리하기 시작한 지 적어도 1시간 후에 측정된다. 각종 실시양태에서, 세포 역가 또는 증식 마커에 의해 측정되는, 표적화된 결합제 및/또는 항체의 EC₅₀는 3.5 μg/ml 이하, 바람직하게는 300 ng/ml 이하, 더욱 바람직하게는 100 ng/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 50 ng/ml 이하이다. 실시예 9 및 10는 증식 검정법을 예시한다.

<250> 종 및 분자 선택성

<251> 본 발명의 또 다른 측면에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 종 및 분자 선택성 모두를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 인간(서열번호 45) 및 사이노몰거스 ErbB2에 결합한다. 명세서의 교시에 따라, 통상인은 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체에 대한 종 선택성을 결정할 수 있다. 예를 들어, 통상인은 웨스턴 블롯, 유세포분석, ELISA, 면역석출법 또는 RIA를 이용하여 종 선택성을 결정할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 통상인은 유세포분석을 이용하여 종 선택성을 결정할 수 있다.

<252> 일부 실시양태에서, 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체는 ErbB2 외의 임의의 다른 단백질에 대한 임의의 상당한 특이적 결합을 나타내지 않는다. 통상인은 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 ErbB2에 대한 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체의 선택성을 결정할 수 있다. 명세서의 교시에 따라, 통상인은 웨스턴 블롯, 유세포분석, ELISA, 면역석출법 또는 RIA를 이용하여 선택성을 결정할 수 있다.

<253> 항체의 생성 방법 및 항체 생성 세포주

<254> 일부 실시양태에서, 인간 항체는 ErbB2 항원으로 자체 게놈 내 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌의 일부 또는 전부를 포함하는 인간 이외의, 트랜스게닉 동물을 면역화함으로써 생성된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 이외의 동물은 제노마우스(XENOMOUSE)[™] 동물이다. (암젠 프레몬트 인코포레이티드(Amgen Fremont, Inc.)(미국 캘리포니아주 프레몬트 소재)).

<255> 제노마우스[™] 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌의 큰 단편을 포함하는 공학처리된 마우스 계통이고, 마우스 항체 생성에 부족하다. 예를 들어, 문헌 [Green et al., Nature Genetics 7:13-21(1994)] 및 미국 특허 제5,916,771호, 제5,939,598호, 제5,985,615호, 제5,998,209호, 제6,075,181호, 제6,091,001호, 제6,114,598호, 제6,130,364호, 제6,162,963호 및 제6,150,584호를 참조한다. 또한 제WO 91/10741호, 제WO 94/02602호, 제WO 96/34096호, 제WO 96/33735호, 제WO 98/16654호, 제WO 98/24893호, 제WO 98/50433호, 제WO 99/45031호, 제WO 99/53049호, 제WO 00/09560호, 및 제WO 00/037504호를 참조한다.

<256> 또 다른 측면에서, 본 발명은 ErbB2 항원으로 인간 면역글로불린 좌를 포함하는 인간 이외의 트랜스게닉 동물을 면역함으로써 인간 이외의, 마우스의 동물로부터 항-ErbB2 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 통상인은 상기 언급된 문헌에 기재된 방법을 이용하여 상기 동물을 생성시킬 수 있다. 이 문헌들에 개시된 방법은 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제5,994,619호에 기재된 바대로 변형될 수 있다. 미국 특허 제5,994,619호는 돼지 및 소로부터 유래된, 신규의 배양된 내세포체(CICM) 세포 및 세포주, 및 이종성 DNA가 삽입된 트랜스게닉 CICM 세포의 생성 방법을 기재하고 있다. CICM 트랜스게닉 세포를 사용하여, 클로닝된 트랜스게닉 배아, 태아, 및 자손을 생성시킬 수 있다. 미국 특허 제5,994,619호는 또한 이종성 DNA를 그것의 자손에 전달할 수 있는 트랜스게닉 동물의 생성 방법을 기재하고 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 인간 이외의 동물은 포유동물, 특히 래트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말이다.

- <257> 제노마우스™ 마우스는 완전 인간 항체의 성인 유사 인간 레퍼토리를 생성시키고, 항원-특이적 인간 항체를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 제노마우스™ 마우스는 효모 인공 염색체(YAC) 내의 인간 중쇄 좌 및 카파 경쇄 좌의 배선 입체배치 단편의 도입을 통해 인간 항체 V 유전자 레퍼토리의 대략 80%를 함유한다. 다른 실시양태에서, 제노마우스™ 마우스는 인간 람다 경쇄 좌의 대략 모두를 추가로 함유한다. 문헌 [Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156(1997)], 문헌 [Green and Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495(1998)], 및 제 WO 98/24893호를 참조하고, 이들 문헌의 개시내용은 본원에 참조 인용된다. 다른 실시양태에서, 항체는 인간 염색체교차 마우스에서 생성된다(본원에 참조 인용되는 제 WO 02/43478호 및 제WO 02/092812호를 참조한다).
- <258> 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 인간 이외의 동물은 인간 면역글로불린 "미니좌(minilocus)"를 포함하는 동물이다. 미니좌 방법에서, 외인성 Ig 좌는 그 Ig 좌로부터의 개별 유전자를 포함시킴으로써 모방된다. 따라서, 하나 이상의 V_H 유전자, 하나 이상의 D_H 유전자, 하나 이상의 J_H 유전자, mu 불변도메인, 및 제2 불변 도메인(바람직하게는 감마 불변 도메인)이 동물에 삽입하기 위한 작제물로 형성된다. 이 방법은 특히 본원에 참조 인용되는, 미국 특허 제5,545,807호, 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 제5,770,429호, 제5,789,650호, 제5,814,318호, 제5,591,669호, 제5,612,205호, 제5,721,367호, 제5,789,215호 및 제5,643,763호에 기재되어 있다.
- <259> 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간화 항-ErbB2 항체의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 인간 이외의 동물은 항체 생성을 허용하는 조건 하에서 하기 기재된 바와 같은 ErbB2 항원으로 면역화된다. 항체-생성 세포는 동물로부터 단리되고, 하이브리도마를 생성하기 위해 골수종과 융합하며, 항-ErbB2 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산이 단리된다. 이 핵산은 후속하여 당업자에게 공지되고 이하 추가 기재되는 바와 같은 기법을 이용하여 공학처리되어, 인간 이외의 서열의 양을 감소시키는데, 즉 항체를 인간화하여 인간에서의 면역반응을 감소시킨다.
- <260> 일부 실시양태에서, ErbB2 항원은 단리 및/또는 정제된 ErbB2이다. 또 다른 실시양태에서, ErbB2 항원은 인간 ErbB2이다. 일부 실시양태에서, ErbB2 항원은 ErbB2의 단편이다. 일부 실시양태에서, ErbB2 단편은 ErbB2의 세포외 도메인이다. 일부 실시양태에서, ErbB2 단편은 ErbB2의 세포외 루프이다(본원에 참조 인용되는 문헌 [Cho et al., Nature, 2003 Feb 13; 421(6924):756-60]을 참조한다). 일부 실시양태에서, ErbB2 단편은 ErbB2의 1개 이상의 에피토프를 포함한다. 다른 실시양태에서, ErbB2 항원은 ErbB2, 또는 그것의 면역원성 단편을 자체의 표면 상에 발현 또는 과발현하는 세포이다. 일부 실시양태에서, ErbB2 항원은 ErbB2 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, ErbB2는 합성 펩티드 면역원이다.
- <261> 동물의 면역화는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990]를 참조한다. 마우스, 래트, 양, 염소, 돼지, 소 및 말과 같은 인간 이외의 동물의 면역화 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, 이하 상기 기재된 바와 동일함] 및 미국 특허 제5,994,619호를 참조한다. 또 다른 실시양태에서, ErbB2 항원을 아주반트와 함께 투여하여, 면역반응을 자극한다. 예시적 아주반트에는 완전 또는 불완전 프로인트 아주반트, RIBI(무라밀 디펩티드) 또는 ISCOM(면역자극 착체)가 포함된다. 그러한 아주반트는 폴리펩티드를 국소 지역에 격리함으로써 그것을 급속 분산으로부터 보호하거나, 마크로파지 또는 면역계의 다른 성분들에 대해 주화학적 인자를 분비하도록 숙주를 자극하는 물질을 함유할 수 있다. 바람직하게, 폴리펩티드가 투여될 경우, 면역화 스케줄은 폴리펩티드의 2회 이상의 투여, 수주간에 걸친 확산을 수반할 것이다. 실시예 1은 제노마우스™ 마우스 내 항-ErbB2 단클론성 항체의 생성 방법을 예시한다.
- <262> 항체의 생성 및 항체-생성 세포주
- <263> 항체 및/또는 항체-생성 세포가, 동물을 ErbB2 항원으로 면역화한 후, 그 동물로부터 취득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체-함유 혈청은, 동물을 출혈시키거나 희생시킴으로써 그 동물로부터 취득된다. 혈청은 동물로부터 취득된 그대로 사용될 수 있거나, 면역글로불린 분획이 혈청으로부터 취득될 수 있거나, 항-ErbB2 항체가 혈청으로부터 정제될 수 있다.
- <264> 일부 실시양태에서, 항체-생성 불멸화된 세포주가 면역화된 동물로부터 단리된 세포로부터 취득된다. 면역화 후에, 동물을 희생시키고, 림프절 및/또는 비장 B 세포는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 불멸화된다. 세포의 불멸화 방법에는, 세포를 발암유전자로 형질감염하는 방법, 세포를 발암 바이러스로 감염시켜, 이를 불멸화된 세포를 위해 선택하는 조건 하에 배양하는 방법, 세포를 발암물질 또는 돌연변이 화합물에 적용하는 방법,

세포를 불멸화된 세포, 예를 들어 골수종 세포와 융합하는 방법, 및 종양 억제자 유전자를 불활성화하는 방법이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, 이하 상기와 동일함]을 참조한다. 골수종 세포와의 융합을 이용하는 경우, 골수종 세포는 바람직하게는 면역글로불린 폴리펩티드를 분비하지 않는다(비-분비성 세포주). ErbB2, 그것의 부분, 또는 ErbB2 발현 세포를 이용하여 불멸화된 세포를 스크리닝한다. 또 다른 실시양태에서, 효소-결합 면역검정법(ELISA) 또는 방사면역검정법을 이용하여 초기 스크리닝을 수행한다. ELISA 스크리닝의 한 예가 본원에 참조 인용되는 제WO 00/37504호에 제공되어 있다.

- <265> 항-ErbB2 항체-생성 세포, 예를 들어 하이브리도마를 이후 추가 논의된 바와 같이, 선택하고, 클로닝하며, 또한 왕성한 성장, 항체의 높은 생산율 및 요망되는 항체 특성을 포함한 바람직한 특성에 대해 스크리닝한다. 하이브리도마를 동계 동물, 면역계가 결여된 동물, 예를 들어 누드 마우스에서 생체내 확장하거나, 시험관내 세포 배양액에서 확장할 수 있다. 하이브리도마의 선택, 클로닝 및 확장 방법이 당업자에게 공지되어 있다.
- <266> 한 실시양태에서, 면역화된 동물은 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 인간 이외의 동물이고, 비장 B 세포를 인간 이외의 동물과 동일한 종으로부터의 골수종 세포주에 융합한다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 면역화된 동물은 제노마우스의 마우스이고, 골수종 세포주는 비-분비성 마우스 골수종이다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 골수종 세포주는 P3-X63-Ag8.653(미국 미생물 보존센터)이다. 예를 들어, 실시예 2를 참조한다.
- <267> 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 (a) 본원에 기재된 인간 이외의 트랜스게닉 동물을 ErbB2, ErbB2의 부분, 또는 ErbB2를 발현하는 세포 또는 조직으로 면역화하는 단계; (b) 트랜스게닉 동물이 ErbB2에 대한 면역 반응을 개시하도록 하는 단계; (c) 트랜스게닉 동물로부터 항체-생성 세포를 단리하는 단계; (d) 항체-생성 세포를 불멸화하는 단계; (e) 불멸화된 항체-생성 세포의 개별 단클론성 집단을 생성시키는 단계; 및 (f) 불멸화된 항체-생성 세포를 스크리닝하여, ErbB2에 대해 지정된 항체를 동정하는 단계를 포함하는, ErbB2에 대해 지정된 인간 단클론성 항체 또는 그것의 단편을 생성하는 세포주의 생성 방법을 제공한다.
- <268> 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 항-ErbB2 항체를 생성시키는 하이브리도마를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 하이브리도마는 상기 기재된 바와 같은 마우스 하이브리도마이다. 다른 실시양태에서, 하이브리도마는 래트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 인간 이외의, 마우스의 종에서 생성된다. 또 다른 실시양태에서, 하이브리도마는 인간 하이브리도마이다.
- <269> 본 발명의 한 실시양태에서, 항체-생성 세포가 단리되어, 숙주 세포, 예를 들어 골수종 세포에서 발현된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 트랜스게닉 동물을 ErbB2로 면역화하고, 일차 세포, 예를 들어 비장 또는 말초 혈액 세포를 면역화된 트랜스게닉 동물로부터 단리하며, 동정한다. 각 개별 세포로부터의 폴리아데닐화된 mRNA를 단리하고, 역 전사 증합효소 사슬 반응(RT-PCR)을, 가변 영역 서열에 어닐링되는, 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 FR1 영역의 대부분 또는 모두를 인식하는 프라이머를 분해하는 센스 프라이머, 및 불면 또는 연합 영역 서열에 어닐링하는 안티센스 프라이머를 이용하여 수행한다. 이어서, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 cDNA를 클로닝하여, 각각의 면역글로불린 불변 영역, 예컨대 중쇄 및 κ 또는 λ 경쇄 불변 도메인을 갖는 키메라 항체로서 임의의 적당한 숙주 세포에서 발현시킨다. 본원에 참조 인용되는 문헌 [Babcock, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996]을 참조한다. 이어서, 본원에 기재된 바와 같이, 항-ErbB2 항체를 동정하고 단리할 수 있다.
- <270> 또 다른 실시양태에서, 파지 디스플레이 기법을 사용하여, ErbB2에 대한 친화도를 다양하게 하여 항체의 레퍼토리를 함유하는 라이브러리를 제공할 수 있다. 그러한 레퍼토리의 생성을 위해, 면역화된 동물로부터의 B 세포를 불멸화할 필요는 없다. 오히려, 일차 B 세포를 DNA의 공급원으로서 직접 사용할 수 있다. B 세포로부터 수득된, 예를 들어 혈액 또는 비장으로부터 유래된 cDNA의 혼합물을 사용하여, 발현 라이브러리, 예를 들어 *E. 콜라이* (*E. coli*)에 형질감염된 파지 디스플레이 라이브러리를 제조한다. 생성되는 세포를 ErbB2에 대한 면역반응성에 대해 시험한다. 그러한 라이브러리로부터의 높은 친화도 인간 항체의 동정 기법이 본원에 참조로 인용되는, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 13:3245-3260(1994)]; 문헌 [Nissim et al., *ibid*, pp. 692-698] 및 문헌 [Griffiths et al., *ibid*, 12:725-734]에 기재되어 있다. 궁극적으로, 항원에 대한 요망되는 등급의 결합 친화도를 생성시키는 라이브러리로부터의 클론을 동정하고, 그러한 결합을 가능하게 하는 산물을 코딩하는 DNA를 회수하여, 표준 재조합 발현을 위해 조작한다. 파지 디스플레이 라이브러리를 또한 사전 조작된 뉴클레오티드 서열을 이용하여 작제하여, 유사한 방식으로 스크리닝할 수 있다. 일반적으로, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA를 독립적으로 공급하거나 연결하여, 파지 라이브러리에서의 생산을 위한 Fv 유사체를 형성한다. 특정 실시양태에서, 사슬 셔플링(shuffling)을 이용할 수 있다(본원에 참조 인용되는, 문헌 [Kang et al., PNAS(1991) Dec 15;88(24):11120-3]을 참조한다).

- <271> 이어서, 파지 라이브러리를 적절한 클론으로부터 회수된 유전 물질 및 ErbB2에 대한 최대 친화도를 갖는 항체에 대해 스크리닝한다. 또한, 스크리닝의 수행회수는 단리되는 원래의 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다.
- <272> 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 항체의 제조를 위한 재조합 방법
- <273> 핵산
- <274> 본 발명은 또한 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포괄한다. 일부 실시양태에서, 상이한 핵산 분자는 항-ErbB2 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄를 코딩한다. 다른 실시양태에서, 동일한 핵산 분자는 항-ErbB2 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄를 코딩한다. 한 실시양태에서, 핵산은 본 발명의 ErbB2 항체를 코딩한다.
- <275> 일부 실시양태에서, 배선으로부터의 돌연변이의 존재 또는 부재 하에, 경쇄(V_L)의 가변 도메인을 코딩하는 핵산 분자는 인간 V_K B3, V_K L1, V_K A2 또는 V_K A1 유전자, 및 J_K1, J_K3, J_K4 또는 J_K5 유전자를 코딩한다.
- <276> 일부 실시양태에서, 경쇄를 코딩하는 핵산 분자는 배선 아미노산 서열(들)에 대한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 치환 및/또는 0, 1 또는 2개의 삽입을 포함하는 아미노산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 배선 V_K 및 J_K 서열 대비, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 보존적 아미노산 치환 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 치환을 포함하는 V_L 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 치환은 CDR 영역, 프레임워크 영역 또는 불변 도메인에 있을 수 있다.
- <277> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 중 임의의 하나의 V_L에서 발견되는 변이와 동일한 배선 서열 대비 하나 이상의 변이체를 포함하는 V_L 아미노산 서열을 코딩한다.
- <278> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 중 하나의 V_L에서 발견되는 배선 대비, 적어도 3개의 아미노산 치환을 코딩한다.
- <279> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 단클론성 항체 1.44.1(서열번호 4), 1.140(서열번호 8), 1.43.1(서열번호 12), 1.14.1(서열번호 16), 1.100.1(서열번호 20), 1.96.2(서열번호 24), 1.18.1(서열번호 28), 1.20.1(서열번호 32), 1.39.1(서열번호 36), 1.24.3(서열번호 40), 1.71.3(서열번호 44), 또는 그것의 변이체 또는 부분의 V_L 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 상기 열거된 항체들 중 하나의 경쇄 CDR을 포함하는 아미노산 서열을 코딩한다.
- <280> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 또는 44 중 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43의 뉴클레오티드 서열, 또는 그것의 부분을 포함한다.
- <281> 일부 실시양태에서, 핵산은 상기 항체의 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 코딩한다.
- <282> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 또는 44 중 어느 하나의 V_L 아미노산 서열, 또는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 중 어느 하나의 V_L 영역의 V_L 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 V_L 아미노산 서열을 코딩한다. 본 발명의 핵산 분자는 고도로 엄격한 조건 하에서, 예컨대 상기 기재된 것들을 서열번호 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44에서 발견되는 V_L 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화하거나, 서열번호 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39 또는 43에서 발견되는 V_L 영역을 코딩하는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 가지는 핵산을 포함한다.
- <283> 또 다른 실시양태에서, 핵산은 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로부터 선택되는 항체의 전장 경쇄를 코딩한다.

- <284> 또 다른 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는 인간 V_H 3-21, 인간 V_H 3-7, 인간 V_H 4-31, 또는 인간 V_H 3-13 유전자 서열 또는 이로부터 유래된 서열을 포함하는 중쇄(V_H)의 가변 도메인을 코딩한다. 각종 실시양태에서, 핵산 분자는 인간 V_H3-7 유전자, 및 인간 J_H6; 인간 V_H4-31 유전자, 인간 D3-10 유전자 및 인간 J_H6B 유전자; 또는 인간 V_H3-13 유전자, 인간 D6-19 유전자 및 인간 J_H6B 유전자를 이용한다.
- <285> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 인간 V, D 및 J 유전자의 배선 아미노산 서열 대비, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 개의 돌연변이를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 돌연변이 중 0, 1, 2 또는 3개는 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 돌연변이는 V_H 영역 내에 있다. 일부 실시양태에서, 상기 돌연변이는 CDR 영역 내에 있다.
- <286> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 단클론성 항체 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 143.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 또는 1.148의 V_H에서 발견되는 아미노산 돌연변이와 동일한, 배선 서열 대비, 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 상기 열거된 단클론성 항체 중 하나에서 발견되는 적어도 3개의 아미노산 돌연변이와 동일한 배선 서열 대비, 적어도 3개의 아미노산 돌연변이를 코딩한다.
- <287> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 1.44.1(서열번호 2), 1.140.1(서열번호 6), 1.43.1(서열번호 10), 1.14.1(서열번호 14), 1.100.1(서열번호 18), 1.96.2(서열번호 22), 1.18.1(서열번호 26), 1.20.1(서열번호 30), 1.39.1(서열번호 34), 1.24.3(서열번호 38), 1.71.3(서열번호 42)로부터 선택되는 항체의 V_H 아미노산 서열, 그것의 변이체 또는 보존적 아미노산 돌연변이 및/또는 총 3개 이하의 비-보존적 아미노산 치환을 가지는 상기 서열의 적어도 일부분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 각종 실시양태에서, 서열은 하나 이상의 CDR 영역, 바람직하게는 CDR3 영역, 3개 모두의 CDR 영역, 또는 전체의 V_H 영역을 코딩한다.
- <288> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 및 42 중 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 또는 41의 뉴클레오티드 서열의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 부분은 V_H 영역, CDR3 영역 또는 3개 모두의 CDR 영역을 코딩한다.
- <289> 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 또는 42 중 어느 하나의 V_H 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 V_H 아미노산 서열을 코딩한다. 본 발명의 핵산 분자는 고도로 엄격한 조건 하에서, 예컨대 상기 기재된 핵산을 서열번호 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 또는 41의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 그것의 V_H 영역에 혼성화하거나, 서열번호 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 또는 41의 뉴클레오티드 서열을 가지나 그것의 V_H 영역을 코딩하는 핵산을 포함한다.
- <290> 또 다른 실시양태에서, 핵산은 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로부터 선택되는 항체의 전장 중쇄를 코딩한다.
- <291> 항-ErbB2 항체 또는 그것의 부분의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 핵산 분자는 상기 핵산을 생산하는 임의의 공급원으로부터 단리될 수 있다. 각종 실시양태에서, 핵산 분자는 ErbB2로 면역화된 동물, 항-ErbB2 항체를 발현하는 상기와 같은 B 세포로부터 유래된 불멸화된 세포로부터, 또는 박테리오파지로부터 단리된 B 세포로부터 단리된다. 항체를 코딩하는 mRNA의 단리 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al.]를 참조하고, mRNA를 사용하여 증합효소 사슬 반응(PCR) 또는 항체 유전자의 cDNA 클로닝에 사용하기 위한 cDNA를 생성시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 인간 이외의 트랜스게닉 동물로부터의 인간 면역글로불린-생성 세포를 자체의 융합 파트너로서 가지는 하이브리도마로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 면역글로불린 생성 세포는 제노마우스TM 동물로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 면역글로불린-생성 세포는 상기 기재된 바와 같은 인간 이외의, 마우스의 트랜스게닉 동물로부터의 것일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 인간 이외의, 비-트랜스게닉 동물로부터 단리된다. 인간 이외의, 비-트랜스게닉 동물로부터 단리된 핵산 분자는, 예를 들어 인간화 항체를 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 핵산은 세균 또는 파지로부터 단리된다.

- <292> 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-ErbB2 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산은 임의의 공급원으로부터의 중쇄 불변 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 인-프레임 결합된 본 발명의 V_H 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 항-ErbB2 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 분자는 임의의 공급원으로부터의 경쇄 불변 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 인-프레임 결합된 본 발명의 V_L 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- <293> 본 발명의 다른 한 측면에서, 중쇄(V_H) 및/또는 경쇄(V_L)의 가변 도메인을 코딩하는 핵산 분자는 전장 항체 유전자로 "전환된다". 한 실시양태에서, V_H 또는 V_L 도메인을 코딩하는 핵산 분자는 중쇄 불변(C_H) 또는 경쇄 불변(C_L) 도메인을 각기 이미 코딩하는 발현 벡터로의 삽입에 의해 전장 항체 유전자로 전환되어, V_H 세그먼트가 벡터 내에서 C_H 세그먼트(들)에 작용적으로 연결되고/되거나, V_L 세그먼트가 벡터 내에서 C_L 세그먼트에 작용적으로 연결된다. 또 다른 실시양태에서, V_H 및/또는 V_L 도메인을 코딩하는 핵산 분자는, V_H 및/또는 V_L 도메인을 코딩하는 핵산 분자를 표준 분자 생물학 기법을 이용하여 C_H 및/또는 C_L 도메인을 코딩하는 핵산 분자로 전환함으로써, 결합, 예를 들어 결합에 의해 전장 항체 유전자로 전환된다. 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 불변 도메인 유전자의 뉴클레오티드 서열이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991]을 참조한다. 이어서, 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 핵산 분자가 그것이 도입된 세포로부터 발현될 수 있고, 항-ErbB2 항체가 단리될 수 있다.
- <294> 핵산 분자를 사용하여, 다량의 항-ErbB2 항체를 재조합 발현할 수 있다. 핵산 분자를 또한 사용하여, 이하 추가 기재되는 바와 같이, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 단쇄 항체, 면역접합체, 디아보디, 돌연변이화된 항체 및 항체 유도체를 생성할 수 있다. 핵산 분자가 인간 이외의, 비-트랜스게닉 동물로부터 유래되는 경우, 이 또한 이하 기재되는 바와 같이, 핵산 분자가 항체 인간화를 위해 사용될 수 있다.
- <295> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자는 특히 특정 항체 서열에 대한 프로브 또는 PCR 프라이머로서 사용된다. 예를 들어, 핵산을 진단 방법에서의 프로브, 또는 사용될 수 있는 DNA의 영역을 증폭시키기 위한 PCR 프라이머로서 사용하여, 항-ErbB2 항체의 가변 도메인을 코딩하는 부가적 핵산 분자를 단리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 관심 항체의 중쇄 및 경쇄의 고가변성 도메인으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3 (또는 본원에 기재된 바와 같은 그것의 변이체)의 CDR 중 하나 이상의 모두 또는 일부를 코딩한다.
- <296> *벡터*
- <297> 본 발명은 본 발명의 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 중쇄를 코딩하는 핵산 분자, 상기와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 경쇄를 코딩하는 핵산 분자, 또는 양자 모두, 또는 표적화된 결합체를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 융합 단백질, 변형된 항체, 항체 단편, 및 그것의 프로브를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다.
- <298> 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-ErbB2 항체 또는 항원 결합 부분은 상기 기재된 바와 같이 수득된, 부분 길이 또는 전장 경쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 DNA를 발현 벡터에 삽입함으로써 발현되어, 유전자가 전사 및 번역 조절 서열과 같은 필수 발현 조절 서열에 작용적으로 연결되게 된다. 발현 벡터에는 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-결합 바이러스(AAV), 식물 바이러스, 예컨대 꽃양배추 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피솜 등이 포함된다. 항체 유전자가 벡터에 결합되어, 벡터 내의 전사 및 번역 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 자체의 의도된 기능을 수행하게 된다. 사용하는 발현 숙주 세포와 상용적인 발현 벡터 및 발현 조절 서열을 선택한다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 분리된 벡터에 삽입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 양 유전자 모두는 동일한 발현 벡터에 삽입된다. 항체 유전자는 표준 방법(예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보적 제한 부위의 결합, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우에는 블런트 말단 결합)에 의해 발현 벡터에 삽입된다.
- <299> 편리한 벡터는, 임의의 V_H 또는 V_L 서열이 상기 기재된 바와 같이 용이하게 삽입되고 발현될 수 있도록 공학처리된 적절한 제한 부위로, 작용적으로 완전한 인간 C_H 또는 C_L 면역글로불린 서열을 코딩하는 벡터이다. 그러한 벡터에서, 스플라이싱은 통상 삽입된 J 영역 내 스플라이스 도너 부위와 인간 C 도메인에 선행하는 스플라이스 어

셉터 부위 사이에 일어나고, 또한 인간 C_H 엑손 내에서 일어나는 스플라이스 영역에서 일어난다. 폴리아데닐화 및 전사 종결이 코딩 영역의 다운스트림에 있는 천연 염색체 부위에서 일어난다. 재조합 발현 벡터는 또한 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 신호 펩티드가 면역글로불린 사슬의 아미노 말단에 인-프레임 연결되도록, 항체 사슬 유전자가 벡터에 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.

<300> 항체 사슬 유전자에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포 내 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 가진다. 당업자는 조절 서열의 선택을 포함한 발현 벡터의 설계가 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있음을 인식할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현을 위해 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포 내 높은 수준의 단백질 발현을 지정하는 바이러스 요소, 예컨대 레트로바이러스 LTR, 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터의 프로모터 및/또는 인핸서(예컨대, CMV 프로모터/인핸서), 시미안 뱀즈(Simian Vims) 40(SV40)로부터의 프로모터 및/또는 인핸서(예컨대, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스로부터 프로모터 및/또는 인핸서(예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(AdMLP)), 폴리오마 및 강한 포유동물 프로모터, 예컨대 천연 면역글로불린 및 액틴 프로모터를 포함한다. 바이러스 조절 요소 및 그것의 서열의 추가 설명을 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,168,062호, 미국 특허 제4,510,245호 및 미국 특허 제4,968,615호를 참조한다. 식물의 형질전환뿐만 아니라, 프로모터 및 벡터의 설명을 포함한, 식물에서의 항체 발현 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제6,517,529호를 참조한다. 세균 세포 또는 진균 세포, 예를 들어 효모 세포 내 폴리펩티드 발현 방법이 또한 당업계에 공지되어 있다.

<301> 항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 부가적 서열, 예컨대 숙주 세포 내 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제의 기원) 및 선택가능한 마커 유전자를 가질 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호를 참조한다). 예를 들어, 전형적으로 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에서의, 약물, 예컨대 G418, 하이그로마이신 또는 메토타렉세이트에 내성을 부여한다. 바람직한 선택가능한 마커 유전자는 (메토타렉세이트 선택/증폭과 함께 dhfr-숙주 세포에 사용하기 위한) 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자, (G418 선택을 위한) neo 유전자, 및 글루타메이트 합성효소 유전자를 포함한다.

<302> 단백질의 재조합 생성을 위한 방법 및 비-하이브리도마 숙주 세포

<303> 표적화된 결합체 및/또는 항-ErbB2 항체를 코딩하는 핵산 분자, 및 이 핵산 분자를 포함하는 벡터가 적당한 포유동물, 식물, 세균 또는 효모 숙주 세포의 형질감염을 위해 사용될 수 있다. 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의한 것일 수 있다. 이중성 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포에 도입하는 방법이 당업계에 공지되어 있고, 이에 는 텍스트란-매개 형질감염, 인산칼슘 석출, 폴리브렌-매개 형질감염, 원형질체 융합, 전기천공, 리포솜 내 폴리뉴클레오티드(들)의 캡슐화, 및 DNA의 핵 내로의 직접 미세 주입이 포함된다. 또한, 핵산 분자는 바이러스 벡터에 의해 포유동물 세포 내로 도입될 수 있다. 세포의 형질전환 방법이 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 본원에 참조 인용되는, 미국 특허 제4,399,216호, 제4,912,040호, 제4,740,461호 및 제4,959,455호를 참조한다). 예를 들어 아그로박테리움-매개 형질전환, 생탄도(biolistic) 형질전환, 직접 주사, 전기천공 및 바이러스 형질전환을 포함한 식물 세포의 형질전환 방법이 당업계에 공지되어 있다. 세균 및 효모 세포의 형질전환 방법도 또한 당업계에 공지되어 있다.

<304> 발현을 위한 숙주로 이용가능한 포유동물 세포주가 당업계에 공지되어 있고, 이에 는 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection; ATCC)로부터 입수가 가능한 많은 불멸화된 세포주들이 포함된다. 이에 는 특히, 차이니즈 햄스터 난소(Chinese hamster ovary)(CHO) 세포, N50 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 아프리카 푸른 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), A549 세포, 및 다수의 다른 세포주들이 포함된다. 특히 바람직한 세포주는, 어떠한 세포주가 높은 발현 수준을 가지는지를 결정함으로써 선택된다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 곤충 세포주, 예컨대 Sf9 또는 Sf21 세포이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포에 도입할 때, 숙주 세포를 숙주 세포 내 항체의 발현을 허용하기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써, 또는 보다 바람직하게는 항체를 숙주 세포가 성장하는 배양 배지 내에 분비함으로써 생성된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 이용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 식물 숙주 세포에는 예를 들어 니코티아나(Nicotiana), 아라비도시스(Arabidopsis), 개구리밥, 옥수수, 밀, 감자 등이 포함된다. 세균 숙주 세포에는 E. 콜라이 및 스트렙토

마이세스(*Streptomyces*) 종이 포함된다. 효모 숙주 세포에는 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)가 포함된다.

<305> 또한, 생산 세포주로부터의 본 발명의 항체의 발현은 다수의 알려진 기법을 이용하여 증진될 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 유전자 발현 시스템(GS 시스템)이 특정 조건 하에서 발현을 증진시키기 위한 통상적 방법이다. GS 시스템이 유럽 특허 제0 216 846호, 제0 256 055호, 제0 323 997호 및 제0 338 841호와 전체적으로 또는 부분적으로 관련되어 논의된다.

<306> 상이한 세포주에 의해 발현되거나 트랜스게닉 동물에서 발현되는 항체는 각기 상이한 당화를 가지기 쉽다. 그러나, 본원에 제공된 핵산 분자에 의해 코딩되거나 본원에 제공된 아미노산 서열을 포함하는 모든 항체는, 항체의 당화와 무관하게, 본 발명의 부분이다.

<307> 트랜스게닉 동물 및 식물

<308> 본 발명의 항-ErbB2 항체는 또한 관심 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열을 위해 트랜스게닉인 포유동물 또는 식물의 발생, 및 이로부터 회수가능한 형태인 항체의 생성을 통해 트랜스게닉 방식으로 생성될 수 있다. 포유동물에서 트랜스게닉 생성과 관련하여, 항-ErbB2 항체가 염소, 소, 또는 다른 포유동물에서 생성되거나, 그들의 모유(milk)로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조 인용되는, 미국 특허 제5,827,690호, 제5,756,687호, 제5,750,172호 및 제5,741,957호를 참조한다. 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린 좌를 포함하는 인간 이외의 트랜스게닉 동물은 상기 기재된 바와 같이 ErbB2 또는 그것의 면역원성 부분으로 면역화된다. 식물에서의 항체의 제조 방법이 예를 들어, 본원에 참조 인용되는, 미국 특허 제6,046,037호 및 제5,959,177호에 기재되어 있다.

<309> 일부 실시양태에서, 인간 이외의 트랜스게닉 동물 또는 식물은 본 발명의 항-ErbB2 항체를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 표준 트랜스게닉 기법에 의해 동물 또는 식물에 도입함으로써 생성된다. 문헌 [Hogan, 및 미국 특허 제6,417,429호, 이하 상기와 동일함]을 참고한다. 트랜스게닉 동물의 제조를 위해 사용되는 트랜스게닉 세포는 배아 줄기 세포 또는 체세포 또는 수정란(fertilized egg)일 수 있다. 트랜스게닉 인간 이외의 유기체는 키메라, 비키메라 이형접합물, 및 비키메라 동형접합물일 수 있다. 예를 들어, 모두 본원에 참조로 인용되는, 문헌 [Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press(1999)]; 문헌 [Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press(2000)]; 및 문헌 [Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press(1999)]를 참조한다. 일부 실시양태에서, 트랜스게닉 인간 이외의 동물은 관심 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 표적화 작제물에 의한 치환 및 표적화된 변형을 가진다. 또 다른 실시양태에서, 트랜스게닉 동물은 ErbB2, 바람직하게는 인간 ErbB2에 특이적으로 결합하는 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 분자를 포함하고 발현한다. 일부 실시양태에서, 트랜스게닉 동물은 단쇄 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체와 같은 변형된 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 항-ErbB2 항체가 임의의 트랜스게닉 동물에서 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 인간 이외의 동물은 마우스, 래트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말이다. 인간 이외의 트랜스게닉 동물은 혈액, 모유, 소변, 타액, 눈물, 점액 및 기타 체액에서 상기 코딩된 폴리펩티드를 발현한다.

<310> 파지 디스플레이 라이브러리

<311> 본 발명은 파지 상에서 인간 항체의 라이브러리를 합성하는 단계, ErbB2 또는 그것의 부분을 갖는 라이브러리를 스크리닝하는 단계, ErbB2에 결합하는 파지를 단리하는 단계, 및 파지로부터 항체를 수득하는 단계를 포함하는, 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 생성하는 방법을 제공한다. 예로서, 파지 디스플레이 기법에 사용하기 위한 항체의 라이브러리의 한 제조 방법은 인간 면역글로불린 좌를 갖는 인간 이외의 동물을 ErbB2 또는 그것의 항원성 부분으로 면역화하여 면역 반응을 일으키는 단계, 면역화된 동물로부터 항체-생성 세포를 추출하는 단계; 추출된 세포로부터 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 RNA를 단리하고, RNA를 역전사하여 cDNA를 생성하며, 프라이머를 이용하여 cDNA를 증폭시키고, cDNA를 파지 디스플레이 벡터에 삽입시켜, 항체가 파지 상에 발현되도록 하는 단계를 포함한다. 본 발명의 재조합 항-ErbB2 항체는 이러한 식으로 수득될 수 있다.

<312> 본 발명의 재조합 항-ErbB2 인간 항체는 재조합의 조합 항체 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 바람직하게, 라이브러리는 B 세포로부터 단리된 mRNA로부터 제조된 인간 V_L 및 V_H cDNA를 이용하여 생성된 scFv 파지 디스플레이 라이브러리이다. 그러한 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성시키기 위한 키트가 상업적으로 입수가능하다(예를 들어, 파마시아

(Pharmacia) 제조합 파지 항체 시스템, 카달로그 제27-9400-01호; 및 슈트라타젠(Stratagene) SurfZAP™ 파지 디스플레이 키트, 카달로그 제240612호). 또한, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는 데 사용될 수 있는 다른 방법 및 시약도 있다(예를 들어, 모두 본원에 참조 인용되는 미국 특허 제5,223,409호; PCT 공보 제WO 92/18619호, 제WO 91/17271호, 제WO 92/20791호, 제WO 92/15679호, 제WO 93/01288호, 제WO 92/01047호, 제WO 92/09690호; 문헌 [Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372(1991)]; 문헌 [Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridoma* 3:81-85(1992)]; 문헌 [Huse et al., *Science* 246:1275-1281(1989)]; 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554(1990)]; 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734(1993)]; 문헌 [Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)]; 문헌 [Clackson et al., *Nature* 352:624-628(1991)]; 문헌 [Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580(1992)]; 문헌 [Garrad et al., *Bio/Technology* 9: 1373-1377(1991)]; 문헌 [Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137(1991)]; 및 문헌 [Barbas et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:7978-7982(1991)]를 참조한다).

<313> 한 실시양태에서, 요망되는 특성을 갖는 인간 항-ErbB2 항체를 단리하고 생성하기 위해, 먼저 본원에 기재된 바와 같은 인간 항-ErbB2 항체를 사용하여, 본원에 참조 인용되는 PCT 공보 제WO 93/06213호에 기재된 에피토프 임프린팅 방법을 이용하여, ErbB2에의 유사한 결합 활성을 갖는 인간 중쇄 및 경쇄 서열을 선택한다. 이 방법에 사용되는 항체 라이브러리는 바람직하게 모두 본원에 참조 인용되는, PCT 공보 제WO 92/01047호, 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554(1990)]; 및 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734(1993)]에 기재된 바와 같이 제조되고 스크리닝된 scFv 라이브러리이다. scFv 항체 라이브러리는 바람직하게 항원으로서 인간 ErbB2를 이용하여 스크리닝된다.

<314> 일단 초기 인간 V_L 및 V_H 도메인이 선택되면, 상이한 쌍의 초기 선택된 V_L 및 V_H 세그먼트를 ErbB2 결합에 대해 스크리닝하여 바람직한 V_L/V_H 쌍 조합을 선택하는 "혼합 및 매치" 실험을 수행한다. 부가적으로, 항체의 품질을 더욱 향상시키기 위해, 바람직한 V_L/V_H 쌍(들)의 V_L 및 V_H 세그먼트를, 바람직하게 자연 면역 반응 도중에 항체의 친화도 증진(maturation)을 가능하게 하는 생체내 체세포계 돌연변이 과정과 유사한 과정에서 V_H 및/또는 V_L의 CDR3 영역 내에서 무작위 돌연변이화될 수 있다. 이 시험관내 친화도 증진은 각기 V_H CDR3 또는 V_L CDR3에 상보적인 PCR 프라이머를 이용하여 V_H 및 V_L 도메인을 증폭시킴으로써 달성될 수 있고, 상기 프라이머는 특정 위치에 있는 4개 뉴클레오티드 염기의 무작위 혼합물로 "스파이킹"되어, 생성되는 PCR 산물이 무작위 돌연변이가 V_H 및/또는 V_L CDR3 영역에 도입된 V_H 및 V_L 세그먼트를 코딩하도록 한 것이다. 이 무작위 돌연변이화된 V_H 및 V_L 세그먼트는 ErbB2에의 결합에 대해 다시 스크리닝될 수 있다.

<315> 제조합 면역글로불린 디스플레이 라이브러리로부터 본 발명의 항-ErbB2 항체를 스크리닝하고 단리한 후, 선택된 항체를 코딩하는 핵산을 디스플레이 팩키지(예를 들어, 파지 게놈)으로부터 회수하여, 표준 제조합 DNA 기법에 의해 다른 발현 벡터에 서브클로닝할 수 있다. 원할 경우, 이후 기재되는 바와 같이, 핵산을 추가 조작하여, 본 발명의 또 다른 항체 형태를 생성시킬 수 있다. 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리된 제조합 인간 항체를 발현하기 위해, 항체를 코딩하는 DNA를 제조합 발현 벡터에 클로닝하고, 상기 기재된 바와 같은 포유동물 숙주 세포에 도입한다.

<316> 분류군 스위칭

<317> 본 발명의 또 다른 측면은 항-ErbB2 항체의 부류 또는 하위부류를 또 다른 부류 또는 하위부류로 전환하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, C_L 또는 C_H을 코딩하는 서열을 포함하지 않는 V_L 또는 V_H를 코딩하는 핵산 분자가 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 단리된다. 이어서, 핵산 분자가 요망되는 면역글로불린 부류 또는 하위부류로부터의 C_L 또는 C_H를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작용적으로 연결된다. 이는 상기 기재된 바와 같은, C_L 또는 C_H 사슬을 포함하는 벡터 또는 핵산 분자를 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 원래 IgM이었던 항-ErbB2 항체는 IgG로 분류군 스위칭될 수 있다. 또한, 분류군 스위칭을 이용하여, 한 IgG 하위부류를 또 다른 IgG 하위부류로, 예를 들어 IgG1을 IgG2로 전환할 수 있다. 요망되는 아이소타입을 포함하는 본 발명의 항체를 생산하기 위한 또 다른 방법은 항-ErbB2 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산, 및 항-ErbB2 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산을 단리하는 단계, V_H 영역을 코딩하는 서열을 단리하는 단계, V_H 서열을 요망되는 아이소타입의 중쇄 불변 도메인을 코딩하는 서열에 결합하는 단계, 세포에서 경쇄 유전자 및 중쇄 작제물을 단리하는 단계, 및 요망되는 아이소타입을 갖는 항-ErbB2 항체를 수집하는 단계를 포함한다.

- <318> *탈면역화된 항체*
- <319> 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체를 탈면역화하여, 예를 들어 PCT 공보 제W098/52976호 및 제W000/34317호(본원에 참조 인용됨)에 기재된 기법을 이용하여 그것의 면역원성을 감소시킬 수 있다.
- <320> *돌연변이화된 항체*
- <321> 또 다른 실시양태에서, 핵산 분자, 벡터 및 숙주 세포를 사용하여, 돌연변이화된 항-ErbB2 항체를 제조할 수 있다. 항체를 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인에서 돌연변이하여, 예를 들어 항체의 결합 성질을 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 돌연변이를 CDR 영역 중 하나 이상에서 행하여, ErbB2에 대한 항체의 K_D 를 증가시키거나 감소시켜 k_{off} 를 증가 또는 감소시킬 수 있거나, 항체의 결합 특이성을 변경할 수 있다. 부위-지정 돌연변이유발에서의 기법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al.] 및 문헌 [Ausubel et al.](각기 이하의 상기와 동일함)을 참고한다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이가 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3에서의 배선 대비, 변화되는 것으로 알려진 아미노산 잔기에서 일어날 수 있다. 돌연변이는 불변 도메인 또는 가변 도메인의 CDR 영역 또는 프레임워크 영역에서 일어날 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 가변 도메인에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이는, 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 또는 43에 나타난 뉴클레오티드 서열을 가지거나, 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 및 44로부터 선택된 아미노산 서열의 가변 도메인의 CDR 영역 또는 프레임워크 영역에서의 배선 대비 변화되는 것으로 알려진 아미노산 잔기에서 일어난다.
- <322> 또 다른 실시양태에서, 프레임워크 영역은 생성되는 프레임워크 영역(들)이 상응하는 배선 유전자의 아미노산 서열을 가지도록 돌연변이화된다. 항-ErbB2 항체의 반감기를 증가시키기 위해 돌연변이가 프레임워크 영역 또는 불변 도메인에 일어날 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조 인용되는 PCT 공보 제W0 00/09560호를 참조한다. 항체의 면역원성을 변경하기 위해 프레임워크 영역 또는 불변 도메인 내의 돌연변이가 또한 일어날 수 있고, 이에 또 다른 분자에의 공유 또는 비공유 결합을 위한 부위가 제공되거나, 보체 고정, FcR 결합 및 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)과 같은 성질이 변경된다. 본 발명에 따라, 단일 항체는 가변 도메인의 CDR 또는 프레임워크 영역 중 어느 하나 이상 또는 불변 영역에 돌연변이를 가질 수 있다.
- <323> 일부 실시양태에서, 돌연변이 전에, 항-ErbB2 항체 대비, 돌연변이화된 항-ErbB2 항체의 V_H 또는 V_L 도메인 중 어느 하나에 아미노산 돌연변이가 1 내지 8개가 있는데, 그 범위 중간의 수도 포함한다. 상기 중 임의의 것에서, 돌연변이가 하나 이상의 CDR 영역에서 일어날 수 있다. 또한, 돌연변이들 중 임의의 것이 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, 불변 도메인에 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변화가 있다.
- <324> *변형된 항체*
- <325> 또 다른 실시양태에서, 또 다른 폴리펩티드에 연결된 본 발명의 항-ErbB2 항체 중 모두 또는 부분을 포함하는 융합 항체 또는 면역접합체가 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 단지 가변 도메인만이 폴리펩티드에 연결된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항-ErbB2 항체의 V_H 도메인은 제1 폴리펩티드에 연결되는 반면, 항-ErbB2 항체의 V_L 도메인은 V_H 및 V_L 도메인이 상호 작용하여 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 하는 방식으로, 제1 폴리펩티드와 결합하는 제2 폴리펩티드에 연결된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_H 도메인은 링커에 의해 V_L 도메인으로부터 분리되어, V_H 및 V_L 도메인이 상호 작용할 수 있게 된다(단락 [단쇄 항체] 이하의 내용을 참조한다). 이어서, V_H -링커- V_L 항체가 관심 폴리펩티드에 연결된다. 융합 항체는 폴리펩티드를 ErbB2-발현 세포 또는 조직으로 지정하는 데 유용하다. 폴리펩티드는 치료제, 예컨대 독소, 성장 인자 또는 다른 조절 단백질일 수 있거나, 진단제, 예컨대 용이하게 가시화될 수 있는 효소, 예컨대 호스래디슈 퍼옥시다제일 수 있다. 또한, 2개 (이상)의 단쇄 항체가 상호 연결된 융합 항체가 생성될 수 있다. 이는, 통상인이 단일 폴리펩티드 사슬 상에 이가 또는 다가 항체를 생성하기를 원하거나, 통상인이 이중특이적 항체를 생성하기를 원할 때 유용하다.
- <326> 단쇄 항체를 생성하기 위해, (scFv) V_H - 및 V_L -코딩 DNA 단편이 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어 아미노산 서열(Gly₄-Ser)₃을 코딩하는 또 다른 단편에 작용적으로 연결되어, V_H 및 V_L 서열이 인접 단쇄 단백질로서 발현될 수 있고, 이 때 V_L 및 V_H 도메인은 가요성 링커에 의해 연결된다. 예를 들어, 문헌 [Bird et al., *Science*

242:423-426(1988)]; 문헌 [Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)]; 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554(1990)]을 참조한다. 단쇄 항체는, 단일 V_H 및 V_L 만이 사용되는 경우에는 단가일 수 있고, 2개의 V_H 및 V_L 가 사용되는 경우에는 이가일 수 있거나, 2개 초과와 V_H 및 V_L 가 사용되는 경우에는 다가일 수 있다. ErbB2 및 또 다른 분자에 특이적으로 결합하는 이중특이적 또는 다가 항체가 생성될 수 있다.

<327> 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체를 코딩하는 핵산 분자를 이용하여 다른 변형된 항체가 제조될 수 있다. 예를 들어, "카파 보디"(문헌 [Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57(1997)]), "미니보디"(문헌 [Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9(1994)]), "디아보디"(문헌 [Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448(1993)]) 또는 "재누신(Janusins)"(문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659(1991)] 및 문헌 [Traunecker et al., *Int. J. Cancer(Suppl.)* 7:51-52(1992)])가 본 명세서의 교시에 따라 표준 분자 생물학적 기법을 이용하여 제조될 수 있다.

<328> 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편이 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함한 각종 방법들에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321(1990)], 문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553(1992)]을 참조한다. 또한, 이중특이적 항체가 "디아보디" 또는 "재누신"으로서 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 ErbB2의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 항체 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96. 1.18.1. 1.20, 1.39, 1.24 및 1.71.3으로부터의 제1 중쇄 및 제1 경쇄, 및 부가적 항체 중쇄 및 경쇄를 가진다. 일부 실시양태에서, 부가적 경쇄 및 중쇄는 또한 상기 동정된 단클론성 항체들 중 하나로부터의 것이나, 제1 중쇄 및 경쇄와는 상이하다.

<329> 일부 실시양태에서, 상기 기재된 변형된 항체는 본원에 제공된 인간 항-ErbB2 단클론성 항체로부터의 CDR 영역 또는 가변 도메인 중 하나 이상을 이용하여 제조된다.

<330> 본 발명의 항체는 또한 포유동물, 바람직하게는 인간에서 비변형된 항체의 반감기보다 긴 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 가지는 항체를 포괄한다. 한 실시양태에서, 상기 항체의 반감기는 약 15일 초과, 약 20일 초과, 약 25일 초과, 약 30일 초과, 약 35일 초과, 약 40일 초과, 약 45일 초과, 약 2개월 초과, 약 3개월 초과, 약 4개월 또는 약 5개월 초과이다. 포유동물, 바람직하게는 인간에서의 본 발명의 항체 또는 그것의 단편의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 항체 단편의 보다 높은 혈청 역가를 초래하고, 이에 따라 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/감소시키거나 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 농도를 감소시킨다. 증가된 생체내 반감기를 갖는 항체 또는 그것의 단편은 당업자에게 공지된 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 증가된 생체내 반감기를 갖는 항체 또는 그것의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 수반되는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형(예를 들어, 치환, 결실 또는 부가)함으로써 생성될 수 있다(예를 들어, 전체적으로 본원에 참조 인용되는, 국제 공보 제WO 97/34631호 및 제WO 02/060919호를 참조한다). 높고 분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 상기 항체 또는 항체 단편 중합체 분자에 부착시킴으로써, 증가된 생체내 반감기를 갖는 항체 또는 그것의 단편이 생성될 수 있다. PEG는 PEG를 상기 항체 또는 항체 단편의 N- 또는 C-말단에 부위-특이적으로 접합시키거나, 리신 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통해 다작용성 링커의 존재 또는 부재 하에, 상기 항체 또는 항체 단편에 부착될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 손실을 초래하는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 사용될 것이다. 접합 정도가 SDS-PAGE 및 질량 분광계에 의해 면밀히 모니터링되어, 항체에 대한 PEG 분자의 적절한 접합을 확실히 할 것이다. 미반응 PEG는, 예를 들어 크기 배제 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리될 수 있다.

<331> 항원 결합 부위는, 피브리노겐 또는 사이토크롬 B 등과 같은 비-항체 단백질 스카폴드 상의 CDR의 배치에 의해 (문헌 [Haan & Maggos(2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6]; 문헌 [Koide et al.(1998) *Journal of Molecular Biology*, 284:1141-1151]; 문헌 [Nygren et al.(1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7:463-469]), 또는 단백질 스카폴드 내의 루프의 아미노산 잔기를 무작위화하거나 돌연변이화하여 요망되는 표적에 대한 결합 특이성을 부여함으로써, 제공될 수 있다. 단백질 내 신규 결합 부위를 공학처리하기 위한 스카폴드가 나이그렌(Nygren) 등에 의해 상세히 검토되었다(문헌 [Nygren et al.(1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469]). 항체 모방체에 대한 단백질 스카폴드는 발명자들이 1개 이상의 무작위화 루프를 갖는 피브로넥틴 III형 도메인을 포함하는 단백질(항체 모방체)를 기재하고 있는, 전체적으로 본원에 참조 인용되는 제 WO/0034784호에 개시되어 있다. 하나 이상의 CDR, 예를 들어 한 세트의 HCDR을 안에 그래프트하기 위한 적당한 스카폴드가 면역글로불린 유전자 수퍼계열의 임의의 도메인 구성원에 의해 제공될 수 있다. 스카폴드는 인간 또

는 인간 이외의 단백질일 수 있다. 비-항체 단백질 스카폴드의 한 이점은, 그것이 적어도 일부 항체 분자보다 더 작고/작거나 제조하기 용이한 스카폴드 분자 내 항원 결합 부위를 제공할 수 있다는 점이다. 결합 구성원의 작은 크기는 유용한 생리학적 성질, 예컨대 세포에 들어가 조직에 깊이 통과하거나 다른 구조 내 표적에 도달하는 능력, 또는 표적 항원의 단백질 동공 내에 결합하는 능력을 부여할 수 있다. 비-항체 단백질 스카폴드 내 항원 결합 부위의 사용이 문헌 [Wess, 2004(Wess, L. In: BioCentury, Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004)]에서 검토되어 있다. 전형적인 것은, 안정한 골격 및 하나 이상의 가변 루프를 갖는 단백질로서, 여기에서 루프 또는 루프들의 아미노산 서열은 특이적으로 또는 무작위로 돌연변이화되어, 표적 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 생성시킨다. 그러한 단백질에는 *S. 아우레우스(S. aureus)*로부터의 단백질 A의 IgG-결합 도메인, 트랜스페린, 알부민, 테트라넥틴, 피브로넥틴(예를 들어, 제10 피브로넥틴 III형 도메인), 리포갈린, 및 감마-결정성 및 기타 아필린(Affilin)TM 스카폴드(Scil 단백질)이 포함된다. 다른 방법의 예에는 시클로타이드 기체의 "마이크로보디(Microbodies)"-분자내 디술퍼드 결합을 갖는 소 단백질, 마이크로단백질(베르사보디즈(Versabodies)TM, 앰무닉스(Amunix)) 및 앤키린(ankyrin) 반복 단백질(DARPs, 몰레큘러 파트너스(Molecular Partners))이 포함된다.

<332> 항체 서열 및/또는 항원 결합 부위에 부가하여, 본 발명에 따른 표적화된 결합체는 다른 아미노산을 포함하여, 예를 들어 펩티드 또는 폴리펩티드, 예컨대 폴딩된 도메인을 형성하거나, 분자에 대해 항원에 결합하는 능력에 부가하여 또 다른 작용적 특성을 부여할 수 있다. 본 발명의 표적화된 결합체는 검출가능한 표지를 가질 수 있거나, (예를 들어 펩티드 결합 또는 링커를 통해) 독소 또는 표적화 분자 또는 효소에 접합될 수 있다. 예를 들어, 표적화된 결합체는 촉매 부위(예를 들어 효소 도메인 내)뿐만 아니라, 항원 결합 부위를 포함할 수 있고, 여기에서 항원 결합 부위는 항원에 결합하고, 이에 따라 항원에 대한 촉매 부위를 표적화한다. 촉매 부위는 예를 들어 절단에 의해, 항원의 생물학적 기능을 억제할 수 있다.

<333> 유도체화 항체 및 표지된 항체

<334> 본 발명의 항-ErbB2 항체 또는 항원 결합 부분은 유도체화되거나, 또 다른 분자(예를 들어, 또 다른 펩티드 또는 단백질)에 연결될 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 그것의 부분은 ErbB2 결합이 유도체화 또는 표지에 의해 지장받지 않도록 유도체화된다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 부분은 비변형 또는 변형 형태 모두의 본원에 기재된 인간 항-ErbB2 항체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 (화학적 커플링, 유전 융합, 비공유 결합 또는 기타 방식에 의해) 하나 이상의 다른 분자 부분, 예컨대 또 다른 항체(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 디아보디), 검출제, 세포독성제, 약학제, 및/또는 항체 또는 항체 부분의 또 다른 분자(예컨대, 스트렙타아비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 결합을 매개할 수 있는 단백질 또는 펩티드에 작용적으로 연결될 수 있다.

<335> 2개 이상의 항체(동일한 유형 또는 상이한 유형의 것으로, 이에 예를 들어 이중특이적 항체를 생성함)를 가교함으로써 한 유형의 유도체화 항체가 생성된다. 적당한 가교제에는 적절한 스페이서(예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르) 또는 동형이중작용기(예를 들어, 디숙신이미드 수베레이트)에 의해 분리된 2개의 별도로 반응성인 기를 가지는 이형이중작용성인 가교제들이 포함된다. 그러한 링커는 피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chemical Company)(미국 일리노이즈주 록포드 소재)로부터 입수가능하다.

<336> 또 다른 유형의 유도체화 항체는 표지된 항체이다. 본 발명의 항체 또는 항원 결합 부분이 유도체화될 수 있도록 하는 데 유용한 검출제에는 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌술폰일 클로라이드, 파이코에리트린, 탄탄족 인광체 등을 비롯한 형광 화합물들이 포함된다. 항체는 또한 검출에 유용한 효소, 예컨대 호스래디쉬 퍼옥시다제, β-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스 산화효소 등으로 표지될 수 있다. 항체가 검출가능한 효소로 표지될 때, 그것은 식별될 수 있는 반응 생성물을 생성하기 위해 효소가 사용하는 부가적 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제의 제제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 착색된 반응 생성물을 초래하여, 이는 검출가능하다. 항체는 또한 비오틴으로 표지되고, 아비딘 또는 스트렙타아비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출될 수 있다. 항체는 또한 2차 리포터(예를 들어, 루이신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 소정의 폴리펩티드 에피토프로 표지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지는 각종 길이의 스페이서 앞에 의해 부착되어, 잠재적 입체 장애를 감소시킨다.

<337> 항-ErbB2 항체는 또한 방사성표지 아미노산에 의해 표지될 수 있다. 방사성표지는 진단 목적 및 치료 목적 모두를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 방사성표지를 사용하여, x-선 또는 다른 진단 기법에 의해 ErbB2-발현 세포를 검출할 수 있다. 또한, 방사성표지는 ErbB2-발현 세포, 예컨대 원치 않는 면역 반응을 유발하는 세포에 대

한 독소로서 치료적으로 사용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예에는 하기 방사성동위원소 또는 방사핵이 포함되나, 이에 국한되지 않는다: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I 및 ^{131}I .

<338> 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 영상화 시에 검출가능한 상자성, 방사능 또는 형광성 이온으로 표지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상자성 이온은 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이터븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 터븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 또는 에르븀(III)이다. 다른 실시양태에서, 방사능 이온은 요오드123, 테크네튬99, 인듐111, 레늄188, 레늄186, 구리67, 요오드131, 이트륨90, 요오드125, 아스타틴211 및 갈륨67이다. 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 란타늄(III), 금(III) 납(II) 및 비스무트(III)와 같은 X-선 영상제로 표지된다.

<339> 항-ErbB2 항체는 또한 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 메틸 또는 에틸기, 또는 탄수화물 기와 같은 화학기로 유도체화될 수 있다. 이 기들은 항체의 생물학적 특성을 향상시키기 위해, 예를 들어 혈청 반감기를 증가시키거나 조직 결합을 증가시키는 데 유용하다.

<340> 약학적 조성물 및 키트

<341> 본 발명은 암을 앓는 자들을 포함하나 이에 국한되지 않는, 치료적 절차를 필요로 하는 대상의 치료를 위한, 길항자 성질을 갖는 표적화된 결합제 및/또는 인간 항-ErbB2 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 처리 대상은 인간이다. 다른 실시양태에서, 대상은 수의 대상이다.

<342> 처리는 본 발명의 하나 이상의 억제성 항-ErbB2 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단독으로 또는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여하는 것을 수반할 수 있다. 본 발명의 억제성 항-ErbB2 항체 및 이를 포함하는 조성물은 하나 이상의 다른 치료제, 진단제 또는 예방제와 조합하여 투여될 수 있다.

<343> 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 치료제는 항신생물제를 포함할 수 있다. 항신생물제에는 비제한적으로 백금-기재의 제제, 예컨대 카보플라틴 및 시스플라틴; 질소 머스타드 알킬화제; 니트로소 우레아 알킬화제, 예컨대 카르무스틴(BCNU) 및 다른 알킬화제; 항대사제, 예컨대 메토트렉세이트; 퓨린 유사체 항대사제; 피리미딘 유사체 항대사제, 예컨대 플루오로우라실(5-FU) 및 젬시타빈; 호르몬 항신생물제, 예컨대 고세렐린, 류프롤리드 및 타목시펜; 천연 항신생물제, 예컨대 탁산(예를 들어, 도세탁셀 및 파클리탁셀), 알테스류킨, 인터류킨-2, 에토포시드(VP-16), 인터페론 알파, 및 트레티노인(ATRA); 항생 천연 항신생물제, 예컨대 블레오마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신 및 미토마이신; 및 빈카 알칼로이드 천연 항신생물제, 예컨대 빈블라스틴 및 빈크리스틴이 포함된다.

<344> 각종 실시양태에서, 항신생물제는 5-플루오로우라실, 6-머캅토피린, 악티노마이신(Actinomycin), 아드리아마이신(Adriamycin)[®], 아드루실(Adrucil)[®], 아미노그루테티미드(Aminoglutethimide), 아나스트로졸(Anastrozole), 아레디아(Aredia)[®], 아리미덱스(Arimidex)[®], 아로마신(Aromasin)[®], 보네포스(Bonefos)[®], 블레오마이신, 카보플라틴, 캅티노마이신, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로드로네이트, 시클로포스파미드, 사이타드렌(Cytadren)[®], 사이톡산(Cytoxan)[®], 닥티노마이신(Dactinomycin), 도세탁셀(Docetaxel), 독실(Doxyl)[®], 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 엑세메스탄, 페마라(Femara)[®], 플루오로우라실, 플루옥시메스테론, 할로테스틴(Halotestin)[®], 헤르셉틴[®], 레트로졸, 류코보린 칼슘, 메게이스(Megace)[®], 메게스트롤 아세테이트, 메토트렉세이트, 미토마이신, 미토잔트론, 뮤타마이신[®], 나벨빈(Navelbine)[®], 놀바덱스(Nolvadex)[®], 노반트론(Novantrone)[®], 온코빈(Oncovin)[®], 오스탁(Ostac)[®], 파클리탁셀, 파미드로네이트, 파모루비신(Pharmorubicin)[®], 플라티놀(Platinol)[®], 프레드니손(prednisone), 프로사이톡스(Procytox)[®], 타모펜(Tamofen)[®], 타몬(Tamone)[®], 타모플렉스(Tamoplex)[®], 타목시펜(Tamoxifen), 탁솔[®], 탁스테레(Taxotere)[®], 트라스투주맵, 티오테파, 벨베(Velbe)[®], 베페시드(Vepesid)[®], 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴, 비노렐빈, 젤로다(Xeloda)[®], 또는 이들의 조합이다.

<345> 일부 실시양태에서, 항신생물제는 단클론성 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 항체, 또는 항체의 단편을 포함한다. 예시적 항체에는 리투산(Rituxan), IDEC-C2B8, 항-CD20 Mab, 파노렉스(Panorex), 3622W94, 아데노암종 상의 항-EGP40(17-1A) 범암종 항원, 헤르셉틴[®], 에르비투스(Erbitux), 항-Her2, 항-EGFr, BEC2, 항-이디오

타입-GD₃ 에피토프, 오바렉스(Ovarex), B43.13, 항-이디오타입 CA125, 4B5, 항-VEGF, RhuMAb, MDX-210, 항-HER2, MDX-22, MDX-220, MDX-447, MDX-260, 항-GD-2, 퀴드라메트(Quadramet), CYT-424, IDEC-Y2B8, 온콜림(Oncolym), Lym-1, 스마트(SMART) M195, 아트라젠(ATRAGEN), LDP-03, 항-CAMPATH, ior t6, 항-CD6, MDX-11, OV103, 제나팍스(Zenapax), 항-Tac, 항-IL-2 수용체, 멜리문(MELIMMUNE)-2, 멜리문-1, 세아사이드(CEACIDE), 프리타겟(Pretarget), 노보맵(NovoMAb)-G2, TNT, 항-히스톤, 글리오맵(Gliomab)-H, GNI-250, EMD-72000, 림포사이드(LymphoCide), CMA 676, 모노팜(Monopharm)-C, 항-FLK-2, 스마트 1D10, 스마트 ABL 364, 이뮤레이트(ImmuRAIT)-CEA 또는 이들의 조합이 포함되나, 이에 국한되지 않는다.

<346> 또 다른 실시양태에서, 항신생물제는 부가적 유형의 종양 세포를 포함한다. 한 특정 실시양태에서, 부가적 유형의 종양 세포는 MCF-10A, MCF-10F, MCF-10-2A, MCF-12A, MCF-12F, ZR-75-1, ZR-75-30, UACC-812, UACC-893, HCC38, HCC70, HCC202, HCC1007 BL, HCC1008, HCC1143, HCC1187, HCC1187 BL, HCC1395, HCC1569, HCC1599, HCC1599 BL, HCC1806, HCC1937, HCC1937 BL, HCC1954, HCC1954 BL, HCC2157, Hs 274.T, Hs 281.T, Hs 343.T, Hs 362.T, Hs 574.T, Hs 579.Mg, Hs 605.T, Hs 742.T, Hs 748.T, Hs 875.T, MB 157, SW527, 184A1, 184B5, MDA-MB-330, MDA-MB-415, MDA-MB-435S, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468 RT4, BT-474, CAMA-I, MCF7[MCF-7], MDA-MB-134-VI, MDA-MB-157, MDA-MB-175-VII HTB-27 MDA-MB-361, SK-BR-3 또는 ME-180 세포이며, 이들 모두는 ATTC로부터 입수가 가능하다.

<347> 또 다른 실시양태에서, 항신생물제는 안티센스 시약, 예컨대 siRNA 또는 헤어핀 RNA 분자를 포함하며, 이 분자는 암 세포에서 발현되는 유전자의 발현 또는 기능을 감소시킨다. 사용될 수 있는 예시적 안티센스 시약에는 유신, Ha-ras, VEGFR1 또는 BRCA1에 지정된 것들이 포함된다. 그러한 시약들은 미국 특허 제6,716,627호(유신), 제6,723,706호(Ha-ras), 제6,710,174호(VEGFR1) 및 미국 특허 공보 제2004/0014051(BRCA1)에 기재되어 있다.

<348> 다른 실시양태에서, 항신생물제는 대상에 자가성인 세포, 예컨대 마크로파지, T 세포 또는 수상돌기와 같은 면역계의 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 항원, 예컨대 펩티드 또는 암 항원으로 처리되었거나, 환자로부터의 종양 세포와 함께 항온 배양되었다. 한 실시양태에서, 자가 말초혈 림프구를 SV-BR-1 세포와 혼합하여, 대상에게 투여할 수 있다. 그러한 림프구는 백혈구 성분채집술에 의해 단리될 수 있다. 사용될 수 있는 적당한 자가 세포, 그것의 단리 방법, 그 효능을 향상시키기 위해 상기 세포를 변형시키는 방법, 및 상기 세포를 포함하는 제형물이 미국 특허 제6,277,368호, 제6,451,316호, 제5,843,435호, 제5,928,639호, 제6,368,593호 및 제6,207,147호, 및 국제 PCT 공보 제W004/021995호 및 제W000/57705호에 기재되어 있다.

<349> 암 치료에 관한 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 대상을 본 발명의 세포를 이용한 치료하기 전, 중 또는 후에, 암에 대한 보완 요법, 예컨대 수술, 화학 요법, 방사선 요법 또는 호르몬 요법 또는 이들의 조합법으로 처리한다.

<350> 암이 유방암인 한 특정 실시양태에서, 보완 치료는 유방-보존 수술, 즉 암은 제거하나 유방은 제거하지 않는 수술(이는 또한 유방-보존 수술로도 칭해짐), 유방-보존 수술, 유방종양절제술, 분엽 유방절제술 또는 부분 유방절제술을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 그것은 유방절제술을 포함한다. 유방절제술은 가능한 한 많은 유방조직을 제거하기 위한 수술이고, 일부 경우에는 팔 아래의 림프절을 제거하기 위한 수술이다. 또 다른 실시양태에서, 수술은 훨씬 더 많은 팔 아래 림프절을 제거하는 것 대신에 단지 하나 또는 그보다 작은 림프절(전초 림프절)만을 제거하는 분엽 림프절 생검을 포함한다. 수술은 또한 의사가 전체 유방, 팔 아래 림프절의 대부분 또는 모두, 또한 종종 흉근육 위의 라이닝을 제거하는 변형된 라디칼 유방절제술을 포함할 수 있다. 2개의 흉근육 중 보다 작은 것을 또한 취출하여, 이 수술을 또한 행하여 림프절을 제거하는 것을 보다 용이하게 할 수 있다.

<351> 한 특정 실시양태에서, 보완 치료는 방사선 요법을 포함한다. 방사선 요법은 방사선이 기계로부터 나오는 외부 방사선, 또는 방사선이 유방 내에 직접 놓은 얇은 플라스틱 관에 둔 방사능 물질로부터 비롯되는 내부 방사선(임플란트 방사선)을 포함할 수 있다.

<352> 또 다른 특정 실시양태에서, 보완 치료는 화학 요법을 포함한다. 종양의 억제에 보조적인 것으로 나타난 화학요법제에는 알킬화제(예를 들어, 질소 머스타드), 항대사제(예를 들어, 피리미딘 유사체), 방사능 동위원소(예를 들어, 인 및 요오드), 기타 제제(예를 들어, 치환된 우레아) 및 천연 산물(예를 들어, 빈카 알칼로이드 및 항생제)이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 한 특정 실시양태에서, 화학 요법제는 알로푸리놀 나트륨, 돌라세트론 메실레이트, 파미드로네이트 이나트륨, 에티드로네이트, 플루코나졸, 에포에틴 알파, 레바미솔 HCL, 아미포스틴, 그라니세트론 HCL, 류코보린 칼슘, 사르그라모스틴, 드로나비롤, 메스나, 필그라스틴, 필로카르핀 HCL, 옥트레오티드 아세테이트, 텍스라족산, 온단세트론 HCL, 온단세트론, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 티오테

과, 멜팔란 HCL, 멜팔란, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 클로람부실, 메클로레타민 HCL, 카르무스틴, 로무스틴, 카르무스틴 임플란트를 갖는 폴리페프로산 20, 스트렙토조신, 독소루비신 HCL, 블레오마이신 술페이트, 다우니루비신 HCL, 닥티노마이신, 다우노루비신 시트레이트, 이다루비신 HCL, 폴리마이신, 미토마이신, 펜토스타틴, 미토잔트론, 발루비신, 사이타라빈, 플루다라빈 포스페이트, 플록수리딘, 클라드리빈, 메토크렉세이트, 머캅티퓨린, 티오구아닌, 카페시타빈, 메틸테스토스테론, 닐루타미드, 테스토라톤, 비칼루타미드, 플루타미드, 아나스트로졸, 토레미펜 시트르산염, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에티닐 에스트라디올, 에스트라디올, 에스테르화 에스트로겐, 공액 에스트로겐, 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 레바미솔 HCL, 알데스류킨, 이리노테칸 HCL, 다카르바진, 아스파라기나제, 에토포시드 포스페이트, 쟈시타빈 HCL, 알트레타민, 토포테칸 HCL, 히드록시우레아, 인터페론 알파-2b, 미토탄, 프로카르바진 HCL, 비노렐빈 타르트레이트, *E. 콜라이* L-아스파라기나제, 에르위니아(Erwinia) L-아스파라기나제, 빈크리스틴 술페이트, 테니류킨 디프티톡스, 알데스류킨, 리톡시맙, 인터페론 알파-2a, 파클리탁셀, 도세탁셀, BCG 라이브(인트라베시칼), 빈블라스틴 술페이트, 에토포시드, 트레티노인, 테니포시드, 포르피머 나트륨, 플루오로우라실, 베타 메타손 나트륨 포스페이트 및 베타 메타손 아세테이트, 레트로졸, 에토포시드 시트로로플로민자, 폴린산, 칼슘 류코우오린, 5-플루오로우리실, 아드리아마이신, 사이톡산, 및 디아미노 디클로로 백금으로 구성된 군으로부터 선택되고, 티모신 α_1 과 조합되는 상기 화학 요법제는 상기 환자에 있어 화학 요법의 상기 부작용을 감소시키기 위한 유효량으로 투여된다.

- <353> 또 다른 특정 실시양태에서, 보완 치료는 호르몬 요법을 포함한다. 호르몬 요법은 에스트로겐과 같은 천연 호르몬을 차단할 수 있거나 에스트라디올의 합성을 방지하는 아로마타제 억제제를 포함할 수 있는 약물, 예컨대 타목시펜을 포함할 수 있다. 대안적으로, 호르몬 요법은, 특히 대상이 아직 폐경을 경험하지 않은 여성인 경우, 그 대상의 난소를 제거하는 것을 포함할 수 있다.
- <354> 본원에 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 상용적인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅액, 항생균제 및 항진균제, 등장 및 흡수 지연제 등을 의미한다. 약학적으로 허용되는 담체의 일부 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등뿐만 아니라, 이들의 조합이다. 많은 경우들에서, 조성물 내에 등장제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 약학적으로 허용되는 물질의 부가적 예는, 항체의 저장수명 또는 효능성을 증진시키는, 습윤제 또는 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤 또는 유화제, 보존제 또는 완충제이다.
- <355> 본 발명의 조성물은 각종 형태들, 예를 들어 액체, 반고체 및 고체 투약량 형태, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사용 및 주입용 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환약, 분말, 리포솜 및 좌약의 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 방식 및 치료 용도에 의존한다. 전형적인 바람직한 조성물은 주사용 또는 주입용 용액의 형태, 예컨대 인간의 수동 면역화를 위해 사용되는 것과 유사한 조성물의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.
- <356> 치료 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건 하에서 무균이고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로유화액, 분산액, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적당한 다른 차원의 구조로 제형될 수 있다. 무균 주사용 용액은 필요한 대로 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 적절한 용매 내 항-ErbB2 항체를 요구량으로 도입한 후, 여과 무균을 행함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들 중 필요한 기타 성분을 함유하는 무균 비히클에 활성 화합물을 도입함으로써 제조된다. 무균 주사용 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 및 그것의 사전 무균 여과된 용액으로부터의 임의의 부가적 요망되는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결 건조이다. 용액의 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 요구되는 입도의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사용 조성물의 연장 흡수는 조성물 내에 흡수 지연 제제, 예를 들어 모노스테아르산염 및 젤라틴을 포함 시킴으로써 초래될 수 있다.
- <357> 본 발명의 항체는 당업계에 공지되어 있는 각종 방법들에 의해 투여될 수 있으나, 많은 치료 용도들에 있어, 바람직한 투여 경로/방식은 피하, 근육내 또는 정맥내 주입이다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 요망되는 결과에 따라 다양할 것이다.
- <358> 특정 실시양태에서, 항체 조성물의 활성 화합물은 항체를 급속 방출로부터 보호할 담체와 함께 제조될 수 있는데, 이의 예는 조절 방출성 제형물, 예컨대 임플란트, 경피용 패치, 및 미세캡슐화 전달 시스템이다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토크에스테

르, 폴리락트산, 키토산 및 알긴산염이 사용될 수 있다. 그러한 제형물의 제조를 위한 많은 방법들이 특허 하여 되거나, 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems(J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)]을 참조한다.

- <359> 본 발명은 또한 본원에 기재된 항-ErbB2 항체를 포함하는, 흡입에 의한 투여에 적당한 조성물을 제공한다. 항-ErbB2 항체는 적절한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 다른 적당한 기체의 사용과 함께, 가압 팩 또는 네블라이저로부터의 에어로졸 스프레이 제공 형태로 대상에게 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 측정된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 젤라틴의, 캡슐 및 카트리지는 화합물과 락토스 또는 전분과 같은 적당한 분말 기체의 분말 믹스를 함유하도록 제형될 수 있다. 문헌 [Dellamary et al.(2004) *J Control Release.*;95(3): 489-500]은 항체의 폐 전달을 위한 제형물을 기재한다.
- <360> 본 발명은 또한 본원에 기재된 항-ErbB2 항체를 포함하는, 구강 점막을 통한 투여에 적당한 조성물을 제공한다. 구강 경점막 전달이란, 구강, 인두강 또는 식도의 점막을 횡단한 전달 비히클의 전달을 지칭하고, 이는 예를 들어 약물의 흡수가 장에서 일어나는 종래 구강 전달과 대조될 수 있다. 따라서, 항-ErbB2 항체가 혀점막, 설하점막, 치은점막, 인두점막, 및/또는 식도점막을 통해 흡수되는 투여 경로도 모두 상기 용어가 본원에 사용되는 것과 같이 "경구 경점막 전달" 내에 포괄된다. 경점막의 점막을 통한 투여를 위해, 항-ErbB2 항체가 예를 들어 씹는 껌(미국 특허 제5,711,961호 참조) 또는 버클 패치(예를 들어, 미국 특허 제5,298,256호 참조)로 제형될 수 있다.
- <361> 본 발명은 또한 본원에 기재된 항-ErbB2 항체를 포함하는, 질 점막을 통한 투여에 적당한 조성물을 제공한다. 본 발명의 항-ErbB2 항체는 질 좌약, 폼, 크림, 정제, 캡슐, 연고 또는 젤로 제형될 수 있다.
- <362> 특정 실시양태에서, 항-ErbB2 항체를 포함하는 약학적 조성물은 피투과 경점막 장벽에 적절한 투과제와 함께 제형된다. 그러한 투과제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, 이에 예는 예를 들어 경점막 담염 및 푸시딘산 유도체가 포함된다.
- <363> 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-ErbB2 항체는, 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 함께 경구 투여된다. 화합물 (및 원할 경우, 기타 성분)은 또한 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 포함되거나, 정제로 압축되거나 대상의 식이요법에 직접 도입될 수 있다. 경구 치료적 투여를 위해, 항-ErbB2 항체에 부형제가 도입되어, 섭취가능한 정제, 버클 정제, 트로키제, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여 외의 방식으로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 화합물을 그것의 불활성을 방지하는 물질로 코팅하거나 그 물질과 함께 공동 투여하는 것이 필요할 수 있다.
- <364> 부가적 활성 화합물이 또한 조성물에 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 억제성 항-ErbB2 항체는 하나 이상의 부가적 치료제, 예컨대 상기 열거된 것들과 공동 제형되고/되거나 공동 투여된다. 그러한 조합 요법은 공동 투여되는 제제뿐만 아니라 억제성 항-ErbB2 항체의 보다 낮은 투약량을 필요로 할 수 있고, 이에 가능한 독성 또는 각종 단일요법과 결부되는 합병증을 피할 수 있다.
- <365> 본 발명의 억제성 항-ErbB2 항체 및 이를 포함하는 조성물은 또한 다른 치료적 방식과 조합하여, 특히 수술 방사성 및/또는 화학 요법 치료와 조합하여 투여될 수 있다.
- <366> 본 발명의 조성물은 "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"의 본 발명의 항체 또는 항원 결합 부분을 포함할 수 있다. "치료적 유효량"이란 필요한 투약량으로 필요한 시간 동안, 요망되는 치료 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다. 항체 또는 항체 부분의 치료 유효량은 대상의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 항체 또는 항체 부분의 대상에서의 요망되는 반응을 도출하는 능력과 같은 인자들에 따라 다양할 수 있다. 치료 유효량은 또한 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 영향 또는 유해한 영향보다 치료적으로 유익한 영향이 더 크도록 하는 양이다. "예방 유효량"이란 필요한 투약량으로 필요한 시간 동안, 요망되는 예방 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다. 전형적으로, 예방 용량은 질병의 초기 단계 전 또는 중에 대상에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 더 적을 수 있다.
- <367> 투약 방식은 최적의 요망되는 반응(예를 들어, 치료 또는 예방 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수가지 분할 용량이 경시적으로 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 나타내어지는 대로 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 투여 용이성 및 투약량의 균일성을 위해 투약 단위 형태로 비경구 조성물을 제형하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용되는 투약 단위 형태란 피처리 포유

동물 대상을 위한 단위 투약량으로서 적합한, 물리적으로 구분된 단위를 지칭하고, 각 단위는 요구되는 약학적 담체와 결부되어 요망되는 치료 효과를 산출하도록 계산되는 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투약 단위의 명세 사상은 (a) 항-ErbB2 항체 또는 그것의 부분의 특유의 특성, 및 달성하고자 하는 특별한 치료 또는 예방 효과, 및 (b) 대상에서의 민감도를 처리하기 위해 상기 항체를 배합하는 당 기술에 있어 고유한 한계에 의해 나타내어지거나, 그에 직접 의존한다.

<368> 본 발명의 항체 또는 항체 부분의 치료 또는 예방 유효량에 대한 한 예시적인 비제한적 범위는 0.025 내지 50 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 50 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 25, 0.1 내지 10, 또는 0.1 내지 3 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 제형물은 20 mM 시트르산나트륨의 완충액(pH 5.5), 140 mM NaCl, 및 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80 중에 5 mg/ml의 항체를 함유한다. 투약량 값은 경감시키고자 하는 증상의 유형 또는 중도에 따라 다양할 수 있음을 주목하도록 한다. 또한, 임의의 특별한 대상에 대해, 특정 투약 방식이 개별 필요 및 조성물을 투여하거나 그 투여를 주관하는 사람의 전문적 판단에 따라 경시적으로 조절되어야 하고, 또한 본원에 나와 있는 투약량 범위는 단지 예시적이며, 청구되는 조성물의 범주 또는 실무를 제한하고자 의도되지 않음을 이해하도록 한다.

<369> 본 발명은 또 다른 측면은 본 발명의 항-ErbB2 항체 또는 항체 부분, 또는 그러한 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 항체 또는 조성물에 부가하여, 진단제 또는 치료제를 포함할 수 있다. 키트는 또한 진단 또는 치료 방법에 사용하기 위한 사용설명서를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 항체 또는 그것을 포함하는 조성물, 및 이하 기재되는 방법에 사용될 수 있는 진단제를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 키트는 항체 또는 그것을 포함하는 조성물, 및 이하 기재되는 방법에 사용될 수 있는 하나 이상의 치료제를 포함한다.

<370> 사용 진단 방법

<371> 또 다른 측면에서, 본 발명은 진단 방법을 제공한다. 항-ErbB2 항체는 샘플 시험관내 또는 생체내 생물학적 샘플 내에 ErbB2를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 ErbB2-발현 세포의 존재 또는 위치의 진단이 필요한 대상에게 있어, 항체를 대상에게 투여하는 단계, 항체가 결합되는 곳을 국소화함으로써 대상 내 ErbB2의 발현을 결정하는 단계, 대상 내 발현을 정상적 기준 대상 또는 표준에서의 발현과 비교하는 단계, 및 세포의 존재 또는 위치를 진단하는 단계를 포함하는, ErbB2-발현 세포의 존재 또는 위치를 진단하는 방법을 제공한다. 항-ErbB2 항체는 또한 증식의 마커로서 사용될 수 있다.

<372> 항-ErbB2 항체는 ELISA, RIA, 유세포분석, 조직면역조직화학법, 웨스턴 블롯 또는 면역석출법을 비제한적 예로 포함하는 통상적 면역검정법에 사용될 수 있다. 본 발명의 항-ErbB2 항체는 인간으로부터의 ErbB2를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 사이노몰거스 원숭이 또는 레서스 원숭이로부터의 ErbB2를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 설치류, 예컨대 마우스 및 래트로부터의 ErbB2를 검출하기 위해 사용될 수 있다.

<373> 본 발명은 생물학적 샘플을 본 발명의 항-ErbB2 항체와 접촉시키는 단계, 및 결합된 항체를 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플 내 ErbB2를 검출하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 검출가능한 표지로 직접 표지된다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체(제1 항체)는 표지되지 않고, 항-ErbB2 항체에 결합할 수 있는 제2 항체 또는 다른 분자는 표지된다. 당업계에 공지된 바와 같이, 제1 항체의 특별한 중 및 부류에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 항체가 선택된다. 예를 들어, 항-ErbB2 항체가 인간 IgG인 경우, 2차 항체는 항-인간-IgG일 수 있다. 항체에 결합할 수 있는 다른 분자에는 비제한적 예로서 단백질 A 및 단백질 G가 포함되며, 이 양자 모두는, 예를 들어 피어스 케미칼 컴퍼니로부터 상업적으로 입수가 가능하다.

<374> 항체 또는 2차 항체에 대한 적당한 표지가 상기 개시되었고, 이에 는 각종 효소들, 보철기, 형광 물질, 발광 물질 및 방사능 물질이 포함된다. 적당한 효소의 예에는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린 에스테라제가 포함되고; 적당한 보철기 착체의 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되며; 적당한 형광 물질의 예에는 옴발리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐 아민 플루오레신, 단실 클로라이드 또는 파이코에리트린이 포함되며; 발광 물질의 예에는 루미놀이 포함되고; 적당한 방사능 물질의 예에는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S 및 ³H이 포함된다.

<375> 다른 실시양태에서, ErbB2는 검출가능한 물질로 표지된 ErbB2 표준물질 및 표지되지 않은 항-ErbB2 항체를 이용하는 경쟁 면역검정법에 의해 생물학적 샘플에서 검정될 수 있다. 이 검정법에서, 생물학적 샘플, 표지된 ErbB2 표준물질 및 항-ErbB2 항체가 조합되고, 표지되지 않은 항체에 결합된 표지된 ErbB2 표준물질의 양이 결정된다.

생물학적 샘플 내의 ErbB2의 양은 항-ErbB2 항체에 결합된 표지된 ErbB2 표준물질의 양에 반비례한다.

<376> 통상인은 다수 목적을 위해 상기 개시된 면역검정법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 항-ErbB2 항체는 배양된 세포 내 ErbB2를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 각종 화합물로 처리된 세포의 표면 상에서의 ErbB2의 양을 결정하기 위해 사용된다. 이 방법은 ErbB2 단백질 수준을 조절하는 화합물을 동정하기 위해 사용될 수 있다. 이 방법에 따라, 세포의 한 샘플은 일정 시간 동안 시험 화합물로 처리하고, 한편 또 다른 샘플은 처리하지 않고 둔다. ErbB2의 총 수준을 측정하고자 하는 경우, 세포를 용해하고, 상기 기재된 면역검정법들 중 임의의 방법을 이용하여 총 ErbB2 수준을 측정한다. 처리하지 않은 세포 대비 처리한 세포 내 ErbB2의 총 수준을 비교하여, 시험 화합물의 효과를 결정한다.

<377> 총 ErbB2 수준을 측정하기 위한 한 바람직한 면역검정법은 유세포분석법 또는 면역조직화학법이다. ErbB2의 세포 표면 수준을 측정하고자 하는 경우, 세포를 용해하지 않고, ErbB2의 세포 표면 수준을 상기 기재된 면역검정법들 중 임의의 방법을 이용하여 측정한다. ErbB2의 세포 표면 수준을 결정하기 위한 한 바람직한 면역검정법은 세포 표면 단백질을 검출가능한 표지, 예컨대 비오틴 또는 ¹²⁵I로 표지하는 단계, ErbB2를 항-ErbB2 항체로 면역석출하는 단계, 및 이어서 표지된 ErbB2를 검출하는 단계를 포함한다.

<378> ErbB2의 국소화, 예를 들어 세포 표면 수준을 결정하기 위한 또 다른 바람직한 면역검정법은 면역조직화학법을 이용함에 의한 것이다. ErbB2의 세포 표면 수준을 결정하기 위한 한 바람직한 면역검정법은 적절한 형광체, 예컨대 플루오레신 또는 파이코에리트린으로 표지된 항-ErbB2 항체를 결합시키고, 유세포분석을 이용하여 일차 항체를 검출하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 표지되지 않고, 항-ErbB2 항체에 결합할 수 있는 제2 항체 또는 다른 분자는 표지된다. ELISA, RIA, 유세포분석, 웨스턴 블롯, 면역조직화학법, 내재성 막 단백질의 세포 표면 표지, 및 면역석출법과 같은 방법들이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, 이하 상기와 동일함]를 참조한다. 또한, 면역검정법은 ErbB2의 활성화 또는 억제에 대해 다수 화합물을 시험하기 위해 고성능 스크리닝에 스케일-업할 수 있다.

<379> 본 발명의 항-ErbB2 항체는 또한 조직, 또는 조직으로부터 유래된 세포 내 ErbB2의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 ErbB2를 발현하지 않거나 그것을 침투 세포에 비해 감소된 수준으로 발현하는, ErbB2-발현 세포의 조직으로의 침투를 결정하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 조직은 질병이 있는 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 조직 생검이다. 본 방법의 일부 실시양태에서, 조직 또는 그것의 생검은 대상으로부터 절제된다. 이어서, 조직 또는 생검은, 예를 들어 총 ErbB2 수준, ErbB2의 세포 표면 수준, 또는 ErbB2의 국소화를 상기 논의된 방법에 의해 결정하기 위해 면역검정법에 사용된다. 그러한 방법은 조직이 높은 수준의 ErbB2를 발현하는지의 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있고, 상기 여부는 조직이 항-ErbB2 항체를 이용하여 처리하기 위한 표적인지를 가리킨다.

<380> 본 발명의 항체는 또한 ErbB2를 발현하는 조직 또는 기관을 동정하기 위해 생체내 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 ErbB2-발현 세포를 동정하기 위해 사용된다. 본 발명의 인간 항-ErbB2 항체를 사용하는 한 이점은, 그것이 인간 이외의 기원의 항체 또는 인간화 항체 또는 키메라 항체와 달리, 투여 시 항체에 대한 실질적 면역반응을 도출하지 않으면서 생체내 안전하게 사용될 수 있다는 점이다. 본 방법은 검출가능하게 표지된 항-ErbB2 항체 또는 이를 포함하는 조성물을 이와 같은 진단 시험을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계, 및 대상을 영상화 분석에 적용하여, ErbB2-발현 조직의 위치를 결정하는 단계를 포함한다. 영상화 분석은 의료 기술분야에 공지되어 있고, 이에 비제한적 예로서 x-선 분석, 자기 공명 영상화(MRI) 또는 컴퓨터 이용 단층촬영(CT)이 포함된다. 항체는 생체내 영상화에 적당한 임의의 제제, 예를 들어 x-선 분석에 사용될 수 있는 콘트라스트제, 예컨대 바륨, 또는 MRI 또는 CT에 사용될 수 있는 자기 콘트라스트제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트가 포함된다. 다른 표지제에는 비제한적 예로서 방사성동위원소, 예컨대 ⁹⁹Tc가 포함된다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 표지되지 않을 것이며, 검출가능하고 항-ErbB2 항체에 결합할 수 있는 제2 항체 또는 다른 분자를 투여함으로써 영상화될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 생검은 관심 조직이 ErbB2를 발현하는지의 여부를 결정하기 위해 대상으로부터 수득된다.

<381> 일부 실시양태에서, 검출가능하게 표지된 항-ErbB2 항체는 형광체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 형광체에는 근자외선 형광 염료, 디니트로페닐, 플루오레신 및 그것의 유도체, 로다민, 로다민의 유도체, 파이코에리트린, 파이코시아닌, 알로파이코시아닌, o-프탈데히드 및 플루오레스아민, 텍사스 레드, 로다민 그린, 오레곤 그린, 캐스케이드 블루, 파이코에리트린, CY3, CY5, CY2, CY7, 쿠마린, 인프라레드 40, MR 200, IRD 40, 알렉사 플루오르, 캐스케이드 블루, 테트라메틸로다민, 퍼시픽 블루, SYBR 및 BODIPY가 포함된다. 또 다른 실시양태에서, 형

광체에는 괄호 안에 nm으로 표시된 최대 방출을 갖는 하기 화합물들 중 하나가 포함된다: Cy2TM(506), GFP(적색 편이)(507), YO-PRO[®]-1(509), YOYO[®]-1(509), 칼세인(Calcein)(517), FITC(518), 플루오르 X(FluorX)[®](519), 알렉사(Alexa)[®](520), 로다민 110(520), 5-FAM(522), 오레곤 그린[®] 500(522), 오레곤 그린[®] 488(524), 리보 그린[®](525), 로다민 그린[®](527), 로다민 123(529), 마그네슘 그린[®](531), 칼슘 그린[®](533), TO-PRO[®]-1(533), TOTO[®]-1(533), JOE(548), 보디파이(BODIPY)[®] 530/550(550), 딜(Di1)(565), 보디파이[®](568), 보디파이[®] 558/568(568), 보디파이[®] 564/570(570), Cy3[®](570), 알렉사[®] 546(570), TRITC(572), 마그네슘 오렌지[®](575), 파이코에리트린 R&B(575), 로다민 팔로이딘(575), 칼슘 오렌지[®](576), 파이로닌 Y(580), 로다민 B(580), TAMRA(582), 로다민 레드[®](590), Cy3.5[®](596), 록스(ROX)(608), 칼슘 크림슨(Calcium Crimson)TM(615), 알렉사[®] 594(615), 텍사스 레드[®](615), 나일 레드(628), YO-PRO[®]-3(631), YOYO[®]-3(631), R-파이코시아닌(642), C-파이코시아닌(648), TO-PRO[®]-3(660), TOTO[®]-3(660), DiD Di1C(5)(665), Cy5TM(670), 티아다카르보시아닌(671) 및 Cy5.5(694)이 포함된다.

<382> 사용 치료 방법

<383> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 ErbB2 활성의 억제에 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, ErbB2 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, ErbB2는 인간이고, 대상은 인간 대상이다. 대안적으로, 대상은 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체가 교차 반응할 수 있는 ErbB2를 발현하는 포유동물일 수 있다. 표적화된 결합제 및/또는 항체는 수의적 목적을 위해, 또는 인간 질병의 동물 모델로서 항체가 교차 반응하게 되는 ErbB2를 발현하는 인간 이외의 포유동물(즉, 사이노몰거스 원숭이)에게 투여될 수 있다. 그러한 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 효능을 평가하는 데 유용할 수 있다.

<384> 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 치료 유효량의 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 대상에게 투여함으로써 대상에서의 ErbB2-매개 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본원에 사용되는 "ErbB2-매개 장애"라는 용어는 장애를 앓는 대상에서의 높거나 증가된 수준의 ErbB2 발현 또는 활성의 존재가 장애의 병리생리학 또는 장애의 악화에 기여하는 인자에 원인되는 것으로 나타났거나 그러한 원인이 되는 것으로 의심되는 질병 및 다른 장애를 포괄하는 것으로 의도된다. 그러한 장애는 예를 들어 장애를 앓는 대상의 괴영향 세포 또는 조직에서의 세포 표면 상의 ErbB2의 발현 또는 수준의 증가에 의해, 또는 장애의 병리에 기여하거나 장애의 악화에 기여하는 세포 유형, 예컨대 암 세포 내 ErbB2-매개 활성의 증가에 의해 입증될 수 있다. ErbB2 수준의 증가는, 예를 들어 항-ErbB2 항체를 이용하여 검출될 수 있다. ErbB2 활성의 증가는 ErbB2의 증가된 인산화, MAPK 경로의 활성화, p38-TSP-1 경로의 활성화, PI3K 경로의 활성화, CDC2의 억제, 및 이들의 조합에 의해 검출될 수 있다.

<385> 본 발명의 또 다른 측면은 암의 증식 억제를 필요로 하는 대상에게 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 투여하는 단계(여기에서, 상기 표적화된 결합제 또는 항체 또는 부분은 ErbB2를 억제함)를 포함하는, 상기 대상에서의 ErbB2를 발현하는 암 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면은 ErbB2 발현 세포를 표적화된 결합제, 항-ErbB2 항체 또는 이의 항원 결합 부분과 접촉시키는 단계(여기에서, 세포 내 ErbB2 활성은 (a) ErbB2의 인산화; (b) MAPK 경로의 활성화; (c) p38-TSP-1 경로의 활성화; (d) p38-TSP-1 경로의 활성화; (e) CDC2의 억제; 및 (f) 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택됨)를 포함하는, 상기 세포 내 ErbB2 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 대상 내의 것이다.

<386> 표적화된 결합제 및/또는 항체는 1회 투여될 수 있으나, 더욱 바람직하게는 다회 투여된다. 표적화된 결합제 및/또는 항체는 1일 3회 내지 매6개월 이상 1회 투여될 수 있다. 1일 3회, 1일 2회, 1일 2회, 매2일 1회, 매3일 1회, 매주 1회, 매2주 1회, 매월 1회, 매2개월 1회, 매3개월 1회, 및 매6개월 1회의 스케줄로 투여될 수 있다. 표적화된 결합제 및/또는 항체는 또한 미니펌프를 통해 연속적으로 투여될 수 있다. 표적화된 결합제 및/또는 항체는 경구, 점막, 비강, 흡입, 정맥내, 피하, 근육내, 복강내, 안내, 척추내, 비경구, 점막내 또는 국소 경로를 통해 투여될 수 있다. 표적화된 결합제 및/또는 항체는 국지적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다.

<387> 표적화된 결합제 및/또는 항-ErbB2 항체를 포함하는 치료적 조성물은 대상에게 예를 들어 경구, 비강, 질,

버갈, 직장으로, 또는 눈을 통하거나 폐 경로를 통해, 당업자에게 친숙한 각종 약학적으로 허용되는 투약 형태로 투여될 수 있다.

- <388> 예를 들어, 항-ErbB2 항체는 비강 취입기 장치를 이용하여 비강 경로를 통해 투여될 수 있다. 그것의 예는 비강 용도를 위해 의도된 상업용 분말 시스템(예를 들어, 피슨스 로무달 시스템(Fisons Lomudal System))을 위해 이미 이용되고 있다. 다른 장치의 상세 내용은 약학 문헌에서 찾아볼 수 있다(예를 들어, 문헌 [Bell, A. Intranasal Delivery Devices, in Drug Delivery Devices Fundamentals and Applications, Tylc P. (ed), Dekker, New York, 1988]을 참조한다).
- <389> 항-ErbB2 항체는 동결 건조된 분말 제형물로 질에 투여될 수 있다. 항-ErbB2 항체는 질 애플리케이션에 또한 질에 1회 투여될 수 있고, 항-ErbB2 항체를 포함하는 제형물은 애플리케이션 상에 주사기형 피스톤 또는 유사한 방출 기작을 가압함으로써 방출된다. 대안적으로, 항-ErbB2 항체는 분말 장치를 이용하여 분말로서 제형되어, 질 좌약 또는 페서리(pessary), 또는 질 정제 또는 질 젤로 제형될 수 있다.
- <390> 항-ErbB2 항체는 또한 젤 제형물로 눈에 투여될 수 있다. 예를 들어, 투여 전에, 항-ErbB2 항체를 함유하는 제형물이 편리하게 2-구획(compartment) 단위 용량 용기에 포함되도록 할 수 있는데, 이 때 한 구획은 동결 건조된 항-ErbB2 항체 제제를 함유하고, 다른 구획은 노말 염수를 함유한다. 적용 전에, 두 구획을 혼합하고, 젤을 형성한 후, 이를 눈에 투여한다.
- <391> 항-ErbB2 항체에 대한 다른 전달 경로는 분말 흡입기 또는 계측 용량 흡입기를 이용하여 폐 경로를 통하는 것, 정제 또는 버갈 패치로 제형되는 버갈 경로를 통하는 것, 좌약으로 제형되는 직장 경로를 통하는 것, 및 정제, 캡슐 또는 펠렛으로 제형되는 경구 경로를 통하는 것(이 조성물은 위, 소장 또는 결장을 통해 제제를 투여할 수 있음)을 포함하고, 상기 모두는 당업자에게 공지된 기법에 따라 제형될 수 있다.
- <392> 항체는 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 약학적 조성물의 일부로서 투여될 것이다. 항체의 투약량은 일반적으로 0.1 내지 100 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 50 mg/kg, 더욱 바람직하게는 1 내지 20 mg/kg, 및 더욱 더 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg의 범위일 것이다. 항체의 혈청 농도는 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- <393> 부가적 치료제와의 항체의 공동 투여(조합 요법)는 항-ErbB2 항체 및 부가적 치료제를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것뿐만 아니라, 2개 이상의 분리된 약학적 조성물(이 중 하나는 항-ErbB2 항체를 포함하고, 다른 것(들)은 부가적 치료제(들)를 포함함)을 포함하는 것을 포괄한다. 또한, 공동 투여 또는 조합 요법이 일반적으로 항체 및 부가적 치료제가 상호 동시에 투여되나, 그것은 또한 항체 및 부가적 치료제가 상이한 시점에 투여되는 경우들도 포괄한다. 예를 들어, 항체는 매3일 1회 투여될 수 있고, 한편 부가적 치료제는 1일 1회 투여된다. 대안적으로, 항체는 장애를 부가적 치료제로 치료하기 전 또는 후에, 예를 들어 대상이 부가적 제제를 이용한 요법에 실패한 후에, 투여될 수 있다. 유사하게, 항-ErbB2 항체의 투여는 다른 요법, 예컨대 면역요법 전 또는 후에 투입될 수 있다.
- <394> 항체 및 하나 이상의 부가적 치료제(조합 요법)는 1회, 2회, 또는 적어도 증상이 치료, 일시 완화 또는 치유될 때까지의 시간 동안 투여될 수 있다. 바람직하게, 조합 요법은 다회 투입될 수 있다. 조합 요법은 1일 3회 내지 매6개월 1회 투여될 수 있다. 1일 3회, 1일 2회, 1일 2회, 매2일 1회, 매3일 1회, 매주 1회, 매2주 1회, 매월 1회, 매2개월 1회, 매3개월 1회, 및 매6개월 1회의 스케줄로 투여될 수 있거나, 미니펌프를 통해 연속적으로 투여될 수 있다. 조합 요법은 경구, 점막, 버갈, 비강내, 흡입, 정맥내, 피하, 안내, 척추내, 복강내, 근육내, 비경구, 종양내 또는 국소 경로를 통해 투여될 수 있다.
- <395> 또 다른 실시양태에서, 항-ErbB2 항체는 방사성표지, 면역독소 또는 독소로 표지되거나, 독성 펩티드를 포함하는 융합 단백질이다. 항-ErbB2 항체 또는 항-ErbB2 항체 융합 단백질은 방사성표지, 면역독소, 독소 또는 독성 펩티드를 ErbB2-발현 세포에 지정한다. 또 다른 실시양태에서, 방사성표지, 면역독소, 독소 또는 독성 펩티드는 항-ErbB2 항체가 세포 표면 상의 ErbB2에 결합한 후에 내면화된다.
- <396> 유전자 요법
- <397> 본 발명의 핵산 분자는 유전자 요법을 통해 그것을 필요로 하는 대상에게 투여될 수 있다. 본 요법은 생체내 또는 생체외일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 모두를 코딩하는 핵산 분자가 대상에게 투여된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 핵산 분자는, B세포가 항체 생산을 위해 분화된 것이기 때문에 그것이 B 세포의 염색체 내에 안정하게 일체화되도록 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 전구체 B 세포는 세포의 형질감염 또는 감염되어, 필요로 하는 대상에게 이식된다. 또 다른 실시양태에서, 전구체 B 세포 또는 다른 세포는 관심 세포

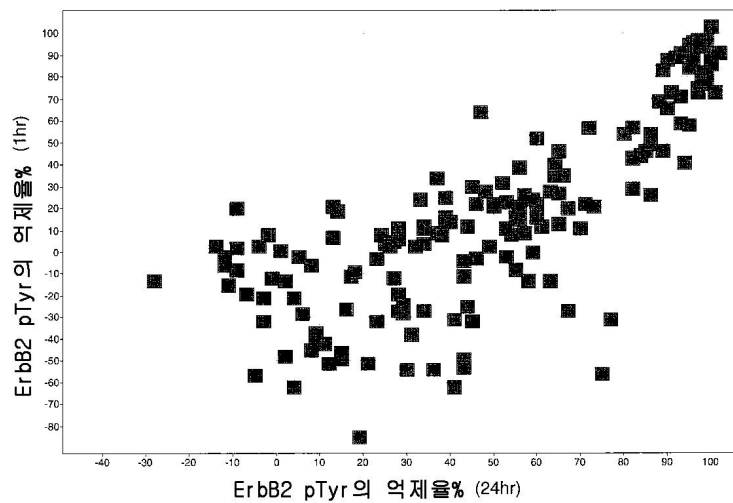
유형을 감염시키는 것으로 알려진 바이러스를 이용하여 생체내 감염된다. 유전자 요법에 사용되는 전형적인 벡터에는 리포솜, 플라스미드 및 바이러스 벡터가 포함된다. 예시적 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스이다. 생체내 또는 생체의 감염 후에, 항체 발현의 수준은 피처리 대상으로부터의 샘플을 취하여 당업계에 공지되어 있거나 본원에 논의되는 임의의 면역검정법을 이용함으로써 모니터링될 수 있다.

<398> 또 다른 실시양태에서, 유전자 요법의 방법은 항-ErbB2 항체의 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 투여하는 단계, 및 핵산 분자를 발현하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 요법의 방법은 항-ErbB2 항체의 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 투여하는 단계, 및 핵산 분자를 발현하는 단계를 포함한다. 더욱 바람직한 방법에서, 유전자 요법의 방법은 본 발명의 항-ErbB2 항체의, 중쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자, 및 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 투여하는 단계, 및 핵산 분자를 발현하는 단계를 포함한다. 유전자 요법의 방법은 또한 또 다른 치료제, 예컨대 항암제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

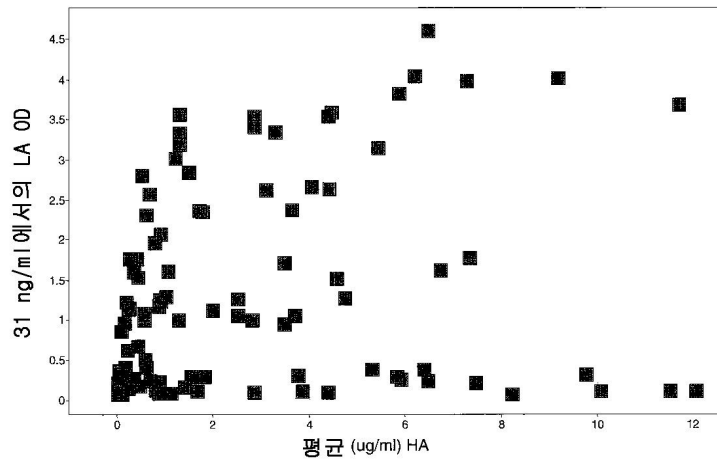
<399> 본 발명을 보다 잘 이해하도록 하기 위해, 하기 실시예가 제공된다. 본 실시예는 단지 예시하기 위한 목적의 것으로서, 본 발명의 범주를 어떠한 식으로도 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

도면

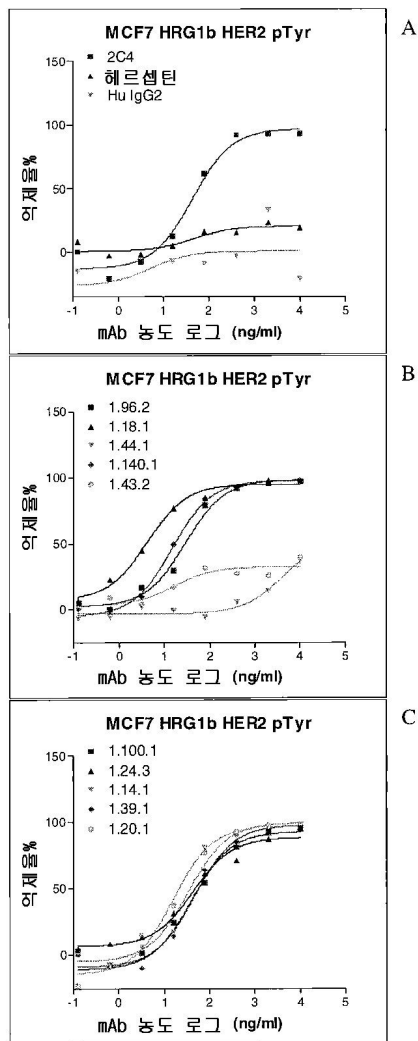
도면1



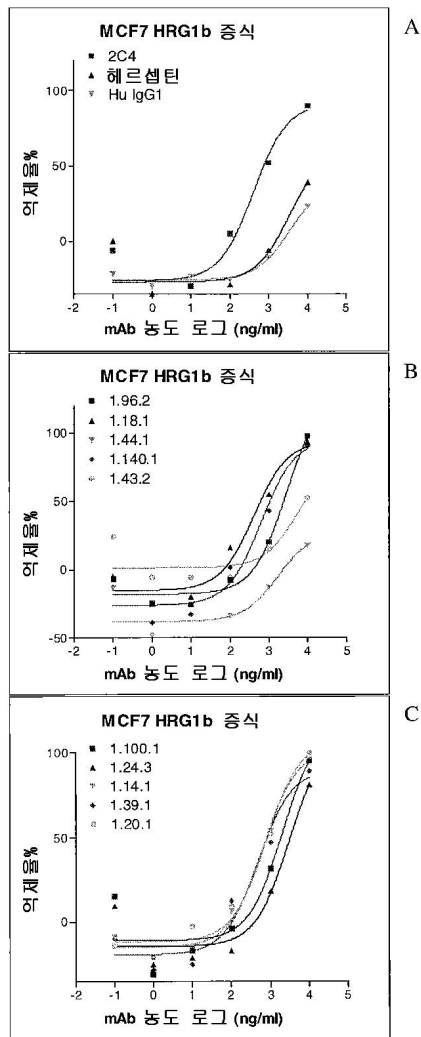
도면2



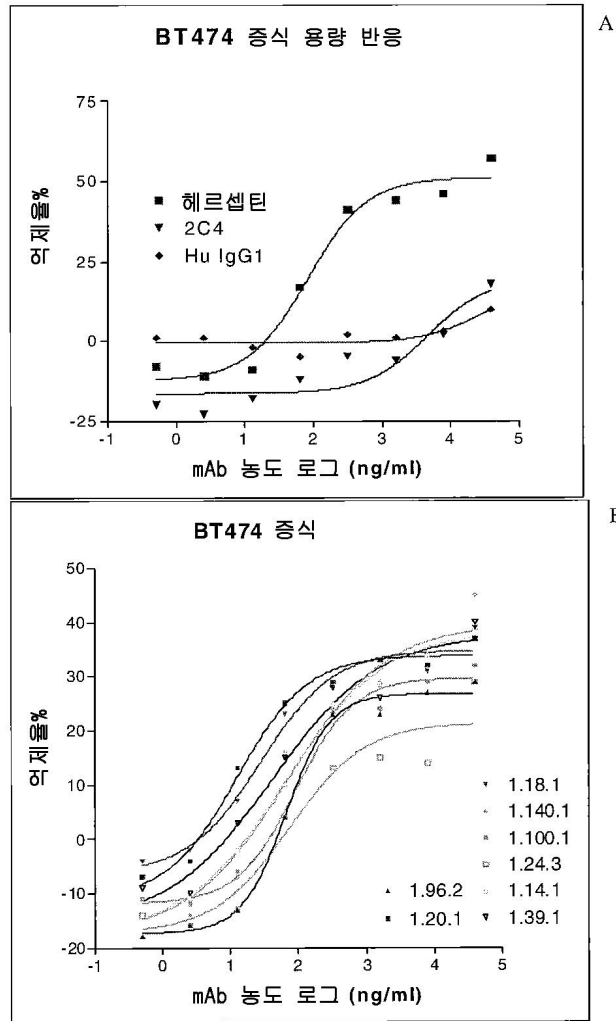
도면3



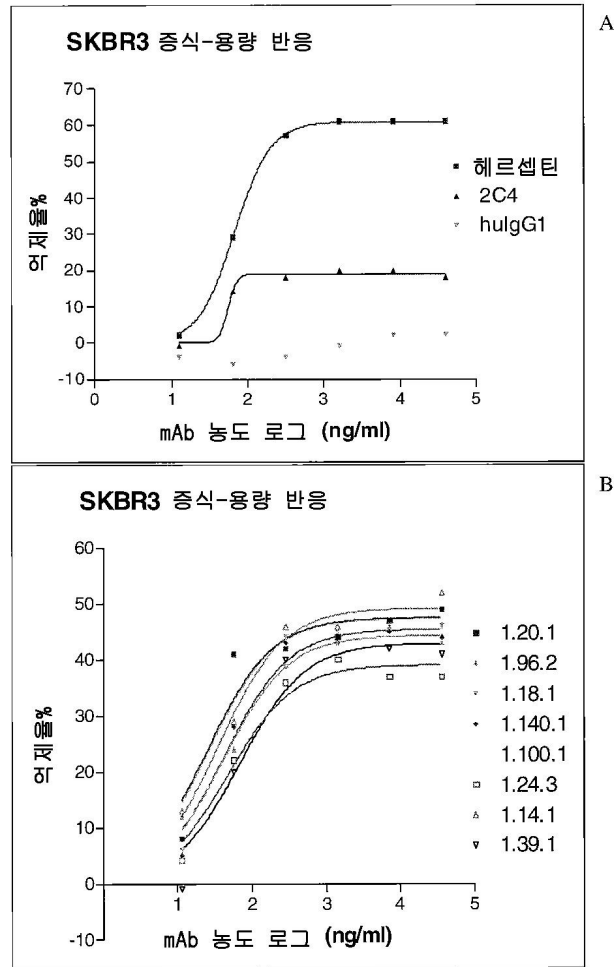
도면4



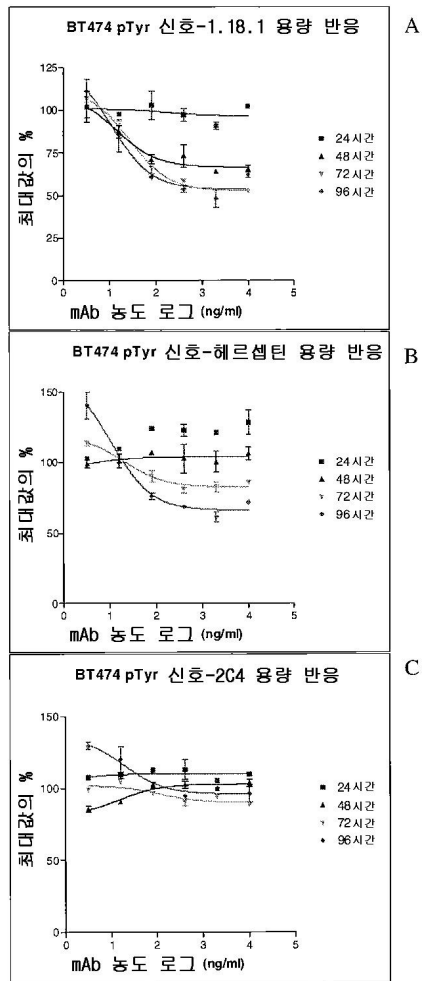
도면5



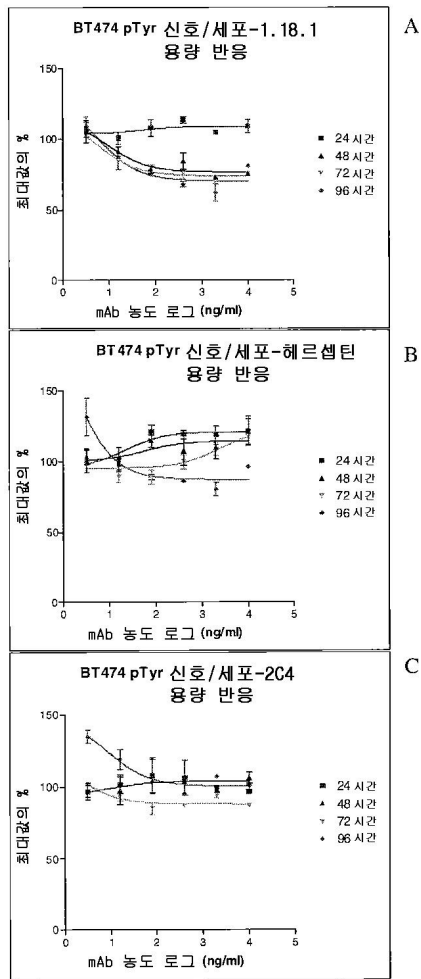
도면6



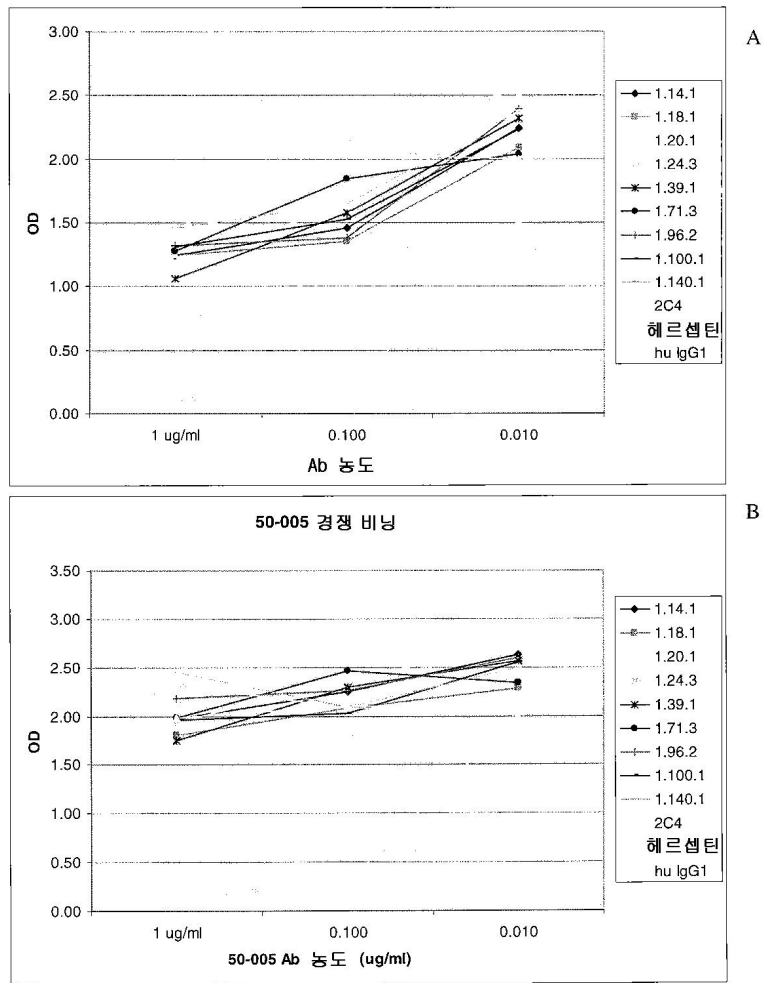
도면7



도면8



도면9



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Astrazeneca AB
- <120> ANTIBODIES TO ERBB2
- <130> ASTR-006/01WO
- <150> US 60/835,514
- <151> 2006-08-04
- <160> 59
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 387

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtcctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gaggcacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tgcagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 ggcccgatta ctattgttcg gggagtttac tactacttct acggtatgga cgtctggggc 360
 caagggacca cggtcaccgt ctctca 387

<210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Lys Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gaggtgcagc tggtagtc tggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgccaggct 120
 ccacggaagg ggcctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300

gatggetaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

- <210> 6
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctgctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtcagcca gagtgtcttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggtagcagc agagaccagg acagcctcct aatttgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Arg
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 9
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctcggatt cacctttagt agctattgga tgcactgggt cgcagact 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcagg atggaagtga gaaatactat 180
 tggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgcat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgcgt attactgtgc gagtttccgg 300
 gactacggta tggacgtctg gggccaaggg accacgtca ccgtctctc a 351

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gacatccaga tgacceagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggcattagc aatcatttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaaccgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caagttatit ctgccaacag tataaagggtt acccgatcac ctctcgccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Gly Tyr Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60

tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgcaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaaggccg attcacatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

 atcacctgca agtcagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttaact 120

 tgggtaccagc agagaccggg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctaccgg 180

 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

 atcaacaacc tgcaggtga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300

 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatataaaa 339

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

- <210> 17
- <211> 363
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 17
 gaggtgcagc tggctggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaacctgtgt caccgtctcc 360
 tca 363

- <210> 18
- <211> 121

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19

gacatcgtga tgacceagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggcacc 60

atcacctgca agtcagcca gagtgTTTT ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggTaccagc agagaccagg acagcctect aacctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gagTccgggg tcctgaccg attcagTggc agcgggtgtg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc Tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 21
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgttttt ttcgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggtagcagc agagaccagg acagcctcct aacctcctct tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactc tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Leu Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 25

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catttactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccaic tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag cgccgaggac acggctgtgt attcctgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gacatcgtga tgaccagtc tccaggctcc ctggttgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

 atcacctgca agtcagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120

 tggtagcagg agagaccagg acagtctctt aacctgctca tttactgggc atctaccgg 180

 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300

 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatataaaa 339

<210> 28
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 29
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 gaggtgcagc tggctggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacca tgaactgggt cgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catttactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag cgccgaggac acggctgtgt attcctgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaacctgtgt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 30
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31

gacatcgtga tgacceagtc tccaggctcc ctggttgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcacctgca agtcagcca gagtgTTTT ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggTaccagc agagaccagg acagtctect AACtgetca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagTggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 32
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 33
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tgggtaccagc agagaccagg acagcctcct aacctactca tttactgggc atcttcccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg gttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cgctctcacc 240
 atcagcagcc tgcagactga ggatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 36
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccaic tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gacatcgtga tgaccagtt tccagactcc ctggctgtgt ctctggacga aagggccacc 60

 atcaactgca agtccagtc gagtgTTTT ttcgctcca acaataagaa ctgcttagct 120

 tggTaccagc agaaaccagg acagcctcct aatctgctca tttactgggc atctaccgg 180

 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

 atcagcagcc tgcaggtga agatgtggct ttttattact gtcagcaata ttatagttct 300

 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 40
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 41
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 gaggtgcagc tggtagc tgggggagc ttggttcagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcactgggt cgccaagct 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtagacac attctatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc ctgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agaggggtat 300
 agcagtgggc gctacttcta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 42
 <211> 123

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Arg Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 43
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 gatgttgatga tgactcagtc tccaactctcc ctgcccgtea cccttggaca gccggcctcc 60

atatcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta ctggaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtac aactggccg 300
 ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 44
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 45
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro

930

935

940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val

1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 46
 <211> 1624
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 gcgtgctgat caggactgca cacagagaac tcaccatgga atttgggctg cgctgggttt 60

tccttgttgc tattttaaaa gatgtccagt gtgacgtgca actggtggag tccgggggag 120
 gcttagttca gcctgggggg tcctgagac tctcctgcgc agcctctgga ttgcctaca 180
 gtagttttt gatgactgg gtccccaag ctccaggag gggcttggt tgggtctcac 240
 gtattaatcc tgatgggaga atcacagtct acgcgacgc cgtaaagggc cgattcacca 300
 tctccagaga caacgccaag aacacgctct atctccaaat gaacaacctg agagccgagg 360
 acacggctgt ttattactgt gcaagagga cacgatttct ggagtgact tctaggggac 420
 aatggacca gtggggccag ggaacctgg tcaactgtctc ctcagcctcc accaagggcc 480
 catcgtctt cccctggca ccctctcca agagcacctc tgggggcaca gcggcctgg 540
 gctgcctggt caaggactac ttcccgaac cgtgacggt gtcgtggaac tcaggcggcc 600
 tgaccagcg cgtagcacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc tactccctca 660
 gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tggcaccca gacctacatc tgcaactga 720
 atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa 780
 ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct 840
 tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac cctgaggtc acatgcgtgg 900
 tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg 960
 aggtgcataa tgccaagaca aagccgagg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg 1020
 tcagctcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg 1080
 tctcaaca agcctccca gccccatcg agaaaacct ctccaagcc aaaggcagc 1140
 cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg 1200

tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga 1260
gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct 1320
ccttcttctt ctacagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacctct 1380
tctcatgctc cgigatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc 1440
tgtctccggg taaatgagtg cgacggcccg caagcccccg ctccccgggc tctcgcggtc 1500
gcacagggat gcttggcagc taccctgtgt acatacttcc cgggcgcca gcatggaaat 1560
aaagcaccca gcctgcctt ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
aaaa 1624

<210> 47
<211> 938
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 47
gttcaggaca cagcatggac atgaggttcc ccgctcagct cctggggctc ctgctactct 60
ggctccgagg tgccagatgt gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcag 120
ctgtaggaga cagagtcacc atcgcttggc gggcaagtca gagcattgcc gactatttaa 180
attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaaactcct gatctatggt tcaccagtt 240
tgcaaagcgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctct 300
ccatcagcag tctacaacct ggagattttg caacttacta ctgtcaacag agtcacactt 360
cccccttacc ttttggcgga gggaccaagg tgcagatgaa gcgaactgtg gctgcacat 420
ctgtcttcat ctcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tetgttgtgt 480
gcctctgtaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc 540

tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca 600

gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct 660

gcgaagtac ccatacagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt 720

gttagaggga gaagtgcccc cacctgctcc tcagttccag cctgaccccc tcccatcctt 780

tggcctctga ccctttttcc acaggggacc taccctatt gcggtcctcc agctcatctt 840

tcacctacc ccctcctcc tccttgctt taattatgct aatgttgag gagaatgaat 900

aaataaagtg aatctttgca cctaaaaaaaa aaaaaaaaa 938

<210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Phe Thr
 1 5

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

35

40

45

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110

Lys

<210> 52
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Thr His Trp Xaa Xaa Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 54
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(100)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (106)..(106)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Asp Gly Tyr Asn Tyr Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 56
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (103)..(104)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 56

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Xaa Gly Tyr Ser Ser Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

100

105

110

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

<210> 57
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(101)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 57

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(99)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 58

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(102)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 59

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Ile Thr Met Val Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser