



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0040101
(43) 공개일자 2024년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 51/1027 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2024-7006400
(22) 출원일자(국제) 2022년08월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/039302
(87) 국제공개번호 WO 2023/014810
국제공개일자 2023년02월09일
(30) 우선권주장
63/229,134 2021년08월04일 미국(US)

(71) 출원인
에이비프로 코퍼레이션
미국 01801 매사추세츠 우번 커밍스 파크 드라이브 68
(72) 발명자
롤로 제임스
미국 01801 매사추세츠 우번 커밍스 파크 드라이브 68
무다 마르코
미국 01801 매사추세츠 우번 커밍스 파크 드라이브 68
(74) 대리인
김진희, 김태홍

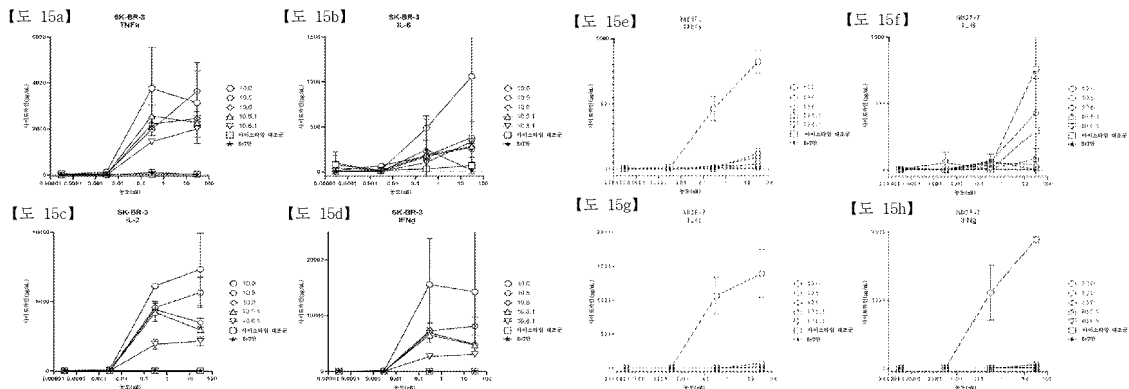
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 항-HER2 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 HER2 단백질에 결합할 수 있는 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)에 관한 것이다. 본 발명의 기술의 항체는 HER2 관련 암의 검출 및 치료를 필요로 하는 대상에서 HER2 관련 암을 검출하고 치료하는 방법에 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 51/1045 (2020.05)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

G01N 33/57492 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

머피 샤운

미국 01801 매사추세츠 우번 커밍스 파크 드라이브

68

펠릭 아담

미국 01801 매사추세츠 우번 커밍스 파크 드라이브

68

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서

- (a) (i) V_H 은 서열번호 1의 V_H -CDR1 서열, 서열번호 2 또는 서열번호 7의 V_H -CDR2 서열, 및 서열번호 8의 V_H -CDR3 서열을 포함하거나;
- (ii) V_H 은 서열번호 1의 V_H -CDR1 서열, 서열번호 7의 V_H -CDR2 서열, 및 서열번호 3 또는 서열번호 8의 V_H -CDR3 서열을 포함하고/하거나;
- (b) (i) V_L 은 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하거나;
- (ii) V_L 은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하거나; 또는
- (iii) V_L 은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 (a) V_H 은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고/하거나; (b) V_L 은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

각각, 하기로 이루어지는 군에서 선택되는 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H) 아미노산 서열과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L) 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

서열번호 13과 서열번호 14,
 서열번호 15와 서열번호 16,
 서열번호 17과 서열번호 14,
 서열번호 15와 서열번호 18,
 서열번호 15와 서열번호 19, 및
 서열번호 15와 서열번호 20.

청구항 4

제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 제3 폴리펩타이드 사슬 및 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 항체로서, 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬과 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제3 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있으며, 여기서

- (a) 제1 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로,

- (i) 제1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인;
- (ii) 제1 면역글로불린의 경쇄 불변 도메인;
- (iii) 아미노산 서열 (GGGGS)₃을 포함하는 가요성 펩타이드 링커; 및
- (iv) 제2 면역글로불린의 상보적 중쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인, 또는 제2 면역글로불린의 상보적 경쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인은 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있으며, 아미노산 서열 (GGGGS)₆을 포함하는 가요성 펩타이드 링커를 통해 함께 연결되어 단일 사슬 가변 단편을 형성하고;
- (b) 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로,
 - (i) 제1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인과,
 - (ii) 제1 면역글로불린의 중쇄 불변 도메인을 포함하고,
 여기서 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나를 포함하고/하거나, 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나를 포함하는 항체.

청구항 5

각각, 하기로 이루어지는 군에서 선택되는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편:

- 서열번호 21과 서열번호 22,
- 서열번호 21과 서열번호 23,
- 서열번호 21과 서열번호 24,
- 서열번호 21과 서열번호 25,
- 서열번호 21과 서열번호 26,
- 서열번호 21과 서열번호 27,
- 서열번호 21과 서열번호 28,
- 서열번호 21과 서열번호 29,
- 서열번호 21과 서열번호 30,
- 서열번호 21과 서열번호 31,
- 서열번호 21과 서열번호 32,
- 서열번호 21과 서열번호 33,
- 서열번호 34와 서열번호 33,
- 서열번호 21과 서열번호 35,
- 서열번호 36과 서열번호 33,
- 서열번호 21과 서열번호 37,
- 서열번호 21과 서열번호 38,
- 서열번호 21과 서열번호 39,
- 서열번호 21과 서열번호 40,
- 서열번호 21과 서열번호 41,

서열번호 21과 서열번호 42,
 서열번호 21과 서열번호 43,
 서열번호 21과 서열번호 44,
 서열번호 21과 서열번호 45,
 서열번호 21과 서열번호 46,
 서열번호 21과 서열번호 47,
 서열번호 21과 서열번호 48,
 서열번호 21과 서열번호 49,
 서열번호 21과 서열번호 50,
 서열번호 21과 서열번호 51,
 서열번호 21과 서열번호 52,
 서열번호 21과 서열번호 53,
 서열번호 21과 서열번호 54,
 서열번호 21과 서열번호 55,
 서열번호 21과 서열번호 56,
 서열번호 21과 서열번호 57,
 서열번호 21과 서열번호 58,
 서열번호 21과 서열번호 59,
 서열번호 21과 서열번호 60,
 서열번호 21과 서열번호 61,
 서열번호 21과 서열번호 62,
 서열번호 21과 서열번호 63,
 서열번호 21과 서열번호 64,
 서열번호 21과 서열번호 65,
 서열번호 21과 서열번호 66,
 서열번호 21과 서열번호 67,
 서열번호 21과 서열번호 68,
 서열번호 21과 서열번호 69,
 서열번호 21과 서열번호 70,
 서열번호 21과 서열번호 71,
 서열번호 21과 서열번호 72, 및
 서열번호 21과 서열번호 85.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD 및 IgE로 이루어지는 군에서 선택되는 아이소타입의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, N297A, L234A, L235A 및 K322A로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 불변 영역을 포함하는 항체.

청구항 8

제6항에 있어서, S228P 돌연변이를 포함하는 IgG4 불변 영역을 포함하는 항체.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, F(ab')₂, Fab', scF_v 및 F_v로 이루어지는 군에서 선택되는 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체인 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, α-1,6-푸코오스 변형이 결여되어 있는 항체.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편이 T세포, B세포, 골수세포, 형질세포 또는 비만세포에 결합하는, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편이 CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, TCR 감마/델타, Nkp46, KIR 또는 소분자 DOTA 합텐에 결합하는, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 재조합 핵산 서열.

청구항 15

제14항의 재조합 핵산 서열을 포함하는 숙주세포 또는 벡터.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편과, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물로서, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 동위원소, 염료, 크로마젠, 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종, 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제에 선택적으로 결합된 것인 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 동위원소, 염료, 크로마젠, 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종, 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 18

암의 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 제16항 또는 제17항의 약제학적 조성물의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편이 HER2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 암이 고형 종양인, 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 암이 유방암, 위암, 골육종, 결합조직형성 소원형세포암, 두경부암의 편평세포암종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 다형성 교모세포종, 위 집합부 선암종, 위식도 집합부 선암종, 자궁경부암, 타액선암, 연조직 육종, 백혈병, 흑색종, 유잉 육종, 횡문근육종 또는 신경모세포종인, 방법.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편이 추가 치료제와 별도로, 순차적으로 또는 동시에 대상에게 투여되는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 추가 치료제가 알킬화제, 백금제, 타산(taxane), 빈카제(vinca agent), 항에스트로겐 약물, 아로마타아제 저해제, 난소 억제제, VEGF/VEGFR 저해제, EGF/EGFR 저해제, PARP 저해제, 세포증식 억제 알칼로이드, 세포독성 항생제, 항대사산물, 내분비/호르몬 작용제, T세포 및 비스포스포네이트 요법제 중 하나 이상인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 추가 치료제가 면역 조절/자극 항체인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 면역 조절/자극 항체가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-TIM3 항체, 항-4-1BB 항체, 항-CD73 항체, 항-GITR 항체 또는 항-LAG-3 항체인, 방법.

청구항 25

대상의 생체내에서 암을 검출하는 방법으로서,

(a) 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량을 대상에게 투여하는 단계로서, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 HER2를 발현하는 암 세포에 국소화되도록 구성되고, 방사성동위원소로 표지된 것인 단계와,

(b) 참조 값보다 높은 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 방출되는 방사능 수준을 검출하는 방식으로 대상에서 종양의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 대상이 암으로 진단되거나 암을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상인, 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 방출되는 방사능 수준이 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography) 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(single photon emission computed tomography)을 사용하여 검출되는, 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 방사성핵종에 접합된 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 고형 종양인, 방법.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 위암, 골육종, 결합조직형성 소원형세포암, 두경부암의 편평세포 암종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 다형성 교모세포종, 위 접합부 선암종, 위식도 접합부 선암종, 자궁경부암, 타액선암, 연조직 육종, 백혈병, 흑색종, 유잉 육종, 횡문근육종 또는 신경모세포종인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편과, 사용 설명서를 포함하는 키트.

청구항 32

제31항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편이 방사성 표지, 형광 표지 및 발색 표지로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 검출 가능한 표지에 커플링되어 있는, 키트.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 2차 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 34

생물학적 샘플에서 HER2 단백질 발현 수준을 검출하는 방법으로서, 생물학적 샘플을 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계와, 생물학적 샘플에서 HER2 단백질에 대한 결합을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, T세포 및/또는 CD3에 결합하는 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 36

제35항의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편으로 생체외에서 무장된(armed) T세포.

청구항 37

치료용 T세포를 생체외에서 제조하는 방법으로서, 제35항의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편을 T세포에 결합시키는 단계를 포함하며, 여기서 T세포는 선택적으로 인간 T세포이고, 결합은 비공유결합인 방법.

청구항 38

암의 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법으로서, 제36항의 T세포의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2021년 8월 4일자 출원된 미국 임시출원 제63/229,134호를 우선권 주장하며, 상기 문헌의 전체 내용은 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명의 기술은 일반적으로 HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)의 제조 및 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 기술은 HER2 결합 항체의 제조, 및 HER2 관련 암을 검출하고 치료하는 데 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 본 발명의 기술의 배경기술에 대한 하기 설명은 단순히 본 발명의 기술에 대한 이해를 돕기 위한 것으로, 본 발명의 기술에 대한 선행 기술을 설명하거나 구성하는 것으로 인정되지 않는다.
- [0006] 암에 대한 단클론 항체(mAb) 기반 요법은 혈액학적 악성종양과 비혈액학적 악성종양을 모두 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 가장 성공적인 전략 중 하나이다.
- [0007] mAb에 대한 주요 임상 성과 중 하나는 HER2의 세포외 도메인에 결합하는 인간화 단클론 항체인 트라스투주맙(trastuzumab, 상품명 Herceptin)의 발견이었다. 실제로, HER2 양성 유방암의 경우, 표준 치료 요법에는 트라스투주맙과 병용되는 화학요법이 포함된다. 트라스투주맙은 세포 성장과 증식을 저해하도록 설계되어 있으며, 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통해 HER2 양성 종양 세포를 사멸시킨다. 유방암과 위암에서 종래 화학요법과 트라스투주맙의 병용, 및 단일 작용제로서의 트라스투주맙의 사용은 모두 HER2가 증폭된 환자의 무진행 생존기간을 연장시키는 것으로 입증되었다. 중요한 것은, 표준 HER2 표적화 요법이 HER2 면역조직화학(IHC) 3+(즉, 강하게 과발현되어 있음) 또는 SPoT-Light® HER2 Chromogenic IHC(CISH) 양성(즉, *ERBB2* 유전자가 증폭되어 있음) 점수를 받은 환자에만 제공된다는 점이다. 하지만, 상당수의 환자군은 이러한 표적화 요법에 대해 반응하지 않으며, 초기에 반응하는 환자의 대부분은 트라스투주맙 치료에 대한 내성을 획득한다. HER2 다운스트림 신호전달 경로와 병행되는 수용체 티로신 키나아제 경로의 활성화를 포함하는 트라스투주맙 내성에 기여하는 다수의 메커니즘이 존재하며, 이러한 메커니즘은 모두 트라스투주맙 내성에 맞서기 위한 잠재적인 표적을 제공한다. 내성의 주요 메커니즘은 종양 진행과 무관하게 HER2 신호전달을 저해하는 우회 신호전달 경로의 활성화와 관련이 있다. HER2+ 유방암의 최대 70%가 트라스투주맙의 단일 작용제 치료에 대해 내성을 나타내게 된다. 약물 내성에도 불구하고, 이러한 종양은 일반적으로 여전히 HER2를 과발현한다.
- [0008] 따라서, 신호전달 저해에 대한 내성을 극복하여 더 많은 환자에게 유익을 제공하는 대안적인 HER2 표적화 요법을 개발하는 것이 절실하게 요구되고 있다.

발명의 내용

- [0009] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 (a) (i) V_H 은 서열번호 1의 V_H -CDR1 서열, 서열번호 2 또는 서열번호 7의 V_H -CDR2 서열, 및 서열번호 8의 V_H -CDR3 서열을 포함하거나; (ii) V_H 은 서열번호 1의 V_H -CDR1 서열, 서열번호 7의 V_H -CDR2 서열, 및 서열번호 3 또는 서열번호 8의 V_H -CDR3 서열을 포함하고/하거나; (b) (i) V_L 은 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하거나; (ii) V_L 은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하거나; 또는 (iii) V_L 은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L -CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L -CDR2 서열, 및 서열번호 12의 V_L -CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0010] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 (a) V_H 은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고/하거나; (b) V_L 은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 각각, 서열번호 13과 서열번호 14, 서열번호 15와 서열번호 16, 서열번호 17과 서열번호 14, 서열번호 15와 서열번호 18, 서열번호 15와 서열번호 19, 및 서열번호 15와 서열번호 20으로 이루어지는 군에서 선택되는 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H) 아미노산 서열과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L) 아미노산 서열을 포함한다.
- [0011] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 제3 폴리펩타이드 사슬 및 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 항체로서, 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬과 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제3 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있으며, 여기서 (a) 제1 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) 제1 에피토프에 특이적

으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인; (ii) 제1 면역글로불린의 경쇄 불변 도메인; (iii) 아미노산 서열 (GGGGS)₃을 포함하는 가요성(flexible) 펩타이드 링커; 및 (iv) 제2 면역글로불린의 상보적 중쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인, 또는 제2 면역글로불린의 상보적 경쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인은 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있으며, 아미노산 서열 (GGGGS)₆을 포함하는 가요성 펩타이드 링커를 통해 함께 연결되어 단일 사슬 가변 단편을 형성하고; (b) 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) 제1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인과, (ii) 제1 면역글로불린의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 여기서 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나를 포함하고/하거나, 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나를 포함하는 항체를 제공한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은, 각각, 서열번호 21과 서열번호 22, 서열번호 21과 서열번호 23, 서열번호 21과 서열번호 24, 서열번호 21과 서열번호 25, 서열번호 21과 서열번호 26, 서열번호 21과 서열번호 27, 서열번호 21과 서열번호 28, 서열번호 21과 서열번호 29, 서열번호 21과 서열번호 30, 서열번호 21과 서열번호 31, 서열번호 21과 서열번호 32, 서열번호 21과 서열번호 33, 서열번호 34와 서열번호 33, 서열번호 21과 서열번호 35, 서열번호 36과 서열번호 33, 서열번호 21과 서열번호 37, 서열번호 21과 서열번호 38, 서열번호 21과 서열번호 39, 서열번호 21과 서열번호 40, 서열번호 21과 서열번호 41, 서열번호 21과 서열번호 42, 서열번호 21과 서열번호 43, 서열번호 21과 서열번호 44, 서열번호 21과 서열번호 45, 서열번호 21과 서열번호 46, 서열번호 21과 서열번호 47, 서열번호 21과 서열번호 48, 서열번호 21과 서열번호 49, 서열번호 21과 서열번호 50, 서열번호 21과 서열번호 51, 서열번호 21과 서열번호 52, 서열번호 21과 서열번호 53, 서열번호 21과 서열번호 54, 서열번호 21과 서열번호 55, 서열번호 21과 서열번호 56, 서열번호 21과 서열번호 57, 서열번호 21과 서열번호 58, 서열번호 21과 서열번호 59, 서열번호 21과 서열번호 60, 서열번호 21과 서열번호 61, 서열번호 21과 서열번호 62, 서열번호 21과 서열번호 63, 서열번호 21과 서열번호 64, 서열번호 21과 서열번호 65, 서열번호 21과 서열번호 66, 서열번호 21과 서열번호 67, 서열번호 21과 서열번호 68, 서열번호 21과 서열번호 69, 서열번호 21과 서열번호 70, 서열번호 21과 서열번호 71, 서열번호 21과 서열번호 72, 및 서열번호 21과 서열번호 85로 이루어지는 군에서 선택되는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

[0013] 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD 및 IgE로 이루어지는 군에서 선택되는 아이소타입의 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 N297A, L234A, L235A 및 K322A로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 불변 영역을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 S228P 돌연변이를 포함하는 IgG4 불변 영역을 포함한다.

[0014] 본원에 개시된 항원 결합 단편의 임의의 및 모든 실시형태에서, 항원 결합 단편은 Fab, F(ab')₂, Fab', scFv 및 Fv로 이루어지는 군에서 선택된다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항체 또는 항원 결합 단편은 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체이고/이거나, α-1,6-푸코오스 변형이 결여되어 있다.

[0015] 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편의 임의의 및 모든 실시형태에서, 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 T세포, B세포, 골수세포, 형질세포 또는 비만세포에 결합한다. 부가적으로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편의 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, TCR 감마/델타, NKp46, KIR 또는 소분자 DOTA 합텐에 결합한다.

[0016] 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 T세포 및/또는 CD3에도 결합한다. 하나의 양태에서, 본 개시내용은 T세포 및/또는 CD3에도 결합하는 본 발명의 기술의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편으로 생체외에서 무장된(armed) T세포를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 치료용 T세포를 생체외에서 제조하는 방법으로서, T세포를 T세포 및/또는 CD3에 결합할 수 있는 본 발명의 기술의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편으로 생체외에서 무장시키는 단계를 포함하며, 여기서 T세포는 선택적으로 인간 T세포이고, 결합은 비공유결합인 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법으로서, T세포 및/또는 CD3에도 결합하는 본 발명의

기술의 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편으로 생체외에서 무장된 T세포의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0017] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 중 임의의 것을 인코딩하는 재조합 핵산 서열을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 재조합 핵산 서열 중 임의의 것을 포함하는 숙주세포 또는 벡터를 제공한다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편과, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물로서, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 동위원소, 염료, 크로마겐(chromagen), 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종(radionuclide), 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제에 선택적으로 결합된 것인 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 동위원소, 염료, 크로마겐, 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종, 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제를 추가로 포함한다.
- [0019] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 본원에 개시된 임의의 약제학적 조성물의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편이 HER2에 특이적으로 결합하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 암은 고형 종양이다. 암의 예에는, 비제한적으로, 유방암, 위암, 골육종, 결합조직형성 소원형세포암, 두경부암의 편평세포 암종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 다형성 교모세포종, 위 결합부 선암종, 위식도 결합부 선암종, 자궁경부암, 타액선암, 연조직 육종, 백혈병, 흑색종, 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 횡문근육종 및 신경모세포종이 포함된다.
- [0020] 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 방법의 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 추가 치료제와 별도로, 순차적으로 또는 동시에 대상에게 투여된다. 추가 치료제의 예에는, 알킬화제, 백금제, 타산(taxane), 빈카제(vinca agent), 항에스트로겐 약물, 아로마타아제 저해제, 난소 억제제, VEGF/VEGFR 저해제, EGF/EGFR 저해제, PARP 저해제, 세포증식 억제 알칼로이드, 세포독성 항생제, 항대사산물, 내분비/호르몬 작용제, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 요법제, T세포, 및 면역 조절/자극 항체(예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-TIM3 항체, 항-4-1BB 항체, 항-CD73 항체, 항-GITR 항체 또는 항-LAG-3 항체) 중 하나 이상이 포함된다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상의 생체내에서 암을 검출하는 방법으로서, (a) 본 발명의 기술의 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량을 대상에게 투여하는 단계로서, 여기서 항체 또는 항원 결합 단편은 HER2를 발현하는 암 세포에 국소화되도록 구성되고, 방사성동위원소로 표지된 것인 단계와, (b) 참조 값보다 높은 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 방출되는 방사능 수준을 검출하는 방식으로 대상에서 종양의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시형태에서, 대상은 암으로 진단되거나 암을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상이다. 암의 예에는, 비제한적으로, 유방암, 위암, 골육종, 결합조직형성 소원형세포암, 두경부암의 편평세포 암종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 다형성 교모세포종, 위 결합부 선암종, 위식도 결합부 선암종, 자궁경부암, 타액선암, 연조직 육종, 백혈병, 흑색종, 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 횡문근육종 및 신경모세포종이 포함된다. 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 방출되는 방사능 수준은 양전자 방출 단층촬영 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영을 사용하여 검출될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 상기 방법은 방사성핵종에 결합된 본 발명의 기술의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 면역결합체의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0022] 본원에 개시된 방법의 임의의 및 모든 실시형태에서, 대상은 인간이다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 HER2 단백질 발현 수준을 검출하는 방법으로서, 생물학적 샘플을 본원에 개시된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계와, 생물학적 샘플에서 HER2 단백질에 대한 결합을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0024] HER2 관련 암의 검출 및/또는 치료를 위한 키트로서, 본 발명의 기술의 적어도 하나의 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편)과, 사용 설명서를 포함하는 키트가 또한 본원에 개시된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 하나 이상의 검출 가능한 표지에 커플링되어 있다. 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 검출 가능한 표지는 방사성 표지, 형광 표지 또는 발색 표지를

포함한다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물에 특이적으로 결합하는 2차 항체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 항체는 방사성 표지, 형광 표지 또는 발색 표지로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 검출 가능한 표지에 커플링되어 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은, 본 발명의 기술의 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물의 V_H CDR1(서열번호 1), V_H CDR2(서열번호 2 또는 서열번호 7), V_H CDR3(서열번호 3 또는 서열번호 8), V_L CDR1(서열번호 4 또는 서열번호 9), V_L CDR2(서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11) 및 V_L CDR3(서열번호 6 또는 서열번호 12)의 아미노산 서열을 보여준다. 모 트라스투주맙 항체의 CDR 영역(서열번호 1 내지 서열번호 6)과 비교한 트라스투주맙 변이체의 CDR 영역 내 돌연 변이에는 밑줄이 그어져 있다.

도 2는, 6가지 본 발명의 기술의 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물의 가변 중쇄 면역글로불린 도메인(V_H)과 가변 경쇄 면역글로불린 도메인(V_L)의 아미노산 서열을 보여준다: ABP100s.10.1 HER2(각각, 서열번호 13과 서열번호 14), ABP100s.10.2 HER2(각각, 서열번호 15와 서열번호 16), ABP100s.10.3 HER2(각각, 서열번호 17과 서열번호 14), ABP100s.10.4 HER2(각각, 서열번호 15와 서열번호 18), ABP100s.10.5 HER2(각각, 서열번호 15와 서열번호 19) 및 ABP100s.10.6 HER2(각각, 서열번호 15와 서열번호 20). V_H CDR 1 내지 3 아미노산 서열과 V_L CDR 1 내지 3 아미노산 서열에는 밑줄이 그어져 있다. 모 트라스투주맙 항체의 CDR 영역(서열번호 1 내지 서열번호 6)과 비교한 트라스투주맙 변이체의 CDR 영역 내 돌연변이에는 이중으로 밑줄이 그어져 있다.

도 3은, 본 발명의 기술의 40가지 예시적인 HER2×CD3 이중특이적 항체의 중쇄(HC) 아미노산 서열과 경쇄(LC) 아미노산 서열을 보여준다. V_H CDR 1 내지 3 아미노산 서열과 V_L CDR 1 내지 3 아미노산 서열에는 밑줄이 그어져 있다. 링커 서열은 이탤릭체로 표시되어 있다. 점 돌연변이와 디설파이드 돌연변이는 볼드체로 표시되어 있고 이중으로 밑줄이 그어져 있다. Fc 치환은 볼드체로 표시되어 있고 밑줄이 그어져 있다.

도 4는, BsAb의 2가지 군에 대한 개요를 보여준다: 첫 번째 군은 HER2와 T세포 공동수용체 CD3을 모두 표적으로 하고, 두 번째 군은 HER2 증폭된 암 세포를 선택적으로 표적으로 하여 사멸시킴.

도 5a와 **도 5b**는, 2천만 개의 huATC 및 피하 인간 IL-2(1000 U)와 함께 정맥내(IV)로 투여되거나(10 pmol, 주 2회)(**도 5a**), BsAb와 인간 IL-2(1000 U)의 생체의 "무장된" T세포(EAT)로 투여된(피하로, 주 2회)(**도 5b**) 다양한 도메인간 간격 형식을 갖는 BsAb를 사용하는 마우스 이종이식편 모델에서 개별 마우스 종양 반응을 보여준다. 각각의 선은 단일 마우스를 나타내고, 파선은 군 평균을 나타낸다. 문헌[Santich *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 12: eaax1315 (2020)](상기 문헌은 본원에 참조로 인용됨) 참조.

도 6은, 활성화된 T세포를 본 발명의 기술의 항-HER2 × CD3 이중특이적 항체로 무장시키는 과정을 요약한 것이다.

도 7a는, CD3+ T세포를 동일한 조건의 웰에서 SP34-hIgG1 또는 이중특이적 항체로 4° C에서 30분 동안 염색하고, 세척하고, 항인간 IgG Fc 특이적 PE 접합체(Jackson 1:200)와 함께 4° C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, BD FACSCelesta로 데이터를 수집한 후, 데이터를 FlowJo와 GraphPad PRISM으로 분석한 것을 보여준다. 특히, 본 실험에 사용된 작제물들은 HER2 결합 아암만 상이하였고, 모두 동일한 CD3 반응성 아암을 가지고 있었다. **도 7b**와 **도 7c**는, HER2 아암의 친화도 저하를 통한 HER2 저발현 표적 세포의 차등적 사멸을 보여준다. 이중특이적 항체의 용량 범위를 이용하여 이펙터:표적(E:T) 비 5:1로 TDCC 검정을 수행하였으며, 여기서 이펙터 세포로는 CD3+ T세포(50k/웰)를 사용하였고, 표적 세포(10k/웰)는 상대적으로 높은 양의 HER2를 발현하거나(**도 7b**, SKBR-3), 상대적으로 낮은 양의 HER2를 발현하는(**도 7c**, MCF-7) 세포를 이용하였다. 세포를 RPMI 1640/10% FBS 중에서 항체와 함께 37° C/5% CO₂에서 28시간 동안 인큐베이션하고, SpectraMax iD3 플레이트 판독기에서 발광을 정량화하였으며, GraphPad PRISM의 데이터 분석에 따르면 본 실험의 작제물들은 HER2 결합 아암만 상이하였고, 모두 동일한 CD3 반응성 아암을 가지고 있었다.

도 8a와 **도 8b**는, 항-HER2 × CD3 모 항체(트라스투주맙 × huOKT3)로 무장된 활성화된 T세포의 특징분석을 보여준다. **도 8a**는, 다양한 농도에서 무장화 후 활성화된 T세포에 대한 트라스투주맙 × huOKT3의 결합을 나타내는 정성적 유세포분석 데이터를 보여준다. **도 8b**는, HER2의 발현 수준이 상이한 세포주의 트라스투주맙 × huOKT3 매개 사멸을 보여준다.

도 9a와 도 9b는, TDCC 검정에 의한 HER2 고발현 표적 세포와 HER2 저발현 표적 세포의 차등적 사멸을 보여준다. 도 9a와 도 9b는, 각각, SK-BR-3 세포와 MCF-7 세포에 대한, 본 발명의 기술의 HER2×CD3 이중특이적 항체(ABP100s.5, ABP100s.5.1, ABP100s.10.2, ABP100s.10.4, ABP100s.10.5, ABP100s.10.6)의 영향을 보여준다.

도 10은, 도 3에 개시된 바와 같은 CD3 표적과 HER2 표적에 대한 본 발명의 기술의 HER2×CD3 이중특이적 항체의 친화도를 보여준다.

도 11은, 본 발명의 기술의 12가지 추가의 예시적인 HER2×CD3 이중특이적 항체의 중쇄(HC) 아미노산 서열과 경쇄(LC) 아미노산 서열을 보여준다. V_H CDR 1 내지 3 아미노산 서열과 V_L CDR 1 내지 3 아미노산 서열은 볼드체로 표시되어 있다. 링커 서열은 이탤릭체로 표시되어 있다.

도 12는, 도 11에 개시된 바와 같은 CD3 표적과 HER2 표적에 대한 본 발명의 기술의 HER2×CD3 이중특이적 항체의 친화도를 보여준다.

도 13a 내지 도 13e는, CD3/TCR NFAT T세포 활성화 리포터 검정의 결과를 보여준다. Her2 고발현(도 13a: SK-BR-3, 도 13b: HCC1954) 및 Her2 저발현(도 13c: MCF-7, 도 13d: HT55) 표적 세포주 존재 하에서, 또는 표적 세포 부재 하에서(도 13e) 인큐베이션한 후, Jurkat CD3/TCR NFAT T세포 활성화 리포터 검정(Promega)을 사용하여 CD3/TCR 복합체의 이중특이적 항체(0.00004 nM 내지 40 nM) 활성화를 평가하였다. 리포터 활성의 발현을 검출하고, 7시간 인큐베이션 후 플롯팅된 상대 발광 단위(RLU: Relative Luminescence Unit)로 정량화하였다.

도 14a 내지 도 14d는, 인간 CD3+ T세포를 이용한 경우 Her2 고발현 표적 세포주와 Her2 저발현 표적 세포주에 대한 T세포 의존성 세포독성(TDCC) 결과를 보여준다. 이중특이적 항체를 CD3+ T세포 및 표적 세포(이펙터:표적 비 5:1)와 함께 37° C에서 40시간 동안 인큐베이션하였다. 민감한 ATP 정량화 방법(Cell Titer Glo 2.0)을 사용하여, Her2 고발현 표적 세포(도 14a: SKBR-3, 도 14b: HCC1954)와 Her2 저발현 세포주(도 14c: MCF-7, 도 14d: HT55)에 대한 세포독성%를 [이펙터 + 표적]만 함유된 웰과 비교하여 정량화하였다.

도 15a 내지 도 15h는, 인간 PBMC를 이용한 경우 Her2 고발현 표적 세포주와 Her2 저발현 표적 세포주에 대한 시험관내 다중 사이토카인 검출 검정 결과를 보여준다. 이중특이적 항체(범위: 30 nM, 0.3 nM, 0.003 nM, 0.00003 nM)를 인간 PBMC 및 표적 세포(이펙터(100,000개 세포):표적(10,000개 세포), E:T 비 10:1)와 함께 37° C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. SKBR-3(Her2 고발현) 표적 세포(도 15a 내지 도 15d)와 MCF-7(Her2 저발현) 표적 세포(도 15e 내지 도 15h)에 대한 사이토카인 방출은 TNF-α(도 15a, 도 15e), IL-6(도 15b, 도 15f), IL-2(도 15c, 도 15g) 및 IFN-γ(도 15d, 도 15h)에 대한 다중 비드 기반 검정에 사용하기 위해 상청액을 1:4로 희석하는 방식으로 정량화하였으며, Luminex xMAP 소프트웨어로 정량화하여 본원에 피코그램/mL로 표시하였다.

도 16a 내지 도 16e는, 활성화된 T세포와 Her2 발현 표적 세포에 결합하는 이중특이적 항체의 유세포분석 결과를 보여준다. 이중특이적 항체를 Her2 고발현(도 16a: SKBR-3, 도 16b: SKOV-3) 또는 Her2 저발현(도 16c: MCF-7, 도 16d: HT55) 표적 세포, 또는 활성화된 T세포(도 16e)와 함께 인큐베이션하였다. 웰당 100,000개 세포를 1차 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 항인간 IgG PE 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. FlowJo 소프트웨어를 이용하여 결과를 단일 생존 세포의 형광 강도 중앙값(MFI: Median Fluorescence Intensity)으로 정량화하였다.

도 17a와 도 17b는, 본 발명의 기술의 항-HER2 × CD3 BsAb의 Fab 형식(인간 IgG1 스캐폴드에 부착됨)에 대한 Biacore(SPR) 친화도 데이터를 보여준다. 본 발명의 기술의 항-HER2 × CD3 BsAb는 인간 및 비인간 영장류(Cyno) HER2 및 CD3 항원과 교차 반응한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 기술의 실질적인 이해를 제공하기 위해 본 발명의 방법의 특정 양태, 방식, 실시형태, 변형 및 특징이 다양한 상세 수준으로 하기에 설명되어 있음을 이해해야 한다.

[0027] 본 개시내용은 일반적으로 HER2 폴리펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)을 제공한다. 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 HER2 관련 암의 검출 또는 치료를 필요로 하는 대상에서 HER2 관련 암을 검출하거나 치료하는 방법에 유용하다. 따라서, 본 발명의 방법의 다양한 양태는 항-HER2 항체의 제조, 특징분석 및 조작에 관한 것이다. 본 발명의 기술의 면역글

로볼린 관련 조성물은 단독으로 또는 암 치료용 추가 치료제와 조합으로 유용하다. 일부 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 단클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체이다.

[0028] 본 발명의 방법을 실시함에 있어서, 분자생물학, 단백질 생화학, 세포생물학, 면역학, 미생물학 및 재조합 DNA에서의 다수의 통상적인 기술이 사용된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition]; 문헌[Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*] 시리즈; 문헌[*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.)] 시리즈; 문헌[MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press)]; 문헌[MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*]; 문헌[Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*]; 문헌[Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition]; 문헌[Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*]; 미국 특허 제4,683,195호; 문헌[Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*]; 문헌[Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*]; 문헌[Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*]; 문헌[Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986))]; 문헌[Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*]; 문헌[Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory)]; 문헌[Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*]; 문헌[Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London)]; 및 문헌[Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*] 참조. 폴리펩타이드 유전자 발현 산물의 수준(즉, 유전자 번역 수준)을 검출하고 측정하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있으며, 항체 검출 및 정량화 기술과 같은 폴리펩타이드 검출 방법을 사용하는 것을 포함한다. (또한, 문헌[Strachan & Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999)] 참조).

[0029] 본 개시내용은, 결합력 상호작용을 이용하여 고밀도의 Her2를 갖는 세포(예컨대, 암성 조직의 세포)에는 선택적으로 결합하여 이를 사멸시키고, Her2 저밀도 세포에는 결합하지 않아 이를 그대로 남겨 두는 친화도가 감소된 HER2 이중특이적 항체를 제공한다. 이론에 구애됨 없이, HER2×CD3 이중특이적 항체의 CD3 친화도를 낮추면 T세포 활성화와 사이토카인 생산을 감소시켜, 임상에서 사이토카인 방출 증후군과 같은 유해사례를 저하시킬 수 있다고 여겨진다.

[0030] **정의**

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 일반적으로 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 기술이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수형태의 표현은, 문맥상 달리 명백하게 지시되지 않는 한, 복수의 언급대상을 포함한다. 예를 들어 "세포"에 대한 언급은 2개 이상의 세포의 조합 등을 포함한다. 일반적으로, 본원에 사용된 명명법, 및 하기 기재되는 세포 배양, 분자유전학, 유기화학, 분석화학, 및 핵산 화학 및 하이브리드화에서의 시험실 절차는 당업계에 널리 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것들이다.

[0032] 숫자와 관련하여 본원에 사용된 "약"이라는 용어는, 일반적으로 달리 명시되거나 문맥상 달리 명백하지 않는 한(해당 숫자가 가능한 값의 0% 미만이거나 100% 초과인 경우 제외), 해당 숫자의 어느 방향에서의(더 크거나 더 작은) 1%, 5% 또는 10% 범위 내에 속하는 숫자들을 포함하는 것으로 간주된다.

[0033] 본원에 사용된 대상에게의 작용제 또는 약물의 "투여"는, 의도된 기능을 수행하기 위해 화합물을 대상에게 도입하거나 전달하는 임의의 경로를 포함한다. 투여는, 비제한적으로, 경구, 비강내, 비경구(정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하), 직장, 경막내, 종양내 또는 국소를 포함하는 임의의 적합한 경로를 통해 수행될 수 있다. 투여는 자가 투여와 다른 이에 의한 투여를 포함한다.

[0034] 본원에 사용된 "항체"라는 용어는, 예로서 및 비제한적으로, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 이들의 조합을 포함하는 면역글로불린 또는 면역글로불린 유사 분자, 및 임의의 척추동물, 예를 들어 인간, 염소, 토끼 및 마우스와 같은 포유류뿐 아니라, 상어 면역글로불린과 같은 비포유류 종에서의 면역반응 동안 생성된 유사한 분자를 총칭한다. 본원에 사용된 "항체"(무손상(intact) 면역글로불린 포함) 및 "항원 결합 단편"은 다른 분자에 대한 결합을 실질적으로 배제하는 정도로 관심 분자(또는 매우 유사한 관심 분자 그룹)에 특이적으로 결합한다(예를 들어, 관심 분자에 대한 결합 상수가, 생물학적 샘플에서 다른 분자에 대한 결합 상수보다 적어도 10^3 M^{-1} 더 크거나, 적어도 10^4 M^{-1} 더 크거나 또는 적어도 10^5 M^{-1} 더 큰 항체 및 항체 단편). "항체"라는 용어는 또한 키메라 항체(예를 들어, 인간화 쥐과 항체)와 이중접합체 항체(예컨대, 이중특이적 항체)와 같은 유전자 조작된 형태를

포함한다. 또한, 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997] 참조.

[0035] 더욱 특히, 항체는 항원의 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 적어도 경쇄 면역글로불린 가변 영역 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드 리간드를 나타낸다. 항체는 중쇄와 경쇄로 구성되며, 중쇄와 경쇄는 각각 가변 중쇄(V_H) 영역과 가변 경쇄(V_L) 영역으로 지칭되는 가변 영역을 갖는다. 함께, V_H 영역과 V_L 영역은 항체가 인식하는 항원을 결합하는 역할을 한다. 전형적으로, 면역글로불린은 디설파이드 결합으로 상호 연결된 중쇄(H)와 경쇄(L)를 갖는다. 경쇄에는 람다(λ) 및 카파(κ)의 두 가지 유형이 존재한다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 5가지 주요 중쇄 부류(또는 아이소타입)가 존재한다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각각의 중쇄와 경쇄는 불변 영역과 가변 영역(이러한 영역은 "도메인"으로도 알려져 있음)을 함유한다. 조합으로, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 항원에 특이적으로 결합한다. 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로도 지칭되는 3개의 초가변 영역이 개재된 "프레임워크" 영역을 함유한다. 프레임워크 영역과 CDR의 범위는 정의되어 있다(문헌[Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991](이는 본원에 참조로 인용됨) 참조). Kabat 데이터베이스는 이제 온라인으로 운영된다. 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종 내에서 상대적으로 보존된다. 구성 경쇄와 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 대체로 β -시트 입체형태를 취하고, CDR은 β -시트 구조를 연결하며, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 프레임워크 영역은 사슬간 비공유결합성 상호작용에 의해 정확한 배향으로 CDR을 배치하는 스캐폴드를 형성하는 작용을 한다.

[0036] CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합을 담당한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단에서 시작하여 순차적으로 번호가 매겨진 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지칭되며, 또한 전형적으로 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 식별된다. 따라서, V_H CDR3은 이것이 발견되는 항체의 중쇄 가변 도메인에 위치하지만, V_L CDR1은 이것이 발견되는 항체의 경쇄 가변 도메인으로부터의 CDR1이다. HER2 단백질에 결합하는 항체는 특정 V_H 영역 서열과 V_L 영역 서열, 따라서 특정 CDR 서열을 가질 것이다. 상이한 특이성(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 결합 부위)를 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다. CDR은 항체마다 다르지만, CDR 내 제한된 수의 아미노산 위치만이 항원 결합에 직접 관여한다. CDR 내 이러한 위치는 특이성 결정 잔기(SDR)로 불린다. 본원에 사용된 "면역글로불린 관련 조성물"은, 항체(단클론 항체, 다클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 다중특이적 항체, 이중특이적 항체 등 포함)뿐 아니라 항체 단편을 나타낸다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항원에 특이적으로 결합한다.

[0037] 본원에 사용된 "항체 관련 폴리펩타이드"라는 용어는, 가변 영역(들) 단독으로, 또는 하기 폴리펩타이드 요소 중 전부 또는 일부와 조합으로 구성될 수 있는 단일 사슬 항체를 포함하는 항원 결합 항체 단편을 의미한다: 항체 분자의 힌지 영역, CH_1 , CH_2 및 CH_3 도메인. 본 발명의 기술에는 가변 영역(들)과, 힌지 영역, CH_1 , CH_2 및 CH_3 도메인의 임의의 조합이 또한 포함된다. 본 발명의 방법에 유용한 항체 관련 분자에는, 예를 들어, 비제한적으로, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 사슬 항체, 디설파이드 결합된 Fv(sdFv), 및 V_L 또는 V_H 도메인을 포함하는 단편이 포함된다. 예에는, 하기가 포함된다: (i) V_L , V_H , C_L 및 CH_1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지를 통해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 도메인과 CH_1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 도메인과 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편(문헌[Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989]); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR). 이와 같이, "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 이의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체 단편 또는 항원 결합 단편의 예에는, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0038] 본원에 사용된 "이중특이적 항체" 또는 "BsAb"는, 별개의 구조를 갖는 2개의 표적, 예를 들어 2개의 상이한 표적 항원, 동일한 표적 항원 상의 2개의 상이한 에피토프, 또는 합텐과 표적 항원 또는 표적 항원 상의 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 다양한 상이한 이중특이적 항체 구조가 당업계에 알려져 있다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체 내 각각의 항원 결합 모이어티는 V_H 영역 및/또는 V_L 영역을 포함하며; 일부 이러한 실시형태에서, V_H 영역 및/또는 V_L 영역은 특정 단클론 항체에서 발견되는 것들이다. 일부 실시형태에서,

이중특이적 항체는 2개의 항원 결합 모이어티를 함유하며, 이러한 항원 결합 모이어티는 각각 상이한 단클론 항체의 V_H 영역 및/또는 V_L 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 2개의 항원 결합 모이어티를 함유하며, 여기서 2개의 항원 결합 모이어티 중 하나는 제1 단클론 항체의 CDR을 함유하는 V_H 영역 및/또는 V_L 영역을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하고, 다른 하나의 항원 결합 모이어티는 제2 단클론 항체의 CDR을 함유하는 V_H 영역 및/또는 V_L 영역을 갖는 항체 단편(예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fd, Fv, dAB, scFv 등)을 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 "항체 의존적 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"라는 용어는, 면역계의 이펙터(effector) 세포가, 막 표면 항원이 항-HER2 항체와 같은 항체에 의해 결합된 종양 세포와 같은 표적세포를 능동적으로 용해시키는 세포 매개 면역 방어 메커니즘을 나타낸다.

[0040] 본원에 사용된 "항원"은, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)가 선택적으로 결합할 수 있는 분자를 나타낸다. 표적 항원은 단백질, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐, 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 폴리펩타이드(예를 들어, HER2 폴리펩타이드)일 수 있다. 항원은 또한 동물에서 면역반응을 생성하기 위해 동물에 투여될 수 있다.

[0041] "항원 결합 단편"이라는 용어는, 항원에의 결합을 담당하는 폴리펩타이드의 일부를 포함하는 전체 면역글로불린 구조의 단편을 나타낸다. 본 발명의 기술에 유용한 항원 결합 단편의 예에는, 비제한적으로, scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab' 및 F(ab')₂가 포함된다. 상기 언급된 임의의 항체 단편은 당업자에게 알려진 통상의 기술을 사용하여 수득되며, 이러한 단편은 무손상 항체에서와 동일한 방식으로 결합 특이성과 중화 활성에 대해 스크리닝된다.

[0042] 본원에 사용된 "결합 친화도"는, 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원 또는 항원성 펩타이드) 사이의 비공유결합성 상호작용의 총합의 강도를 의미한다. 분자 X의 이의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것들을 포함하여 당업계에 알려진 표준 방법에 따라 측정될 수 있다. 저친화도 복합체는 일반적으로 항원으로부터 용이하게 해리되는 경향이 있는 항체를 함유하지만, 고친화도 복합체는 일반적으로 더 긴 기간 동안 항원에 결합된 상태로 유지되는 경향이 있는 항체를 함유한다.

[0043] 본원에 사용된 "생물학적 샘플"이라는 용어는, 살아있는 세포에서 유도된 샘플 물질을 의미한다. 생물학적 샘플은 대상에서 분리된 조직, 세포, 단백질 또는 세포의 막 추출물, 및 생물학적 유체(예를 들어, 복수액 또는 뇌척수액(CSF))뿐 아니라, 대상 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함할 수 있다. 본 발명의 기술의 생물학적 샘플에는, 비제한적으로, 유방 조직, 신장 조직, 자궁 경부, 자궁 내막, 머리 또는 목, 담낭, 이하선(parotid) 조직, 전립선, 뇌, 뇌하수체, 신장 조직, 근육, 식도, 위, 소장, 결장, 간, 비장, 췌장, 갑상선 조직, 심장 조직, 폐 조직, 방광, 지방 조직, 림프절 조직, 자궁, 난소 조직, 부신 조직, 고환 조직, 편도선, 흉선, 혈액, 모발, 볼, 피부, 혈청, 혈장, CSF, 정액, 전립선액, 정액 유체, 소변, 대변, 땀, 타액, 가래, 점액, 골수, 림프 및 눈물에서 취한 샘플이 포함된다. 생물학적 샘플은 내부 기관의 생검 또는 암에서도 얻을 수 있다. 생물학적 샘플은 진단 또는 연구를 위해 대상으로부터 얻을 수 있거나, 대조군 또는 기초 연구를 위해 질환에 걸리지 않은 개체로부터 얻을 수 있다. 샘플은, 예를 들어 정맥 천자 및 수술적 생검을 포함하는 표준 방법을 통해 얻을 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 샘플은 바늘 생검으로 얻은 조직 샘플이다.

[0044] 본원에 사용된 "CDR 이식"이라는 용어는, "수용체" 항체의 적어도 하나의 CDR을 목적하는 항원 특이성을 보유하는 "공여체" 항체의 CDR "이식편"으로 대체하는 것을 의미한다.

[0045] 본원에 사용된 "키메라 항체"라는 용어는, 재조합 DNA 기술을 사용하여, 하나의 종의 단클론 항체의 Fc 불변 영역(예를 들어, 마우스 Fc 불변 영역)이 또 다른 종의 항체의 Fc 불변 영역(예를 들어, 인간 Fc 불변 영역)으로 대체된 항체를 의미한다. 일반적으로, Robinson 등의 PCT/US86/02269; Akira 등의 유럽 특허출원 제184,187호; Taniguchi의 유럽 특허출원 제171,496호; Morrison 등의 유럽 특허출원 제173,494호; Neuberger 등의 WO 86/01533호; Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly 등의 유럽 특허출원 제0125,023호; 문헌[Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043, 1988]; 문헌[Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443, 1987]; 문헌[Liu *et al.*, *J. Immunol* 139: 3521-3526, 1987]; 문헌[Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218, 1987]; 문헌[Nishimura *et al.*, *Cancer Res* 47: 999-1005, 1987]; 문헌[Wood *et al.*, *Nature* 314: 446-449, 1985]; 및 문헌[Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559, 1988] 참조.

- [0046] 본원에 사용된 "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"라는 용어는, 일반적으로 표면 항원에 결합될 때 전형적인 보체 경로를 촉발시켜, 막 공격 복합체의 형성과 표적세포 용해를 유도하는 IgG 항체와 IgM 항체의 이펙터 기능을 나타낸다.
- [0047] 본원에 사용된 "접합된"이라는 용어는, 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 2개의 분자가 회합된 것을 나타낸다. 적합한 회합 유형에는 화학적 결합과 물리적 결합이 포함된다. 화학적 결합에는, 예를 들어 공유결합과 배위결합이 포함된다. 물리적 결합에는, 예를 들어 수소 결합, 쌍극자 상호작용, 반데르발스 힘(van der Waal force), 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용 및 방향족 스택킹(aromatic stacking)이 포함된다.
- [0048] 본원에 사용된 "공통 FR"이라는 용어는, 공통 면역글로불린 서열 내 프레임워크(FR) 항체 영역을 의미한다. 항체의 FR 영역은 항원과 접촉하지 않는다.
- [0049] 본원에 사용된 "대조군"은, 비교를 위해 실험에 사용되는 대안적인 샘플이다. 대조군은 "양성" 또는 "음성"일 수 있다. 예를 들어, 실험의 목적이 특정 유형의 질환 치료를 위한 치료제의 효능에 대한 상관관계를 결정하는 것인 경우, 양성 대조군(목적하는 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 화합물 또는 조성물)과 음성 대조군(요법을 투여받지 않거나 플라시보(placebo)를 투여받은 대상 또는 샘플)이 전형적으로 이용된다.
- [0050] 본원에 사용된 "디아바디"라는 용어는, 동일한 폴리펩타이드 사슬 내 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)(V_H V_L)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타낸다. 동일한 사슬에 있는 2개의 도메인 사이에서 쌍을 이루는 것이 불가능할 정도로 너무 짧은 링커를 사용하는 경우, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적 도메인과 강제로 쌍을 이루게 되어 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0051] 본원에 사용된 "유효량"이라는 용어는, 목적하는 치료 및/또는 예방 효과를 달성하기에 충분한 양, 예를 들어 본원에 기재된 질환 또는 병태, 또는 본원에 기재된 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 징후 또는 증상의 예방 또는 감소를 유도하는 양을 나타낸다. 치료적 또는 예방적 적용의 맥락에서, 대상에게 투여되는 조성물의 양은 조성물, 질환의 정도, 유형 및 중증도, 및 일반 건강, 연령, 성별, 체중 및 약물에 대한 내성과 같은 개체의 특징에 따라 달라질 것이다. 당업자는 이러한 및 다른 인자에 따라 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 조성물은 또한 하나 이상의 추가 치료용 화합물과 조합으로 투여될 수 있다. 본원에 기재된 방법에서, 치료용 조성물은 본원에 기재된 질환 또는 병태의 하나 이상의 징후 또는 증상을 갖는 대상에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 조성물의 "치료적 유효량"은, 질환 또는 병태의 생리학적 영향이 개선되거나 제거되는 조성물을 수준을 나타낸다. 치료적 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 "이펙터 세포"라는 용어는, 면역반응의 인지 및 활성화 단계가 아니라, 면역반응의 작용 단계(effector phase)에 관여하는 면역세포를 의미한다. 예시적인 면역세포에는, 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구(예를 들어, B세포 및 T세포(세포용해성 T세포(CTL) 포함)), 살해세포, 자연살해세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 호중구, 다형핵세포, 과립구, 비만세포 및 호염기구가 포함된다. 이펙터 세포는 특정 Fc 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 이펙터 세포는 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있으며, 예를 들어 ADCC를 유도할 수 있는 호중구이다. 예를 들어, Fc α R을 발현하는 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구 및 림프구는 표적세포를 특이적으로 사멸시키고 면역계의 다른 구성요소에 항원을 제시하거나, 또는 항원을 제시하는 세포에 결합하는 데 관여한다.
- [0053] 본원에 사용된 "에피토프"라는 용어는, 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 통상적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹으로 이루어지며, 통상적으로 특정한 3차원 구조 특징뿐 아니라 특정한 전하 특징을 갖는다. 입체형태 에피토프와 비입체형태 에피토프는, 변성 용매의 존재 하에서 비입체형태 에피토프에 대한 결합이 아닌 입체형태 에피토프에 대한 결합이 손실된다는 점에서 구별된다. 일부 실시형태에서, HER2 단백질의 "에피토프"는 본 발명의 기술의 항-HER2 항체가 특이적으로 결합하는 단백질의 영역이다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 입체형태 에피토프 또는 비입체형태 에피토프이다. 에피토프에 결합하는 항-HER2 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌[Antibodies, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차 차단 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정은, 항-HER2 항체가 본 발명의 기술의 항-HER2 항체와 동일한 부위 또는 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 에피토프 맵핑은 당업계에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 항체 서열은 접촉 잔기를 식별하기 위해 알라닌 스캐

닝과 같은 방법으로 돌연변이화될 수 있다. 상이한 방법에서, HER2 단백질의 상이한 영역에 해당하는 펩타이드는 시험 항체, 또는 시험 항체와 특징분석된 또는 알려진 에피토프를 갖는 항체를 이용한 경쟁 검정에 사용될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 "발현"은, 하기 중 하나 이상을 포함한다: 전구체 mRNA로의 유전자의 전사; 성숙 mRNA를 생산하기 위한 전구체 mRNA의 스플라이싱 및 다른 프로세싱; mRNA 안정성; 성숙 mRNA의 단백질로의 번역(코돈 사용과 tRNA 이용 가능성 포함); 및 적절한 발현과 기능이 요구되는 경우, 번역 산물의 글리코실화 및/또는 다른 변형.

[0055] 본원에 사용된 "유전자"라는 용어는, 발현을 제어하는 프로모터, 엑손, 인트론 및 다른 미번역 영역을 포함하여, RNA 산물의 조절된 생합성에 대한 모든 정보를 함유하는 DNA의 분절을 의미한다.

[0056] 본원에 사용된 "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개의 펩타이드 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 나타낸다. 상동성은 비교를 위해 정렬될 수 있는 각각의 서열 내 위치를 비교하는 방식으로 결정될 수 있다. 비교되는 서열 내 위치가 동일한 염기 또는 아미노산으로 점유되는 경우, 분자는 해당 위치에서 상동이다. 서열 사이의 상동성 정도는 서열을 공유하는 매칭 또는 상동 위치의 수의 함수이다. 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 영역(또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 영역)이 또 다른 서열에 대해 특정 백분율(예를 들어, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)의 "서열 동일성"을 갖는다는 것은, 정렬될 때, 2개의 서열 비교 시 해당 백분율의 염기(또는 아미노산)가 동일하다는 것을 의미한다. 이러한 정렬, 및 상동성 또는 서열 동일성은 당업계에 알려진 소프트웨어를 사용하여 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 정렬을 위해 디폴트 매개변수가 사용된다. 하나의 정렬 프로그램은 디폴트 매개변수를 사용하는 BLAST이다. 특히, 프로그램에는 하기 디폴트 매개변수를 사용하는 BLASTN 및 BLASTP가 있다: 유전자 코드=표준; 필터=없음; 가닥=양쪽 가닥; 컷오프=60; 기대치=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 서열; 분류=높은 점수(HIGH SCORE); 데이터베이스=비중복, GenBank+EMBL+DBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. 이러한 프로그램에 대한 세부사항은 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 확인할 수 있다. 생물학적으로 동등한 폴리뉴클레오타이드는 특정 상동성%를 갖고, 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 것들이다. 2개의 서열이 서로 40% 미만의 동일성 또는 25% 미만의 동일성을 공유하는 경우, 이들은 "관련 없는" 또는 "비상동"인 것으로 간주된다.

[0057] 본원에 사용된 비인간(예를 들어, 쥐과) 항체의 "인간화" 형태는, 비인간 면역글로불린에서 유도된 최소의 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용체의 추가변 영역 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종(공여체 항체) 유래의 추가변 영역 잔기로 대체된 인간 면역글로불린이다. 일부 실시형태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 나아가, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화도와 같은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 Fv)을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비인간 면역글로불린의 것에 해당하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 공통 FR 서열의 것이지만, FR 영역은 결합 친화도를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. FR 내 이러한 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H 사슬에 6개 이하이고, L 사슬에 3개 이하이다. 인간화 항체는 선택적으로 또한 전형적으로 인간 면역글로불린의, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 추가의 세부사항은 하기를 참조한다: 문헌[Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986)]; 문헌[Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 문헌[Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]. 예를 들어, 문헌[Ahmed & Cheung, *FEBS Letters* 588(2):288-297 (2014)] 참조.

[0058] 본원에 사용된 "추가변 영역"이라는 용어는, 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 추가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"의 아미노산 잔기(예를 들어, V_L에서 대략 24번 내지 34번 잔기(L1), 50번 내지 56번 잔기(L2) 및 89번 내지 97번 잔기(L3)와, V_H에서 대략 31번 내지 35B번 잔기(H1), 50번 내지 65번 잔기(H2) 및 95번 내지 102번 잔기(H3)(문헌[Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)])) 및/또는 "추가변 루프"의 아미노산 잔기(예를 들어, V_L에서 잔기 26번 내지 32번 잔기(L1), 50번 내지 52번 잔기(L2) 및 91번 내지 96번 잔기(L3)와, V_H에서 26번 내지 32번 잔기(H1), 52A번 내지 55번 잔기(H2) 및 96번 내지 101번 잔기(H3)(문헌[Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]))를 포함한다.

- [0059] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서 본원에 사용된 "동일한" 또는 "동일성" %라는 용어는, 하기 기재되는 디폴트 매개변수를 이용한 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용하거나, 수동 정렬 및 육안 검사(예를 들어, NCBI 웹사이트)를 통해 측정 시, 비교 범위 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 대응에 대해 비교되고 정렬될 때, 동일하거나, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 특정 백분율(즉, 특정 영역(예를 들어, 본원에 기재된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열)에 걸쳐 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 동일성)을 갖는 2개의 이상의 서열 또는 하위서열을 나타낸다. 따라서, 이러한 서열은 "실질적으로 동일한" 것이라고 한다. 이러한 용어는 또한 시험 서열의 상보서열을 나타내거나, 이에 적용될 수 있다. 이러한 용어는 또한 결실 및/또는 부가를 갖는 서열뿐 아니라, 치환을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 동일성은 적어도 약 25개 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이, 또는 50개 내지 100개 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이의 영역에 걸쳐 존재한다.
- [0060] 본원에 사용된 "무손상 항체" 또는 "무손상 면역글로불린"이라는 용어는, 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 폴리펩타이드와 2개의 경쇄(L) 폴리펩타이드를 갖는 항체를 의미한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H 로 약칭됨)과 중쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 CH_1 , CH_2 및 CH_3 로 구성되어 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L 로 약칭됨)과 경쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L 로 구성되어 있다. V_H 영역과 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 더 보존되는 영역 사이에 배치된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 추가적인 가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 와 V_L 은, 하기 순서로 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 배열된, 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되어 있다: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄. 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포)와 전형적인 보체 시스템의 제1 구성요소(C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [0061] 본원에 사용된 "링커"라는 용어는, 2개 이상의 폴리펩타이드 또는 핵산을 공유결합으로 부착시켜 이들을 서로 상호 연결하는 관능기(예를 들어, 화학물질 또는 폴리펩타이드)를 나타낸다. 본원에 사용된 "펩타이드 링커"는, 2개의 단백질을 함께 커플링시키는 데(예를 들어, V_H 도메인과 V_L 도메인을 커플링시키는 데) 사용되는 하나 이상의 아미노산을 나타낸다. 특정 실시형태에서, 링커는 (GGGGG)_n(여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상임)의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 링커는 GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 73) 또는 GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 74)의 서열을 갖는 아미노산을 포함한다.
- [0062] 본원에 사용된 "단클론 항체"라는 용어는, 실질적으로 균질한 항체 집단에서 얻은 항체를 나타내며, 즉, 이러한 집단을 구성하는 개별 항체들은, 미미한 양으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 예를 들어, 단클론 항체는, 이것이 생산되는 방법이 아닌, 임의의 진핵생물, 원핵생물 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론에서 유도된 항체일 수 있다. 단클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 단클론 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 나아가, 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상적인(다클론) 항체와 대조적으로, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 수식어 "단클론"은 실질적으로 균질한 항체 집단에서 얻어지는 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 단클론 항체는, 예를 들어, 비제한적으로, 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기술을 포함하는 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 사용되는 단클론 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 따라 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 따라 제조될 수 있다. "단클론 항체"는 또한, 예를 들어 문헌[Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는, 변형되지 않거나 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 RNA 또는 DNA를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드에는, 비제한적으로, 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA, 및 단일 가닥, 또는 보다 전형적으로 이중 가닥, 또는 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합

물일 수 있는 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자가 포함된다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA와 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중 가닥 영역을 나타낸다. 폴리뉴클레오타이드라는 용어는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA와, 안정성 또는 다른 이유로 변형된 백본을 갖는 DNA 또는 RNA를 포함한다.

[0064] 본원에 사용된 "약제학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는, 약제학적 투여에 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균 화합물, 등장성 및 흡수 지연 화합물 등을 포함하는 것으로 의도된다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 이의 제형은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)]에 기재되어 있다.

[0065] 본원에 사용된 "다클론 항체"라는 용어는, 적어도 2개의 상이한 항체 생산 세포주에서 유도된 항체의 제제를 의미한다. 이러한 용어의 사용은 항원의 상이한 에피토프 또는 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 함유하는 적어도 2개의 항체의 제제를 포함한다.

[0066] 본원에 사용된 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"이라는 용어는, 펩타이드 결합 또는 변형된 펩타이드 결합, 즉, 펩타이드 동배체(isostere)에 의해 서로 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 중합체를 의미하는 것으로 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 폴리펩타이드는 통상적으로 펩타이드, 글리코펩타이드 또는 올리고머로 지칭되는 짧은 사슬과, 일반적으로 단백질로 지칭되는 더 긴 사슬을 모두 나타낸다. 폴리펩타이드는 20개의 유전자 인코딩된 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩타이드는 번역 후 처리와 같은 자연적인 과정, 또는 당업계에 널리 알려진 화학적 변형 기술에 따라 변형된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 변형은 기본 교과서 및 보다 상세한 연구 논문뿐 아니라, 방대한 연구 문헌에 널리 기재되어 있다.

[0067] 본원에 사용된 "재조합"이라는 용어는, 예를 들어 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때, 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입, 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변형에 의해 변형되었거나, 물질이 그렇게 변형된 세포에서 유도되었음을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 재조합 세포는 세포의 천연(비재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 달리 비정상적으로 발현되거나, 과소 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.

[0068] 본원에 사용된 "별도의" 치료적 사용이라는 용어는, 상이한 경로로 동시에 또는 실질적으로 동시에 적어도 2개의 활성 성분을 투여하는 것을 나타낸다.

[0069] 본원에 사용된 "순차적" 치료적 사용이라는 용어는, 동일하거나 상이한 투여 경로로 상이한 시간에 적어도 2개의 활성 성분을 투여하는 것을 나타낸다. 더욱 특히, 순차적 사용은 다른 것 또는 다른 것들의 투여가 시작되기 전 활성 성분 중 하나를 전부 투여하는 것을 나타낸다. 따라서, 다른 활성 성분 또는 성분들을 투여하기 전 몇 분, 몇 시간 또는 며칠에 걸쳐 활성 성분 중 하나를 투여할 수 있다. 이러한 경우 동시 치료는 없다.

[0070] 본원에 사용된 "동시" 치료적 사용이라는 용어는, 동일한 경로로 동시에 또는 실질적으로 동시에 적어도 2개의 활성 성분을 투여하는 것을 나타낸다.

[0071] 본원에 사용된 "단일 사슬 항체" 또는 "단일 사슬 Fv(scFv)"라는 용어는, Fv 단편의 2개의 도메인, V_L과 V_H의 항체 융합 분자를 나타낸다. 단일 사슬 항체 분자는 다수의 개별 분자를 갖는 중합체, 예를 들어 이량체, 삼량체 또는 다른 중합체를 포함할 수 있다. 나아가, Fv 단편의 2개의 도메인인 V_L과 V_H는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, V_L 영역과 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단일 사슬 Fv(scFv))로 알려져 있음)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어 질 수 있게 하는 합성 링커에 연결될 수 있다. 문헌[Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426] 및 문헌[Huston *et al.* (1988) *Proc Natl Acad Sci* 85:5879-5883]. 이러한 단일 사슬 항체는 재조합 기술, 또는 무손상 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다.

[0072] 본원에 사용되는 "특이적으로 결합한다"는, 또 다른 분자(예를 들어, 항원)를 인식하고 이에 결합하지만, 실질적으로 다른 분자를 인식하고 이에 결합하지 않는 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)를 나타낸다. 본원에 사용된 특정 분자(예를 들어, 폴리펩타이드, 또는 폴리펩타이드 상의 에피토프)에 "특이적 결합", "~에 특이적으로 결합한다" 또는 "~에 대해 특이적인"이라는 용어는, 예를 들어 이것이 결합하는 분자에 대한 K_D가 약 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M 또는 10⁻¹² M인 분자에 의해 나타날 수 있다. "특이적으로 결합한다"라는 용어는 또한, 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)가 임의의

다른 폴리펩타이드, 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서, 특정 폴리펩타이드(예를 들어, HER2 폴리펩타이드), 또는 특정 폴리펩타이드 상의 에피토프에 결합하는 결합을 나타낼 수 있다.

- [0073] 본원에 사용된 "대상", "환자" 또는 "개체"라는 용어는, 개별 유기체, 척추동물, 포유류 또는 인간일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상, 환자 또는 개체는 인간이다.
- [0074] 본원에 사용된 "치료제"라는 용어는, 유효량으로 존재할 때, 이를 필요로 하는 대상에서 목적하는 치료 효과를 생성하는 화합물을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0075] 본원에 사용된 "치료하는" 또는 "치료"는 인간과 같은 대상에서의 본원에 기재된 질환 또는 장애의 치료를 포함하며, 이에에는 하기가 포함된다: (i) 질환 또는 장애를 저해하는 것, 즉, 이의 발달을 저지하는 것; (ii) 질환 또는 장애를 완화시키는 것, 즉, 장애의 퇴행을 유발하는 것; (iii) 장애의 진행을 느리게 하는 것; 및/또는 (iv) 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 진행을 저해하거나, 완화시키거나 또는 느리게 하는 것. 일부 실시형태에서, 치료는 질환과 관련된 증상이, 예를 들어 경감되거나, 감소되거나, 치유되거나 또는 관해 상태에 있음을 의미한다.
- [0076] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 장애의 다양한 치료 방식은 전체적인 치료뿐 아니라 전체보다 적은 치료도 포함하며, 일부 생물학적으로 또는 의학적으로 관련된 결과가 달성되는 "실질적인" 치료를 의미하는 것으로 의도된다는 것을 이해해야 한다. 치료는 만성 질환에 대한 지속적인 연장 치료, 또는 급성 병태의 치료를 위한 단회 또는 다회 투여일 수 있다.
- [0077] 본원에 기재된 항-HER2 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 이러한 변형은 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키기 위해, 예를 들어 인코딩된 아미노산을 글리코실화시키거나, Fc 수용체인 C1q에 결합하는 항체의 능력을 파괴하거나, 또는 보체 시스템을 활성화시키기 위해 수행될 수 있다. 항-HER2 항체의 아미노산 서열 변이체는 펩타이드 합성 또는 화학적 변형을 통해 적합한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산에 도입하는 방식으로 제조된다. 이러한 변형에는, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 이러한 잔기에의 삽입 및/또는 이러한 잔기의 치환이 포함된다. 수득된 항체가 목적하는 특성을 보유하는 한, 관심 항체를 수득하기 위한 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어진다. 변형은 또한 단백질의 글리코실화 패턴을 변화시키는 것을 포함한다. 치환 돌연변이유발에 가장 관심이 있는 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경도 고려된다.
- [0078] 보존적 아미노산 치환은 소정의 아미노산을 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 전하, 소수성 및 크기)를 갖는 상이한 아미노산으로 변경하는 아미노산 치환이다. "보존적 치환"은 하기 표에 제시되어 있다.

표 1. 아미노산 치환		
원래 잔기	예시적인 치환	보존적 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0079]

[0080]

하나의 유형의 치환 변이체는 모 항체의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방식은 파지 디스플레이를 사용하는 친화도 성숙을 포함한다. 구체적으로, 여러 추가 변 영역 부위(예를 들어, 6개 내지 7개 부위)가 돌연변이되어 각 부위에서 가능한 모든 아미노산 치환을 생성한다. 이와 같이 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 산물에 대한 융합체로서 사상 파지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 이어서, 파지 디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같은 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 추가변 영역 부위 후보를 식별하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 추가변 영역 잔기를 식별할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 식별하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기와 인접 잔기는 본원에 설명된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 이러한 변이체가 생성되면, 변이체 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝에 적용하고, 추가 개발을 위해 하나 이상의 관련 검정에서 유사하거나 우수한 특성을 갖는 항체를 선별할 수 있다.

[0081]

HER2

[0082]

HER2(GenBank: NP 004439.2(서열번호 84))는 표피 성장인자 수용체 패밀리의 수용체 티로신 키나아제이다. 암의 발달 및 진행에서 HER2의 증폭 또는 과발현이 입증되었다. Herceptin®(트라스투주맙)은 HER2 양성 전이성 유방

암과 HER2 양성 위암 치료용으로 승인된 항-HER2 단클론 항체이다(Trastuzumab [Highlights of Prescribing Information]. South San Francisco, CA: Genentech, Inc.; 2014). 에르투막소맵(ertumaxomab)은 Fc 수용체 결합이 손상되지 않은 삼중특이적 HER2-CD3 항체이다(예를 들어, 문헌[Kiewe *et al.* 2006, *Clin Cancer Res*, 12(10): 3085-3091] 참조). 에르투막소맵은 래트-마우스 항체이기 때문에, 인간에게의 투여 시, 인간 항마우스 항체 반응과 인간 항래트 항체 반응이 예상된다. 에르투막소맵의 모 항체인 2502A는 HER2에 대한 친화도가 낮고 결합력이 낮다(문헌[Diermeier-Daucher *et al.*, *MAbs*, 2012, 4(5): 614-622]).

[0083]

본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물

[0084]

본 발명의 기술은 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편)의 생성 및 사용을 위한 방법 및 조성물을 설명한다. 본 발명의 기술의 항체와 항원 결합 단편은 HER2 폴리펩타이드에 선택적으로 결합한다. 본 개시내용의 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물은 HER2 관련 암의 진단 또는 치료에 유용할 수 있다. 본 발명의 기술의 범위 내에 있는 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물에는, 예를 들어, 비제한적으로, 표적 폴리펩타이드, 이의 상동체, 유도체 또는 단편에 특이적으로 결합하는 단클론, 키메라, 인간화, 이중특이적 항체 및 디아바디가 포함된다. 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 임의의 항-HER2 항체의 항원 결합 단편으로서, Fab, F(ab)'₂, Fab', scF_v 및 F_v로 이루어지는 군에서 선택되는 항원 결합 단편을 제공한다. 본 발명의 기술의 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물의 아미노산 서열은 도 1 내지 도 3에 기재되어 있다.

영역	서열 단편
CDR-H1	GFNIKDTYIH(서열번호 1)
CDR-H2	RIYPTNGYTRYADSVKG(서열번호 2) RGYPTNGYTRYADSVKG(서열번호 7)
CDR-H3	WGGDGFYAMDY(서열번호 3) WGDDGFYAMDY(서열번호 8)
CDR-L1	RASQDVNTAVA(서열번호 4) RASQDVPTAVA(서열번호 9)
CDR-L2	SASFLYS(서열번호 5) SASDLYS(서열번호 10) DASFLYS(서열번호 11)
CDR-L3	QQHYTTPPT(서열번호 6) QQHYTAPPT(서열번호 12):

[0085]

[0086]

하나의 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 (a) (i) V_H은 서열번호 1의 V_H-CDR1 서열, 서열번호 2 또는 서열번호 7의 V_H-CDR2 서열, 및 서열번호 8의 V_H-CDR3 서열을 포함하거나; (ii) V_H은 서열번호 1의 V_H-CDR1 서열, 서열번호 7의 V_H-CDR2 서열, 및 서열번호 3 또는 서열번호 8의 V_H-CDR3 서열을 포함하고/하거나; (b) (i) V_L은 서열번호 9의 V_L-CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L-CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L-CDR3 서열을 포함하거나; (ii) V_L은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L-CDR1 서열, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L-CDR2 서열, 및 서열번호 6 또는 서열번호 12의 V_L-CDR3 서열을 포함하거나; 또는 (iii) V_L은 서열번호 4 또는 서열번호 9의 V_L-CDR1 서열, 서열번호 5, 서열번호 10 또는 서열번호 11의 V_L-CDR2 서열, 및 서열번호 12의 V_L-CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0087]

하나의 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_H)과 경쇄 면역글로불린 가변 도메인(V_L)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 (a) V_H은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고/하거나; (b) V_L은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 각각, 서열번호 13과 서열번호 14, 서열번호 15와 서열번호 16, 서열번호 17과 서열번호 14, 서열번호 15와 서열번호 18, 서열번호 15와 서열번호

19, 및 서열번호 15와 서열번호 20으로 이루어지는 군에서 선택되는 V_H 과 V_L 을 포함한다.

- [0088] 상기 실시형태 중 임의의 것에서, 항체는 임의의 아이소타입, 예를 들어, 비제한적으로, IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함), IgA(IgA₁ 및 IgA₂ 포함), IgD, IgE 또는 IgM, 및 IgY의 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 불변 영역 서열의 비제한적인 예에는, 하기가 포함된다:
- [0089] 인간 IgD 불변 영역, Uniprot: P01880(서열번호 75)
- [0090] APTKAPDVFPIISGRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE
SPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW
EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILL
MWLEDQREVNTSGFAPARPPQPQGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDHGPMK
- [0091] 인간 IgG1 불변 영역, Uniprot: P01857(서열번호 76)
- [0092] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNV
SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0093] 인간 IgG2 불변 영역, Uniprot: P01859(서열번호 77)
- [0094] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKERC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0095] 인간 IgG3 불변 영역, Uniprot: P01860(서열번호 78)
- [0096] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKT
PLGDTHTTCPRCEPKSCDTPPCPRCEPKSCDTPPCPRCEPKSCDTPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNIFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK
- [0097] 인간 IgM 불변 영역, Uniprot: P01871(서열번호 79)
- [0098] GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGKYAATSQVLLPSKDVMTQGTDEHVVCVKVQHPNGNKEKNVP
LPVIAELPPKVSFVFPDRDFFGNPRKSKLICQATGFSRPIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGL
TFQQNASSMCPVDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLCLVDTLTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSGERFTCTVT
HTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRASATITCLVTGFSADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTG
ETYTCAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
- [0099] 인간 IgG4 불변 영역, Uniprot: P01861(서열번호 80)
- [0100] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
- [0101] 인간 IgA1 불변 영역, Uniprot: P01876(서열번호 81)
- [0102] ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP
VPSTPPTSPSTPPTSPSCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLGCGYSVSSVLPGAEPWNHGTFTC
TAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWK
KGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTI DRLAGKPTHVNVSVMAEVDGTCY
- [0103] 인간 IgA2 불변 영역, Uniprot: P01877(서열번호 82)
- [0104] ASPTSPKVFPLSLDSTPDQDGNVVACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQNVARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP
VPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLGCGYSVSSVLPGAQFPWNHGETFTCTAAHPKLTPLTA

NITKSGNTFRPEVHLLPPPEELALNELVTLTCLARGFSPKDLVRLQGSQELPREKYLTVASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEA
LPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

- [0105] 인간 Ig 카파 불변 영역, Uniprot: P01834(서열번호 83)
- [0106] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC
- [0107] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 서열번호 75 내지 서열번호 82과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 중쇄 불변 영역을 포함한다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 서열번호 83과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0108] 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 HER2 폴리펩타이드의 세포외 영역에 결합한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 입체형태 에피토프 또는 비입체형태 에피토프이다.
- [0109] 일부 실시형태에서, 중쇄(HC) 면역글로불린 가변 도메인 서열과 경쇄(LC) 면역글로불린 가변 도메인 서열은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 구성요소이다. 다른 실시형태에서, HC 면역글로불린 가변 도메인 서열과 LC 면역글로불린 가변 도메인 서열은 상이한 폴리펩타이드 사슬의 구성요소이다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다.
- [0110] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 적어도 하나의 HER2 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 약 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 10^{-12} M의 해리 상수(K_D)로 적어도 하나의 HER2 폴리펩타이드에 결합한다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중 특이적 항체 또는 다중특이적 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 항체 프레임워크 영역을 포함한다.
- [0111] 특정 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 N297A, K322A, L234A 및 L235A로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 불변 영역을 함유한다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 S228P 돌연변이를 포함하는 IgG4 불변 영역을 함유한다.
- [0112] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 제3 폴리펩타이드 사슬 및 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체로서, 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬과 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있고, 제3 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 서로 공유결합으로 결합되어 있으며, 여기서 (a) 제1 폴리펩타이드 사슬과 제4 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) 제1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인; (ii) 제1 면역글로불린의 경쇄 불변 도메인; (iii) 아미노산 서열 (GGGGS)₃을 포함하는 가요성(flexible) 펩타이드 링커; 및 (iv) 제2 면역글로불린의 상보적 중쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인, 또는 제2 면역글로불린의 상보적 경쇄 가변 도메인에 연결된 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인은 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있으며, 아미노산 서열 (GGGGS)₆을 포함하는 가요성 펩타이드 링커를 통해 함께 연결되어 단일 사슬 가변 단편을 형성하고; (b) 제2 폴리펩타이드 사슬과 제3 폴리펩타이드 사슬은 각각, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) 제1 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인과, (ii) 제1 면역글로불린의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 여기서 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인은 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17 중 어느 하나를 포함하고/하거나, 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 또는 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인은 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 19 또는 서열번호 20 중 어느 하나를 포함하는 항체를 제공한다.
- [0113] 하나의 양태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은, 각각, 서열번호 21과 서열번호 22, 서열번호 21과 서열번호 23, 서열번호 21과 서열번호 24, 서열번호 21과 서열번호 25, 서열번호 21과 서열번호 26, 서열번호 21과 서열번호 27, 서열번호 21과 서열번호 28, 서열번호 21과 서열번호 29, 서열번호 21과 서열번호 30, 서열번호 21과 서열번호 31, 서열번호 21과 서열번호 32, 서열번호 21과 서열번호 33, 서열번호 34와 서열번호 33, 서열번호 21과 서열번호 35, 서열번호 36과 서열번호 33, 서열번호 21과 서열번호 37, 서열번호 21과 서열

번호 38, 서열번호 21과 서열번호 39, 서열번호 21과 서열번호 40, 서열번호 21과 서열번호 41, 서열번호 21과 서열번호 42, 서열번호 21과 서열번호 43, 서열번호 21과 서열번호 44, 서열번호 21과 서열번호 45, 서열번호 21과 서열번호 46, 서열번호 21과 서열번호 47, 서열번호 21과 서열번호 48, 서열번호 21과 서열번호 49, 서열번호 21과 서열번호 50, 서열번호 21과 서열번호 51, 서열번호 21과 서열번호 52, 서열번호 21과 서열번호 53, 서열번호 21과 서열번호 54, 서열번호 21과 서열번호 55, 서열번호 21과 서열번호 56, 서열번호 21과 서열번호 57, 서열번호 21과 서열번호 58, 서열번호 21과 서열번호 59, 서열번호 21과 서열번호 60, 서열번호 21과 서열번호 61, 서열번호 21과 서열번호 62, 서열번호 21과 서열번호 63, 서열번호 21과 서열번호 64, 서열번호 21과 서열번호 65, 서열번호 21과 서열번호 66, 서열번호 21과 서열번호 67, 서열번호 21과 서열번호 68, 서열번호 21과 서열번호 69, 서열번호 21과 서열번호 70, 서열번호 21과 서열번호 71, 서열번호 21과 서열번호 72, 및 서열번호 21과 서열번호 85로 이루어지는 군에서 선택되는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함한다.

[0114] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물은 신속한 결합 및 세포 흡수, 및/또는 느린 방출을 용이하게 하는 구조적 변형을 함유한다. 일부 양태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항체)은 신속한 결합 및 세포 흡수, 및/또는 느린 방출을 용이하게 하기 위해 CH2 불변 중쇄 영역에 결실을 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 신속한 결합 및 세포 흡수, 및/또는 느린 방출을 용이하게 하기 위해 Fab 단편이 사용된다. 일부 양태에서, 신속한 결합 및 세포 흡수, 및/또는 느린 방출을 용이하게 하기 위해 F(ab)'₂ 단편이 사용된다.

[0115] 하나의 양태에서, 본 발명의 기술은 본원에 기재된 임의의 면역글로불린 관련 조성물을 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 본원에 기재된 임의의 항체를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 또한 본원에 개시된다.

[0116] 또 다른 양태에서, 본 발명의 기술은 본원에 기재된 임의의 면역글로불린 관련 조성물을 인코딩하는 임의의 핵산 서열을 발현하는 숙주세포를 제공한다.

[0117] 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항-HER2 항체)은 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 또는 그 이상의 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 하나 이상의 HER2 폴리펩타이드의 상이한 에피토프뿐만 아니라, 이중 폴리펩타이드 또는 고체 지지체 물질과 같은 이중 조성물에 대해 특이적일 수 있다. 예를 들어, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; 문헌[Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991)]; 미국 특허 제5,573,920호, 제4,474,893호, 제5,601,819호, 제4,714,681호, 제4,925,648호; 제6,106,835호; 문헌[Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992)] 참조. 일부 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 키메라이다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 관련 조성물은 인간화된 것이다.

[0118] 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 추가로 N- 또는 C-말단에서 이중 폴리펩타이드에 재조합적으로 융합되거나, 폴리펩타이드 또는 다른 조성물에 화학적으로 접합될 수 있다(공유결합성 및 비공유결합성 접합 포함). 예를 들어, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 검출 검정에서 표지로서 유용한 분자, 및 이중 폴리펩타이드, 약물 또는 독소와 같은 이펙터 분자에 재조합적으로 융합되거나 접합될 수 있다. 예를 들어, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 제5,314,995호; 및 EP 0 396 387 참조.

[0119] 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물의 상기 실시형태 중 임의의 것에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 동위원소, 염료, 크로마젠, 조영제, 약물, 독소, 사이토카인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종, 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제에 선택적으로 접합될 수 있다. 화학적 결합 또는 물리적 결합의 경우, 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기는 전형적으로 작용제 상의 관능기와 회합된다. 대안적으로, 작용제 상의 관능기는 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기와 회합된다.

[0120] 작용제 상의 관능기와 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기는 직접 회합될 수 있다. 예를 들어, 작용제 상의 관능기(예를 들어, 설피히드릴기)는 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기(예를 들어, 설피히드릴기)와 회합되어 디설피아이드를 형성할 수 있다. 대안적으로, 관능기들은 가교제(즉, 링커)를 통해 회합될 수 있다. 가교제의 일부 예가 하기에 기재되어 있다. 가교제는 작용제 또는 면역글로불린 관련 조성물 중 어느 하나에 부착될 수 있다. 접합체 내 작용제 또는 면역글로불린 관련 조성물의 수는 또한 다른 하나에 존재하는 관능기의 수에 의해 제한된다. 예를 들어, 접합체와 회합되는 작용제의 최대 수는 면역글로불린 관련 조성물 상에 존재하는 관능기의 수에 따라 달라진다. 대안적으로, 작용제와 회합되는 면역글로불린 관련 조성물의 최대 수는 작용제 상에 존재하는 관능기의 수에 따라 달라진다.

[0121] 또 다른 실시형태에서, 접합체는 하나의 작용제에 회합된 하나의 면역글로불린 관련 조성물을 포함한다. 하나의

실시형태에서, 접합체는 적어도 하나의 면역글로불린 관련 조성물에 화학적으로 결합된(예를 들어, 접합된) 적어도 하나의 작용제를 포함한다. 작용제는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 면역글로불린 관련 조성물에 화학적으로 결합될 수 있다. 예를 들어, 작용제 상의 관능기는 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기에 직접 부착될 수 있다. 적합한 관능기의 일부 예에는, 예를 들어 아미노, 카르복실, 설프히드릴, 말레이미드, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트 및 히드록실이 포함된다.

[0122] 작용제는 또한 디알데히드, 카르보다이미드, 디말레이미드 등과 같은 가교제를 이용하여 면역글로불린 관련 조성물에 화학적으로 결합될 수 있다. 가교제는, 예를 들어 Pierce Biotechnology, Inc.(Rockford, Ill.)에서 얻을 수 있다. Pierce Biotechnology, Inc. 웹사이트에서 도움을 받을 수 있다. 추가의 가교제에는, Kreatech Biotechnology, B.V.(Amsterdam, The Netherlands)의 미국 특허 제5,580,990호; 제5,985,566호; 및 제6,133,038호에 기재된 백금 가교제가 포함된다.

[0123] 대안적으로, 작용제 상의 관능기와 면역글로불린 관련 조성물 상의 관능기는 동일할 수 있다. 동일한 관능기를 가교시키는 데에는 전형적으로 동종이관능성 가교제가 사용된다. 동종이관능성 가교제의 예에는, EGS(즉, 에틸렌 글리콜 비스[석신이미딜 석시네이트]), DSS(즉, 디석신이미딜 수베레이트), DMA(즉, 디메틸 아디피디메이트.2HC1), DTSSP(즉, 3,3'-디티오비스[설포석신이미딜 프로피오네이트]), DPDPB(즉, 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미도]부탄) 및 BMH(즉, 비스-말레이미도헥산)가 포함된다. 이러한 동종이관능성 가교제도 Pierce Biotechnology, Inc.에서 입수 가능하다.

[0124] 다른 경우에, 면역글로불린 관련 조성물에서 작용제를 절단하는 것이 유리할 수 있다. 당업자는 또한, 상기 기재된 Pierce Biotechnology, Inc.의 웹사이트를 통해 세포에서, 예를 들어 효소에 의해 절단될 수 있는 적합한 가교제를 선택하는 것에 대해 도움을 받을 수 있다. 따라서, 작용제는 면역글로불린 관련 조성물에서 분리될 수 있다. 절단 가능한 링커의 예에는, SMPT(즉, 4-석신이미딜옥사카르보닐-메틸- α -[2-피리딜디티오]톨루엔), Sulfo-LC-SPDP(즉, 설포석신이미딜 6-(3-[2-피리딜디티오]프로피온아미도)헥사노에이트), LC-SPDP(즉, 석신이미딜 6-(3-[2-피리딜디티오]프로피온아미도)헥사노에이트), Sulfo-LC-SPDP(즉, 설포석신이미딜 6-(3-[2-피리딜디티오]프로피온아미도)헥사노에이트), SPDP(즉, N-석신이미딜 3-[2-피리딜디티오]프로피온아미도헥사노에이트) 및 AEDP(즉, 3-[(2-아미노에틸)디티오]프로피온산 HCl)가 포함된다.

[0125] 또 다른 실시형태에서, 접합체는 적어도 하나의 면역글로불린 관련 조성물과 물리적으로 결합된 적어도 하나의 작용제를 포함한다. 당업계에 알려진 임의의 방법을 이용하여 작용제와 면역글로불린 관련 조성물을 물리적으로 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 관련 조성물과 작용제는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 함께 혼합될 수 있다. 혼합 순서는 중요하지 않다. 예를 들어, 작용제는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 면역글로불린 관련 조성물과 물리적으로 혼합될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 관련 조성물과 작용제를 용기에 위치시키고, 예를 들어 용기를 흔드는 방식으로 진탕시켜 면역글로불린 관련 조성물과 작용제를 혼합할 수 있다.

[0126] 면역글로불린 관련 조성물은 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 관련 조성물은 상기 기재된 바와 같은 가교제 또는 관능기를 이용하여 변형될 수 있다.

[0127] A. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 제조하는 방법

[0128] **일반 개요.** 처음에, 본 발명의 기술의 항체가 생성될 수 있는 표적 폴리펩타이드가 선택된다. 예를 들어, 전장 HER2 단백질, 또는 HER2 단백질의 세포외 도메인의 일부에 대한 항체가 생성될 수 있다. 이러한 표적 폴리펩타이드에 대해 지시된 항체를 제조하는 기술은 당업자에게 널리 알려져 있다. 이러한 기술의 예에는, 예를 들어, 비제한적으로, 디스플레이 라이브러리, 제노(xeno) 또는 인간 마우스, 하이브리도마 등을 포함하는 것들이 포함된다. 본 발명의 기술의 범위 내 표적 폴리펩타이드에는 면역반응을 유발할 수 있는 세포외 도메인을 함유하는 HER2 단백질에서 유도된 임의의 폴리펩타이드가 포함된다.

[0129] HER2 단백질 및 이의 단편에 대해 지시된, 재조합적으로 조작된 항체 및 항체 단편, 예를 들어 항체 관련 폴리펩타이드가 본 개시내용에 따라 사용하기에 적합하다는 것을 이해해야 한다.

[0130] 본원에 제시된 기술에 적용될 수 있는 항-HER2 항체에는, 단클론 및 다클론 항체, 및 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, 디아바디, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 항체 단편이 포함된다. 항체 Fv 함유 폴리펩타이드, 예를 들어 Fab' 및 F(ab')₂ 항체 단편을 고수율로 생산하는 데 유용한 방법이 기재되어 있다. 미국 특허 제5,648,237호 참조.

- [0131] 일반적으로, 항체는 기원 종(originating species)으로부터 얻어진다. 더욱 특히, 표적 폴리펩타이드 항원에 대해 특이성을 갖는 기원 종 항체의 경쇄, 중쇄 또는 둘 모두의 가변 부분의 핵산 또는 아미노산 서열이 얻어진다. 기원 종은 본 발명의 기술의 항체, 또는 항체의 라이브러리를 생성하는 데 유용한 임의의 종, 예를 들어 래트, 마우스, 토끼, 닭, 원숭이, 인간 등이다.
- [0132] 파지 또는 파지미드(phagemid) 디스플레이 기술은 본 발명의 기술의 항체를 유도하는 데 유용한 기술이다. 단클론 항체를 생성하고 클로닝하는 기술은 당업자에게 널리 알려져 있다. 본 발명의 기술의 항체를 인코딩하는 서열의 발현은, 대장균(*E. coli*)에서 수행될 수 있다.
- [0133] 핵산 코딩 서열의 축퇴로 인해, 자연 발생 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 다른 서열이 본 발명의 기술의 실시예에 사용될 수 있다. 이에, 비제한적으로, 서열 내에서 기능적으로 동등한 아미노산 잔기를 인코딩하는 상이한 코돈의 치환에 의해 변경되어 침묵 변화(silent change)를 생성하는, 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 핵산 서열이 포함된다. 본 발명의 기술에 따른 번역글로불린의 뉴클레오타이드 서열은, 변이체가 HER2 단백질을 인식하는 작동 항체를 형성하는 한, 표준 방법에 따라 계산 시 최대 25%의 서열 상동성 변이를 허용하는 것으로 이해된다(문헌["Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.]). 예를 들어, 폴리펩타이드 서열 내 하나 이상의 아미노산 잔기는 기능적 등가물로서 작용하는 유사한 극성의 또 다른 아미노산으로 치환되어 침묵 변경(silent alteration)을 생성할 수 있다. 서열 내 아미노산에 대한 치환체는 아미노산이 속하는 부류의 다른 구성원에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함된다. 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함된다. 양으로 하전된(염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 포함된다. 음으로 하전된(산성) 아미노산에는 아스파르트산과 글루탐산이 포함된다. 예를 들어, 글리코실화, 단백질분해 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드와의 결합 등에 의해, 번역 동안 또는 번역 후에 차등적으로 변형되는 단백질, 또는 이의 단편 또는 유도체가 또한 본 발명의 기술의 범위 내에 포함된다. 또한, 핵산 서열을 인코딩하는 번역글로불린은 번역, 개시 및/또는 종결 서열을 생성 및/또는 파괴하거나, 코딩 영역에서 변이를 생성하고/하거나, 새로운 제한 엔도뉴클레아제 부위를 형성하거나 기존 부위를 파괴하여 추가 시험관내 변형을 용이하게 하기 위해 시험관내 또는 생체내에서 돌연변이될 수 있다. 비제한적으로, 시험관내 부위 지정 돌연변이유발(문헌[*J. Biol. Chem.* 253:6551]), Tab 링커(Pharmacia)의 사용 등을 포함하는 당업계에 알려진 돌연변이유발에 대한 임의의 기술이 사용될 수 있다.
- [0134] 다클론 항혈청 및 면역원의 제조. 본 발명의 기술의 항체 또는 항체 단편을 생성하는 방법은, 전형적으로 대상(일반적으로, 마우스 또는 토끼와 같은 비인간 대상)을 정제된 HER2 단백질 또는 이의 단편, 또는 HER2 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 세포로 면역화시키는 것을 포함한다. 적절한 면역원성 제제는, 예를 들어 재조합적으로 발현된 HER2 단백질 또는 화학적으로 합성된 HER2 펩타이드를 함유할 수 있다. HER2 단백질의 세포외 도메인, 또는 이의 일부 또는 단편은, 다클론 및 단클론 항체 제조를 위한 표준 기술을 사용하여 HER2 단백질, 또는 이의 일부 또는 단편에 결합하는 항-HER2 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 항원성 HER2 펩타이드는 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개 또는 적어도 100개의 아미노산 잔기를 포함한다. 때때로 용도 및 당업자에게 널리 알려진 방법에 따라, 더 긴 항원성 펩타이드가 더 짧은 항원성 펩타이드보다 바람직하다. 소정의 에피토프의 다량체가 때때로 단량체보다 더 효과적이다.
- [0136] 필요한 경우, HER2 단백질(또는 이의 단편)의 면역원성은 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH: keyhole limpet hemocyanin) 또는 오브알부민(OVA)과 같은 담체 단백질에의 융합 또는 접합에 의해 증가될 수 있다. 다수의 이러한 담체 단백질이 당업계에 알려져 있다. 폴리펩타이드에 대한 대상의 면역반응을 증가시키기 위해, HER2 단백질을 프로인트(Freund) 완전 또는 불완전 아դju반트와 같은 통상적인 아դju반트와 조합할 수도 있다. 면역학적 반응을 증가시키기 위해 사용되는 다양한 아դju반트에는, 비제한적으로, 프로인트(완전 및 불완전), 미네랄 겔(예를 들어, 수산화알루미늄), 표면 활성 물질(예를 들어, 리소레스틴, 플루로닉 폴리올(pluronic polyol), 다가음이온, 펩타이드, 오일 에멀전, 디니트로페놀 등), 칼메트-게랑 간균(*Bacille Calmette-Guerin*) 및 코리네박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*)과 같은 인간 아դju반트, 또는 유사한 면역자극성 화합물이 포함된다. 이러한 기술은 당업계에서 표준이다.
- [0137] 대안적으로, 나노입자, 예를 들어 바이러스 유사 입자(VLP)가 항원, 예를 들어 HER2를 숙주 동물에 제시하는 데

사용될 수 있다. 바이러스 유사 입자는 바이러스 유전 물질을 운반하지 않기 때문에, 감염성이 없으면서 진정한 고유한 바이러스의 구조와 입체형태를 모방하는 다중 단백질 구조이다(문헌[Urakami A, *et al*, *Clin Vaccine Immunol* 24: e00090-17 (2017)]). 숙주 면역계에 도입되는 경우, VLP는 효과적인 면역반응을 유발하여 외래 항원에 대한 매력적인 담체가 될 수 있다. VLP 기반 항원 제시 플랫폼의 중요한 이점은, 항원을 조밀하고 반복적인 방식으로 디스플레이할 수 있다는 점이다. 따라서, 항원 함유 VLP는 B세포 수용체(BCR)의 교차결합을 효과적으로 가능하게 하는 방식으로 강력한 B세포 반응을 유도할 수 있다. VLP는 이의 특성, 예를 들어 면역원성을 정교화하기 위해 유전적으로 조작될 수 있다. 이러한 기술은 당업계에서 표준이다.

[0138] 항체가 생성되기에 충분하도록 정제된 단백질 또는 폴리펩타이드를 분리하는 것은 시간 소모적일 수 있으며, 때때로 기술적으로 어려울 수 있다. 통상적인 단백질 기반 면역화와 관련된 추가의 문제에는, 단백질 항원의 안전성, 안정성, 확장성 및 일관성에 대한 우려가 포함된다. 핵산(DNA 및 RNA) 기반 면역화가 유망한 대안으로 부상하였다. DNA 백신은 통상적으로 후보 항원, 예를 들어 HER2의 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 박테리아 플라스미드를 기반으로 한다. 강력한 진핵생물 프로모터를 이용하는 경우, 숙주에 플라스미드가 접종되면, 인코딩된 항원이 발현되어 충분한 수준의 전이유전자 발현이 일어날 수 있다(문헌[Galvin T.A., *et al.*, *Vaccine* 2000, 18:2566-2583]). 현대의 DNA 백신 생성은 DNA 합성, 가능하게는 제조에 유의하게 적은 시간과 비용이 소요되는 플라스미드 벡터로의 1단계 클로닝과 플라스미드의 후속 단리에 의존한다. 생성된 플라스미드 DNA는 또한 실온에서 고도로 안정하여, 냉장 운송을 회피할 수 있고, 실질적으로 연장된 저장 수명을 얻을 수 있다. 이러한 기술은 당업계에서 표준이다.

[0139] 대안적으로, 관심 항원, 예를 들어 HER2를 인코딩하는 핵산 서열은 합성을 통해 mRNA 분자에 도입될 수 있다. 이어서, mRNA는 숙주 동물에 전달될 수 있으며, 숙주 동물의 세포는 mRNA 서열을 인식하고, 이를 후보 항원, 예를 들어 HER2의 폴리펩타이드 서열로 번역하여, 외래 항원에 대한 면역반응을 촉발시킬 수 있다. mRNA 항원 또는 mRNA 백신의 매력적인 특징은, mRNA가 비감염성 비통합성 플랫폼이라는 점이다. DNA 백신과 관련된 감염 또는 삽입 돌연변이유발의 잠재적인 위험이 없다. 또한, mRNA는 정상 세포 과정에 의해 분해되고, 설계 및 전달 방법의 변형을 통해 제어 가능한 생체내 반감기를 갖는다(문헌[Kariko, K., *et al.*, *Mol Ther* 16: 1833-1840 (2008)]; 문헌[Kauffman, K. J., *et al.*, *J Control Release* 240, 227-234 (2016)]; 문헌[Guan, S. & Rosenacker, J., *Gene Ther* 24, 133-143 (2017)]; 문헌[Thess, A., *et al.*, *Mol Ther* 23, 1456-1464 (2015)]). 이러한 기술은 당업계에서 표준이다.

[0140] 본 발명의 기술의 설명에서, 면역반응은 "1차" 또는 "2차" 면역반응으로 기재될 수 있다. "보호" 면역반응으로도 기재되는 1차 면역반응은, 특정 항원, 예를 들어 HER2 단백질에의 일부 초기 노출(예를 들어, 초기 "면역화" 또는 "프라이밍")에 대한 결과로서 개체에서 생성된 면역반응을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 면역화는 개체를 항원을 함유하는 백신으로 백신접종한 결과로 일어날 수 있다. 예를 들어, 백신은 하나 이상의 HER2 단백질 유래 항원을 포함하는 HER2 백신일 수 있다. 1차 면역반응은 시간 경과에 따라 약화되거나 감소될 수 있으며, 심지어 사라지거나 적어도 검출이 가능하지 않을 정도로 감소될 수 있다. 따라서, 본 발명의 기술은 또한 본원에서 "기억 면역반응"으로도 기재되는 "2차" 면역반응에 관한 것이다. 2차 면역반응이라는 용어는, 1차 면역반응이 이미 일어난 후에 개체에서 유발된 면역반응을 나타낸다.

[0141] 따라서, 2차 면역반응은, 예를 들어 약화되거나 감소된 기존 면역반응을 증강시키기 위해(예를 들어, 부스팅), 또는 사라지거나 더 이상 검출 불가능한 이전 면역반응을 재생성하기 위해 유도될 수 있다. 2차 또는 기억 면역반응은 체액성(항체) 반응 또는 세포성 반응일 수 있다. 2차 또는 기억 체액성 반응은 항원의 첫 번째 제시에서 생성된 기억 B세포를 자극할 때 일어난다. 지연과민(DTH: delayed type hypersensitivity) 반응은 CD4⁺ T세포에 의해 매개되는 세포성 2차 또는 기억 면역반응의 한 유형이다. 항원의 첫 번째 노출은 면역계를 프라이밍하고, 추가 노출(들)은 DTH를 유도한다.

[0142] 적절한 면역화 후, 대상의 혈청에서 항-HER2 항체가 제조될 수 있다. 목적하는 경우, HER2 단백질에 대해 지시된 항체 분자는 포유류(예를 들어, 혈액)에서 분리될 수 있으며, 폴리펩타이드 A 크로마토그래피와 같은 널리 알려진 기술을 통해 추가로 정제되어 IgG 분획을 얻을 수 있다.

[0143] **단클론 항체.** 본 발명의 기술의 하나의 실시형태에서, 항체는 항-HER2 단클론 항체이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항-HER2 단클론 항체는 인간 또는 마우스 항-HER2 단클론 항체일 수 있다. HER2 단백질, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체에 대해 지시된 단클론 항체의 제조를 위해, 연속 세포주 배양을 통해 항체 분자의 생산을 제공하는 임의의 기술이 이용될 수 있다. 이러한 기술에는, 비제한적으로, 하이브리도마 기술(예를 들어, 문헌[Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497] 참조); 트리오마(trioma) 기술; 인간 B세포 하

이브리도마 기술(예를 들어, 문헌[Kozbor, *et al.*, 1983. *Immunol. Today* 4: 72] 참조) 및 인간 단클론 항체를 생산하는 EBV 하이브리도마 기술(예를 들어, 문헌[Cole, *et al.*, 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96] 참조)이 포함된다. 인간 단클론 항체가 본 발명의 기술의 실시예에 이용될 수 있으며, 인간 하이브리도마를 사용하거나(예를 들어, 문헌[Cote, *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030]), 시험관내에서 인간 B세포를 엡스타인-바 바이러스로 형질전환시키는(예를 들어, 문헌[Cole, *et al.*, 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]) 방식으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체의 영역을 인코딩하는 핵산 집단을 분리할 수 있다. 항체의 보존된 영역을 인코딩하는 서열에서 유도된 프라이머를 이용하는 PCR을 사용하여 집단으로부터 항체의 일부를 인코딩하는 서열을 증폭시킨 후, 증폭된 서열로부터 항체 또는 이의 단편(예컨대, 가변 도메인)을 인코딩하는 DNA를 재구성한다. 이러한 증폭된 서열을 또한 파지 또는 박테리아에서 융합 폴리펩타이드의 발현과 디스플레이를 위해, 다른 단백질(예를 들어 박테리오파지 코트 또는 박테리아 세포 표면 단백질)을 인코딩하는 DNA에 융합시킬 수 있다. 이어서, 증폭된 서열을 발현시키고, 예를 들어 HER2 단백질 상에 존재하는 항원 또는 에피토프에 대한 발현된 항체 또는 이의 단편의 친화도에 따라 추가로 선별하거나 분리할 수 있다. 대안적으로, 대상을 면역화시킨 후, 통상의 방법을 사용하여 대상의 비장에서 하이브리도마를 분리하는 방식으로 항-HER2 단클론 항체를 발현하는 하이브리도마를 제조할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Milstein *et al.*, (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73: 3-46)] 참조. 표준 방법을 사용하여 하이브리도마를 스크리닝하는 방식으로 다양한 특이성(즉, 상이한 에피토프에 대한) 및 친화도를 갖는 단클론 항체를 생산할 수 있다. 목적하는 특성, 예를 들어 HER2 결합을 갖는 선별된 단클론 항체는 하이브리도마에 의해 발현되는 바와 같이 사용될 수 있으며, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 분자에 결합하여 이의 특성을 변경하거나, 이를 인코딩하는 cDNA를 다양한 방식으로 분리하고, 시퀀싱하고 조작할 수 있다. HER2 단백질의 면역원성 특성을 증강시키기 위해, 합성 덴드리머 트리(synthetic dendromeric tree)를 반응성 아미노산 측쇄, 예를 들어 리신에 부가할 수 있다. 또한, HER2 단백질의 면역원성 특성을 증강시키기 위해 CPG-디뉴클레오타이드 기술을 사용할 수 있다. 다른 조작에는, 저장 동안 또는 대상에의 투여 후 항체의 불안정성에 기여하는 특정 아미노 아실 잔기를 치환하거나 결실시키는 것, 및 HER2 단백질의 항체의 친화도를 개선시키기 위한 친화도 성숙 기술이 포함된다.

[0144] 하이브리도마 기술. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 종래 전이유전자와 인간 경쇄 전이유전자를 포함하는 계능을 갖는 유전자이식(transgenic) 비인간 동물, 예를 들어 유전자이식 마우스에서 얻은 B세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된 항-HER2 단클론 항체이다. 하이브리도마 기술에는 당업계에 알려져 있고, 문헌[Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988)]; 문헌[Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981)]에 교시된 것들이 포함된다. 하이브리도마와 단클론 항체를 생산하는 다른 방법도 당업자에게 널리 알려져 있다.

[0145] 파지 디스플레이 기술. 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 기술의 항체는 제조할 DNA 기술과 파지 디스플레이 기술의 적용을 통해 생산될 수 있다. 예를 들어, 항-HER2 항체는 당업계에 알려진 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 운반하는 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 항원, 전형적으로 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 이용한 직접 선별에 의해, 레파토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 쥐)에서 목적하는 결합 특성을 갖는 파지가 선별된다. 이러한 방법에 사용되는 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 디설파이드 안정화된 Fv 항체 도메인을 갖는 fd 및 M13을 포함하는 사상 파지이다. 또한, 상기 방법은 HER2 폴리펩타이드, 예를 들어 폴리펩타이드 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체에 대해 목적하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편의 신속하고 효과적인 식별을 가능하게 하는 Fab 발현 라이브러리의 작제를 위해 조정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Huse, *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989] 참조). 본 발명의 기술의 항체를 제조하는 데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 다른 예에는, 문헌[Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883, 1988]; 문헌[Chaudhary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070, 1990]; 문헌[Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50, 1995]; 문헌[Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186, 1995]; 문헌[Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958, 1994]; 문헌[Persic *et al.*, *Gene* 187: 9-18, 1997]; 문헌[Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57: 191-280, 1994]; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047(Medical Research Council 등); WO 97/08320(Morphosys); WO 92/01047(CAT/MRC); WO 91/17271(Affymax); 및 미국 특허 제5,698,426호, 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,580,717호, 제5,427,908

호, 제5,750,753호, 제5,821,047호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,516,637호, 제5,780,225호, 제5,658,727호 및 제5,733,743호에 개시된 것들이 포함된다. 디설파이드 결합을 통해 폴리펩타이드를 부착시키는 방식으로 박테리오파지 입자의 표면 상에 폴리펩타이드를 디스플레이하는 데 유용한 방법은 미국 특허 제 6,753,136호(Lohning)에 기재되어 있다. 상기 참고문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선별 후, 파지로부터 항체 코딩 영역이 단리되어 전체 항체(인간 항체 포함), 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 생성하는 데 사용될 수 있으며, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는 임의의 목적하는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, WO 92/22324; 문헌[Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12: 864-869, 1992]; 문헌[Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34, 1995]; 및 문헌[Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043, 1988]에 개시된 것들과 같은 당업계에 알려진 방법을 사용하여, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생산하는 기술이 또한 이용될 수 있다.

[0146] 일반적으로, 양호한 결합 활성을 유지하는 변이체를 식별하기 위해 디스플레이 벡터에 클로닝된 하이브리드 항체 또는 하이브리드 항체 단편이 적절한 항원에 대해 선별될 수 있는데, 이는 항체 또는 항체 단편이 파지 또는 파지미드 입자의 표면 상에 존재하기 때문이다. 예를 들어, 문헌[Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)] 참조. 하지만, 선별 및/또는 스크리닝을 위해 항체 단편 라이브러리를 용해성 파지 벡터(변형된 T7 또는 람다 Zap 시스템)에 클로닝하는 것과 같은 다른 벡터 형식이 이러한 방법에 사용될 수 있다.

[0147] **제조합 항-HER2 항체의 발현.** 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 기술의 항체는 제조합 DNA 기술의 적용을 통해 생산될 수 있다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 인코딩하는 제조합 폴리뉴클레오타이드 작제물은 전형적으로 항-HER2 항체 사슬의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하며, 이에에는 자연적으로 회합된 또는 이중 프로모터 영역이 포함된다. 이와 같이, 이러한 기술의 또 다른 양태는 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 함유하는 벡터를 포함한다. 본 발명의 기술의 하나 이상의 폴리펩타이드의 제조합 발현을 위해, 항-HER2 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부를 함유하는 핵산이 당업계에 널리 알려져 있고 하기에 상세하게 기재되는 바와 같은 제조합 DNA 기술에 의해 적절한 클로닝 벡터 또는 발현 벡터(즉, 삽입된 폴리펩타이드 코딩 서열의 전사와 번역에 필요한 요소를 함유하는 벡터)에 삽입된다. 벡터의 다양한 집단을 생산하는 방법은 Lerner 등의 미국 특허 제6,291,160호 및 제6,680,192호에 기재되어 있다.

[0148] 일반적으로, 제조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 개시내용에서, "플라스미드"와 "벡터"는, 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에, 상호 교환적으로 사용된다. 하지만, 본 발명의 기술은 기술적으로 플라스미드가 아닌 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 동등한 기능을 하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노연관바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 바이러스 벡터는 대상의 감염과 해당 대상에서 작제물의 발현을 가능하게 한다. 일부 실시 형태에서, 발현 제어 서열은 진핵생물 숙주세포를 형질전환시키거나 트랜스팩션시킬 수 있는 벡터 내 진핵생물 프로모터 시스템이다. 벡터가 적절한 숙주에 혼입되면, 숙주는 항-HER2 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 고수준 발현, 및 항-HER2 항체의 수집 및 정제, 예를 들어 항-HER2 항체의 교차반응에 적합한 조건 하에서 유지된다. 일반적으로, U.S. 2002/0199213 참조. 이러한 발현 벡터는 전형적으로 에피솜 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 유기체에서 복제 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 하기 위해, 예를 들어 암피실린 내성 또는 히그로마이신 내성인 선별 마커를 함유한다. 벡터는 또한 세포외 항체 단편의 분비를 지시하는 데 유용한 신호 펩타이드, 예를 들어 펩타이드 리아제를 인코딩할 수 있다. 미국 특허 제5,576,195호 참조.

[0149] 본 발명의 기술의 제조합 발현 벡터는 숙주세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 HER2 결합 특성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 이는, 제조합 발현 벡터가 발현되는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현에 사용되는 숙주세포에 기반하여 선택된 하나 이상의 조절 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 제조합 발현 벡터 내에서, "작동 가능하게 연결된"은, 관심 뉴클레오타이드 서열이 뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 하는 방식으로(예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서, 또는 벡터가 숙주세포에 도입될 때 숙주세포에서) 조절 서열(들)에 연결되어 있음을 의미하는 것으로 의도된다. "조절 서열"이라는 용어는, 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 서열은, 예를 들어 문헌[Goeddel, *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기재되어 있다. 조절 서열에는 다수의 유형의 숙주세포에서 뉴클레오타이드 서열의 구성적 발현을 지시하는 것들과, 특정 숙주세포에서만 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시하는 것들(예를 들어, 조직 특

이적 조절 서열)이 포함된다. 당업자는, 발현 벡터의 설계가 형질전환시키고자 하는 숙주세포의 선택, 목적하는 폴리펩타이드의 발현 수준 등과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 재조합 폴리펩타이드(예를 들어, 항-HER2 항체) 발현의 프로모터로서 유용한 전형적인 조절 서열에는, 예를 들어, 비제한적으로, 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 다른 당분해 효소의 프로모터가 포함된다. 유도성 프로모터에는, 특히, 알코올 데히드로게나아제, 이소시토크롬 C, 및 말토오스 및 갈락토오스 이용에 관여하는 효소의 프로모터가 포함된다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 *ara B* 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있으며, 숙주세포에서 발현 가능하다. 미국 특허 제5,028,530호 참조. 본 발명의 기술의 발현 벡터는 숙주세포에 도입되어 본원에 기재된 바와 같은 핵산에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드 또는 펩타이드(융합 폴리펩타이드 포함)(예를 들어, 항-HER2 항체 등)를 생산할 수 있다.

[0150] 본 발명의 기술의 또 다른 양태는, 하나 이상의 항-HER2 항체를 인코딩하는 핵산을 함유하는 항-HER2 항체 발현 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 기술의 재조합 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서 항-HER2 항체의 발현을 위해 설계될 수 있다. 예를 들어, 항-HER2 항체는 박테리아 세포(예컨대, 대장균), 곤충 세포(바쿨로 바이러스 발현 벡터 사용), 진균 세포(예를 들어 효모), 효모 세포 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주세포는 문헌[Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 추가로 논의되어 있다. 대안적으로, 재조합 발현 벡터는, 예를 들어 T7 프로모터 조절 서열과 T7 폴리머라아제를 사용하여 시험관내에서 전사되고 번역될 수 있다. 확률적으로 생성된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 통해 선결된 특성, 예를 들어 항-HER2 항체를 갖는 폴리펩타이드를 제조하고 스크리닝하는데 유용한 방법은 이전에 기재된 바 있다. 미국 특허 제5,763,192호; 제5,723,323호; 제5,814,476호; 제5,817,483호; 제5,824,514호; 제5,976,862호; 제6,492,107호; 제6,569,641호 참조.

[0151] 원핵생물에서 폴리펩타이드의 발현은 융합 또는 비융합 폴리펩타이드의 발현을 지시하는 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 벡터를 이용하여 대장균에서 가장 흔히 수행된다. 융합 벡터는 그 안에 인코딩된 폴리펩타이드, 통상적으로 재조합 폴리펩타이드의 아미노 말단에 다수의 아미노산을 부가한다. 이러한 융합 벡터는 전형적으로 하기 3가지 목적을 위한 것이다: (i) 재조합 폴리펩타이드의 발현을 증가시키기 위해; (ii) 재조합 폴리펩타이드의 용해도를 증가시키기 위해; 및 (iii) 친화성 정제에서 리간드로서 작용하여 재조합 폴리펩타이드의 정제를 돕기 위해. 종종, 융합 발현 벡터에서, 융합 폴리펩타이드의 정제 후에 융합 모이어티에서 재조합 폴리펩타이드가 분리될 수 있도록 하기 위해 융합 모이어티와 재조합 폴리펩타이드의 접합부에 단백질을 절단 부위가 도입된다. 이러한 효소와 이의 동족 인식 서열에는, 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나아제가 포함된다. 전형적인 융합 발현 벡터에는, 각각, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST), 말토오스 E 결합 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 A를 표적 재조합 폴리펩타이드에 융합하는 pGEX(Pharmacia Biotech Inc; 문헌[Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40]), pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.) 및 pRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)가 포함된다.

[0152] 적합한 유도성 비융합 대장균 발현 벡터의 예에는, pTrc(문헌[Amann *et al.*, (1988) *Gene* 69: 301-315]) 및 pET 11d(문헌[Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89])가 포함된다. 폴리펩타이드 융합을 통해 다관능성 폴리펩타이드를 생성하기 위한 별개의 활성 펩타이드 또는 단백질 도메인의 표적화된 조립 방법은, Pack 등의 미국 특허 제6,294,353호 및 제6,692,935호에 기재되어 있다. 대장균에서 재조합 폴리펩타이드, 예를 들어 항-HER2 항체의 발현을 최대화하기 위한 하나의 전략은, 재조합 폴리펩타이드를 단백질분해로 절단하는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 폴리펩타이드를 발현시키는 것이다. 예를 들어, 문헌[Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128] 참조. 또 다른 전략은, 각각의 아미노산에 대한 개별 코돈이 발현 숙주, 예를 들어 대장균에서 우선적으로 이용되도록 발현 벡터에 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경시키는 것이다(예를 들어, 문헌[Wada, *et al.*, 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118] 참조). 본 발명의 기술의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기술에 따라 수행될 수 있다.

[0153] 또 다른 실시형태에서, 항-HER2 항체 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 발현을 위한 벡터의 예에는, pYepSec1(문헌[Baldari, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6: 229-234]), pMFa(문헌[Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982]), pJRY88(문헌[Schultz *et al.*, *Gene* 54: 113-123, 1987]), pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) 및 picZ(Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)가 포함된다. 대안적으로, 항-HER2 항체는 바쿨로바이러스 발현 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 발현될 수 있다. 배양된 곤충 세포(예를 들어, SF9 세포)에서 폴리펩타이드, 예를 들어 항-HER2 항체의 발현에 이용 가능한 바쿨로바이러스 벡터에는, pAc 시리즈(문헌[Smith, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165,

1983])와 pVL 시리즈(문헌[Lucklow and Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39])가 포함된다.

[0154] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 인코딩하는 핵산은 포유류 발현 벡터를 사용하여 포유류 세포에서 발현된다. 포유류 발현 벡터의 예에는, 예를 들어, 비제한적으로, pCDM8(문헌[Seed, *Nature* 329: 840, 1987])과 pMT2PC(문헌[Kaufman, *et al.*, *EMBO J.* 6: 187-195, 1987])가 포함된다. 포유류 세포에 사용되는 경우, 발현 벡터의 제어 기능은 종종 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시토크로마틴 바이러스 및 유인원 바이러스 40에서 유도된다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 발현에 유용한 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘 모두에 적합한 다른 발현 시스템에 대해서는, 예를 들어 문헌[Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]의 챕터 16 및 17을 참조한다.

[0155] 또 다른 실시형태에서, 재조합 포유류 발현 벡터는 특정 세포 유형(예를 들어, 조직 특이적 조절 요소)에서 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 조직 특이적 조절 요소는 당업계에 알려져 있다. 적합한 조직 특이적 프로모터의 비제한적인 예에는, 알부민 프로모터(간 특이적; 문헌[Pinkert, *et al.*, *Genes Dev.* 1: 268-277, 1987]), 림프구 특이적 프로모터(문헌[Calame and Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275, 1988]), T세포 수용체의 프로모터(문헌[Winoto and Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733, 1989]), 면역글로불린(문헌[Banerji, *et al.*, 1983. *Cell* 33: 729-740]; 문헌[Queen and Baltimore, *Cell* 33: 741-748, 1983]), 뉴런 특이적 프로모터(예를 들어, 신경미세섬유 프로모터; 문헌[Byrne and Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477, 1989]), 췌장 특이적 프로모터(문헌[Edlund, *et al.*, 1985. *Science* 230: 912-916]) 및 유선 특이적 프로모터(예를 들어, 유청 프로모터; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 특허출원 공개공보 제264,166호)가 포함된다. 발달 조절된 프로모터, 예를 들어 췌장 호소(hox) 프로모터(문헌[Kessel and Gruss, *Science* 249: 374-379, 1990])와 α-페토단백질 프로모터(문헌[Campes and Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546, 1989])도 포함된다.

[0156] 본 발명의 방법의 또 다른 양태는, 본 발명의 기술의 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주세포에 관한 것이다. "숙주세포"와 "재조합 숙주세포"라는 용어는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 나타내는 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은, 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 이는 여전히 본원에 사용된 용어의 범위 내에 포함된다.

[0157] 숙주세포는 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 예를 들어, 항-HER2 항체는 박테리아 세포(예컨대, 대장균), 곤충 세포, 효모 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 포유류 세포는 면역글로불린 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 분절을 발현시키는 데 적합한 숙주이다. 문헌[Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)] 참조. 무손상 이중 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당업계에서 개발되었으며, 이에에는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, L세포 및 골수종 세포주가 포함된다. 일부 실시형태에서, 세포는 비인간 세포이다. 이러한 세포를 위한 발현 벡터는 복제 기원, 프로모터, 인핸서와 같은 발현 제어 서열과, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결 서열과 같은 필요한 프로세싱 정보 부위를 포함할 수 있다. 문헌[Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986]. 예시적인 발현 제어 서열은 내인성 유전자, 시토크로마틴 바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종바이러스 등에서 유도된 프로모터이다. 문헌[Co *et al.*, *J Immunol.* 148: 1149, 1992]. 다른 적합한 숙주세포는 당업자에게 알려져 있다.

[0158] 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 트랜스펙션 기술을 통해 원핵생물 또는 진핵생물 세포에 도입될 수 있다. 본원에 사용된 "형질전환"과 "트랜스펙션"이라는 용어는, 외래 핵산(예를 들어, DNA)을 숙주세포에 도입하는 다양한 업계에 알려진 기술을 나타내는 것으로 의도되며, 이에에는 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침, DEAE-덱스트란 매개 트랜스펙션, 리포펙션, 전기천공, 유전자총 또는 바이러스 기반 트랜스펙션이 포함된다. 포유류 세포를 형질전환시키는 데 사용되는 다른 방법에는, 폴리브렌, 원형질체 융합, 리포솜, 전기천공 및 미세주사를 사용하는 것이 포함된다(일반적으로, 문헌[Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*] 참조). 숙주세포를 형질전환 또는 트랜스펙션시키는 적합한 방법은, 문헌[Sambrook, *et al.* (*MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)], 및 다른 실험실 매뉴얼에서 확인할 수 있다. 관심 DNA 분절을 함유하는 벡터는 세포 숙주 유형에 따라 널리 알려진 방법에 의해 숙주세포로 전달될 수 있다.

[0159] 적합한 벡터의 비제한적인 예에는, 증식과 확장, 또는 발현 또는 둘 모두를 위해 설계된 것들이 포함된다. 예를

들어, 클로닝 벡터는 pUC 시리즈, pBluescript 시리즈(Stratagene, LaJolla, Calif.), pET 시리즈(Novagen, Madison, Wis.), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 및 pEX 시리즈(Clontech, Palo Alto, Calif.)로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다. 람다-GT10, 람다-GT11, 람다-ZapII(Stratagene), 람다-EMBL4 및 람다-NM1149와 같은 박테리오파지 벡터가 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 비제한적인 예에는, pBI110, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(Clontech)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 비제한적인 예에는, pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)가 포함된다. TOPO 클로닝 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 또한 제조업체의 권장사항에 따라 사용될 수 있다.

[0160]

특정 실시형태에서, 벡터는 포유류 벡터이다. 특정 실시형태에서, 포유류 벡터는 mRNA의 전사 개시를 매개하는 적어도 하나의 프로모터 요소, 항체 코딩 서열, 및 전사의 종결과 전사체의 폴리아데닐화에 필요한 신호를 함유한다. 특정 실시형태에서, 포유류 벡터는, 예를 들어 인헨서, Kozak 서열, 및 RNA 스플라이싱을 위해 공여체 부위와 수용체 부위에 플랜킹된 개재 서열과 같은 추가 요소를 함유한다. 특정 실시형태에서, 예를 들어 SV40의 초기 및 후기 프로모터, 레트로바이러스, 예를 들어 RSV, HTLV1, HIV1의 긴말단반복부(LTRS), 및 시토크로마 바이러스(CMV)의 초기 프로모터로 고도로 효율적인 전사가 달성될 수 있다. 세포 요소(예를 들어, 인간 액틴 프로모터)가 또한 사용될 수 있다. 포유류 발현 벡터의 비제한적인 예에는, pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN 또는 pLNCX(Clontech Labs, Palo Alto, Calif.), pcDNA3.1(+/-), pcDNA/Zeo(+/-) 또는 pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen, Carlsbad, CA), PSVL 및 PMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146) 및 pBC12MI(ATCC 67109)와 같은 벡터가 포함된다. 이러한 포유류 벡터와 조합으로 사용될 수 있는 포유류 숙주세포의 비제한적인 예에는, 인간 Hela 293, HEK 293, H9 및 Jurkat 세포, 마우스 3T3, NIH3T3 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV 1, 메추라기 QC1-3 세포, 마우스 L세포 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포가 포함된다.

[0161]

특정 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 파르보바이러스 기반 벡터, 예를 들어 아데노연관바이러스(AAV) 기반 벡터, AAV-아데노바이러스 키메라 벡터 및 아데노바이러스 기반 벡터, 및 렌티바이러스 벡터, 예컨대 단순헤르페스(HSV) 기반 벡터이다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 바이러스 복제에 결함이 있도록 조작된다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 숙주에 대한 독성을 제거하도록 조작된다. 이러한 바이러스 벡터는, 예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; 및 문헌[Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)]에 기재된 표준 제조법 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0162]

특정 실시형태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드는 통상적인 기술에 따라 세포(예를 들어, 생체의 세포)로 전달될 수 있으며, 생성된 세포는 본원에 기재된 항-HER2 항체 또는 항원 결합 단편을 생산하기 위해 통상적인 기술에 따라 배양될 수 있다. 따라서, 숙주세포에서 이러한 서열의 발현을 위한 조절 발현 요소(예를 들어, 프로모터)에 작동 가능하게 연결된 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포가 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 중쇄를 인코딩하는 벡터와, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 경쇄를 인코딩하는 벡터는 전체 항-HER2 항체 또는 항원 결합 단편의 발현을 위해 세포에서 공동 발현될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본원에 기재된 항-HER2 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄와 경쇄를 모두 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포는 2개의 상이한 벡터, 즉, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 벡터와, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 제1 세포는 본원에 기재된 항-HER2 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 벡터를 포함하고, 제2 세포는 본원에 기재된 항-HER2 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 제1 세포와 상기 제2 세포를 포함하는 세포 혼합물이 본원에 제공된다. 세포의 예에는, 비제한적으로, 인간 세포, 인간 세포주, 대장균(예를 들어, 대장균 TB-1, TG-2, DH5a, XL-Blue MRF'(Stratagene), SA2821 및 Y1090), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 슈도모나스 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 사카로마이세스 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 뉴로스포라 크라사(*N. crassa*), 곤충 세포(예를 들어, Sf9, Ea4) 등이 포함된다.

[0163]

포유류 세포의 안정적인 트랜스펙션을 위해, 사용되는 발현 벡터와 트랜스펙션 기술에 따라, 세포의 작은 분획만이 외래 DNA를 이의 게놈에 통합시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 통합체를 식별하고 선별하기 위해, 선별 마커(예를 들어, 항생제에 내성임)를 인코딩하는 유전자가 일반적으로 관심 유전자와 함께 숙주세포에 도

입된다. 다양한 선별 마커에는, G418, 히그로마이신(hygromycin) 및 메토틱세이트(methotrexate)와 같은 약물에 대한 내성을 부여하는 것들이 포함된다. 선별 마커를 인코딩하는 핵산은 항-HER2 항체를 인코딩하는 벡터와 동일한 벡터 상의 숙주세포에 도입되거나, 별도의 벡터 상에 도입될 수 있다. 도입된 핵산으로 안정적으로 트랜스펙션된 세포는 약물 선별을 통해 식별될 수 있다(예를 들어, 선별 마커 유전자가 혼입된 세포는 생존하지만, 다른 세포는 사멸하게 됨).

[0164] 배양 중인 원핵생물 또는 진핵생물 숙주세포와 같은 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 포함하는 숙주세포가 재조합 항-HER2 항체를 생산하는 데(즉, 발현시키는 데) 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 항-HER2 항체가 생성되도록 적합한 배지 중에서 숙주세포(항-HER2 항체를 인코딩하는 재조합 발현 벡터가 도입됨)를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 배지 또는 숙주세포에서 항-HER2 항체를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 발현되면, 항-HER2 항체, 예를 들어 항-HER2 항체 또는 항-HER2 항체 관련 폴리펩타이드의 수집물을 배양 배지와 숙주세포로부터 정제한다. 항-HER2 항체는 HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항-HER2 항체는 Boss 등의 미국 특허 제4,816,397호의 방법에 따라 숙주 유기체에서 생산된다. 통상적으로, 항-HER2 항체 사슬은 신호 서열에 의해 발현되어, 배양 배지로 방출된다. 하지만, 항-HER2 항체 사슬이 숙주세포에 의해 자연적으로 분비되지 않는 경우, 항-HER2 항체 사슬은 온건한 세제를 이용한 처리를 통해 방출될 수 있다. 재조합 폴리펩타이드의 정제는 당업계에 널리 알려져 있으며, 이에, 항산암모늄 침전, 친화성 크로마토그래피 정제 기술, 컬럼 크로마토그래피, 이온 교환 정제 기술, 겔 전기영동 등이 포함된다(일반적으로 문헌[Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, N.Y., 1982)] 참조).

[0165] 항-HER2 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 항-HER2 항체 코딩 서열은, 유전자이식 동물의 게놈에의 도입 및 후속으로 유전자이식 동물의 젖에서의 발현을 위해 전이유전자에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,741,957호, 제5,304,489호 및 제5,849,992호 참조. 적합한 전이유전자는 유선 특이적 유전자, 예컨대 카제인 또는 β -락토글로불린의 프로모터 및 인핸서와 작동 가능하게 연결된 경쇄 및/또는 중쇄에 대한 코딩 서열을 포함한다. 유전자이식 동물의 생산을 위해, 전이유전자를 수정된 난모세포에 미세주사하거나 배아 줄기 세포의 게놈에 혼입할 수 있고, 이러한 세포의 핵을 제핵된 난모세포로 옮길 수 있다.

[0166] 단일 사슬 항체. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 단일 사슬 항-HER2 항체이다. 본 발명의 기술에 따르면, HER2 단백질에 특이적인 단일 사슬 항체의 생산에 맞게 기술이 조정될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,946,778호 참조). 본 발명의 기술의 단일 사슬 Fv 및 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예에는, 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; 문헌[Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991]; 문헌[Shu, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999, 1993]; 및 문헌[Skerra *et al.*, *Science* 240: 1038-1040, 1988]에 기재된 것들이 포함된다.

[0167] 키메라 및 인간화 항체. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 키메라 항-HER2 항체이다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 인간화 항-HER2 항체이다. 본 발명의 기술의 하나의 실시형태에서, 공여체 항체와 수용체 항체는 상이한 종의 단클론 항체이다. 예를 들어, 수용체 항체는 (인간에서 이의 항원성을 최소화하기 위해) 인간 항체이며, 이러한 경우 생성된 CDR 이식된 항체는 "인간화" 항체로 지칭된다.

[0168] 인간 부분과 비인간 부분을 모두 포함하는 키메라 및 인간화 단클론 항체와 같은 재조합 항-HER2 항체는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있으며, 본 발명의 기술의 범위 내에 속한다. 인간에서 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 생체내 사용뿐 아니라 시험관내 검출 검정에서 이러한 작용제의 사용을 포함하는 일부 용도의 경우, 키메라 또는 인간화 항-HER2 항체를 사용할 수 있다. 이러한 키메라 및 인간화 단클론 항체는 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술에 따라 생산될 수 있다. 이러한 유용한 방법에는, 예를 들어, 비제한적으로, 국제출원 PCT/US86/02269; 미국 특허 제5,225,539호; 유럽 특허 제184187호; 유럽 특허 제171496호; 유럽 특허 제173494호; PCT 국제 특허출원 공개공보 WO 86/01533호; 미국 특허 제4,816,567호; 제5,225,539호; 유럽 특허 제125023호; 문헌[Better, *et al.*, 1988. *Science* 240: 1041-1043]; 문헌[Liu, *et al.*, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443]; 문헌[Liu, *et al.*, 1987. *J. Immunol.* 139: 3521-3526]; 문헌[Sun, *et al.*, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218]; 문헌[Nishimura, *et al.*, 1987. *Cancer Res.* 47: 999-1005]; 문헌[Wood, *et al.*, 1985. *Nature* 314: 446-449]; 문헌[Shaw, *et al.*, 1988. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559]; 문헌[Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207]; 문헌[Oi, *et al.* (1986) *BioTechniques* 4: 214]; 문헌[Jones, *et al.*, 1986. *Nature* 321: 552-525]; 문헌[Verhoeyan, *et al.*, 1988. *Science* 239: 1534; Morrison, *Science* 229: 1202, 1985]; 문헌[Oi *et al.*, *BioTechniques* 4: 214, 1986]; 문헌[Gillies *et al.*,

J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989]; 미국 특허 제5,807,715호; 및 문헌[Beidler, *et al.*, 1988. *J. Immunol.* 141: 4053-4060]에 기재된 방법이 포함된다. 예를 들어, 항체는 CDR 이식(EP 0 239 400; WO 91/09967; 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,859,205호; 제6,248,516호; EP460167), 베니어링(veneering) 또는 재표면화(resurfacing)(EP 0 592 106; EP 0 519 596; 문헌[Padlan E. A., *Molecular Immunology*, 28: 489-498, 1991]; 문헌[Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7: 805-814, 1994]; 문헌[Roguska *et al.*, *PNAS* 91: 969-973, 1994]), 및 사슬 셔플링(shuffling)(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 쥐와 항-HER2 단클론 항체를 인코딩하는 cDNA는 Fc 불변 영역을 인코딩하는 서열을 특이적으로 제거하도록 선택된 제한효소로 소화되고, 인간 Fc 불변 영역을 인코딩하는 cDNA의 등가 부분이 치환된다(Robinson 등의 PCT/US86/02269; Akira 등의 유럽 특허출원 제184,187호; Taniguchi의 유럽 특허출원 제171,496호; Morrison 등의 유럽 특허출원 제173,494호; Neuberger 등의 WO 86/01533호; Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly 등의 유럽 특허출원 제125,023호; 문헌[Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041-1043]; 문헌[Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443]; 문헌[Liu *et al.* (1987) *J Immunol* 139: 3521-3526]; 문헌[Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218]; 문헌[Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res* 47: 999-1005]; 문헌[Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446-449]; 및 문헌[Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559]; 미국 특허 제6,180,370호; 미국 특허 제6,300,064호; 제6,696,248호; 제6,706,484호; 제6,828,422호 참조).

[0169] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술은 효과적인 항체 이펙터 기능을 가지면서, 인간 항마우스 항체(이하 "HAMA"로 지칭됨) 반응을 유도할 가능성이 낮은 인간화 항-HER2 항체의 작제를 제공한다. 항체와 관련하여 본원에 사용된 "인간" 및 "인간화"라는 용어는, 인간 대상에서 치료상 견딜 수 있는 약한 면역원성 반응을 유발하는 것으로 예상되는 임의의 항체에 관한 것이다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술은 인간화 항-HER2 항체, 중쇄 면역글로불린 및 경쇄 면역글로불린을 제공한다.

[0170] CDR 항체. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 항-HER2 CDR 항체이다. 일반적으로, 항-HER2 CDR 항체를 생성하기 위해 사용되는 공여체 항체와 수용체 항체는 상이한 종의 단클론 항체이고; 전형적으로 수용체 항체는 (인간에서 이의 항원성을 최소화하기 위해) 인간 항체이며, 이러한 경우 생성된 CDR 이식된 항체는 "인간화" 항체로 지칭된다. 이식편은 수용체 항체의 단일 V_H 또는 V_L 내 단일 CDR(또는 심지어 단일 CDR의 일부)일 수 있거나, V_H 와 V_L 중 하나 또는 둘 모두 내 다수의 CDR(또는 이의 일부)일 수 있다. 흔히, 수용체 항체의 모든 가변 도메인 내 3개의 모든 CDR이 상응하는 공여체 CDR로 대체되지만, HER2 단백질에의 생성된 CDR 이식된 항체의 적절한 결합을 가능하게 하는 데 필요한 만큼만 대체되면 된다. CDR 이식되고 인간화된 항체를 생성하는 방법은, Queen 등의 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 및 Winter의 미국 특허 제5,225,539호; 및 EP 0682040에 교시되어 있다. V_H 폴리펩타이드와 V_L 폴리펩타이드를 제조하는 데 유용한 방법은, Winter 등의 미국 특허 제4,816,397호; 제6,291,158호; 제6,291,159호; 제6,291,161호; 제6,545,142호; EP 0368684; EP0451216; 및 EP0120694에 교시되어 있다.

[0171] 동일한 패밀리 및/또는 동일한 패밀리 구성원으로부터 적합한 프레임워크 영역 후보를 선별한 후, 기원 종의 CDR을 하이브리드 프레임워크 영역에 이식하는 방식으로 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 모두가 생성된다. 상기 양태 중 어느 하나와 관련하여 하이브리드 가변 사슬 영역을 갖는 하이브리드 항체 또는 하이브리드 항체 단편의 조립은 당업자에게 알려진 통상적인 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 하이브리드 가변 도메인(즉, 표적 중 기원의 프레임워크와 기원 종의 CDR)을 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성 및/또는 PCR을 통해 생성될 수 있다. CDR 영역을 인코딩하는 핵산은 또한 적합한 제한 효소를 사용하여 기원 종 항체로부터 단리되고, 적합한 절찰 효소를 이용한 절찰을 통해 표적 중 프레임워크에 절찰될 수 있다. 대안적으로, 기원 종 항체의 가변 사슬의 프레임워크 영역은 부위 지정 돌연변이유발에 의해 변경될 수 있다.

[0172] 하이브리드는 각각의 프레임워크 영역에 상응하는 다수의 후보 중에서의 선택을 통해 작제되기 때문에, 본원에 기재된 원리에 따라 작제할 수 있는 다수의 서열 조합이 존재한다. 따라서, 개별 프레임워크 영역의 상이한 조합을 갖는 구성원을 갖는 하이브리드의 라이브러리가 조립될 수 있다. 이러한 라이브러리는 서열의 전자 데이터베이스 수집물 또는 하이브리드의 물리적 수집물일 수 있다.

[0173] 이러한 과정은 전형적으로 이식된 CDR을 플랭킹하는 수용체 항체의 FR을 변경시키지 않는다. 하지만, 당업자는 때때로 소정의 FR의 특정 잔기를 대체하여 FR을 공여체 항체의 상응하는 FR에 더 유사하게 만드는 방식으로 생성된 항-HER2 CDR 이식된 항체의 항원 결합 친화도를 개선시킬 수 있다. 치환의 적합한 위치는 CDR에 인접하

나, CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호, 특히 컬럼 12 내지 16 참조). 또는, 당업자는 공여체 FR에서 시작하여, 이를 수용체 FR 또는 인간 공통 FR과 더 유사하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형을 만드는 기술은 당업계에 알려져 있다. 특히, 생성된 FR이 해당 위치에 대한 인간 공통 FR에 맞거나, 이러한 공통 FR에 적어도 90% 이상 동일한 경우, 상기와 같이 하는 것은 완전 인간 FR을 갖는 동일한 항체와 비교하여 생성된 변형된 항-HER2 CDR 이식된 항체의 항원성을 유의하게 증가시키지 않을 수 있다.

[0174] 이중특이적 항체(BsAb). 이중특이적 항체는, 별개의 구조를 갖는 2개의 표적, 예를 들어 2개의 상이한 표적 항원, 동일한 표적 항원 상의 2개의 상이한 에피토프, 또는 합텐과 표적 항원 또는 표적 항원 상의 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. BsAb는, 예를 들어 동일하거나 상이한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 및/또는 경쇄를 조합하는 방식으로 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자 기능에 따라, 이중특이적 결합체는 2개의 결합 아암(하나의 VH/VL 쌍) 중 하나 상의 하나의 항원(또는 에피토프)에 결합하고, 제2 아암(상이한 VH/VL 쌍) 상의 상이한 항원(또는 에피토프)에 결합한다. 이러한 정의에 따르면, 이중특이적 결합체는 (특이성 및 CDR 서열 둘 모두에서) 2개의 별개의 항원 결합 아암을 갖고, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 1가이다.

[0175] 이중특이적 항체(BsAb) 및 이중특이적 항체 단편(BsFab)과 같은 다중특이적 항체는, 예를 들어 HER2에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 아암과, 제2 표적 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 다른 아암을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제2 표적 항원은 B세포, T세포, 골수세포, 형질세포 또는 비만세포의 항원 또는 에피토프이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 특정 실시형태에서, 제2 표적 항원은 CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, TCR 감마/텔타, Nkp46 및 KIR로 이루어지는 군에서 선택된다. 제2 표적 항원(예를 들어, CD3)에 결합하는 예시적인 V_H 서열과 V_L 서열은 도 3에 제시되어 있다(LC 서열에 포함되어 있음). 특정 실시형태에서, BsAb는 세포 표면 상에서 HER2 항원을 발현하는 종양 세포에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, BsAb는 세포독성 T세포를 종양 부위로 지시(또는 동원)하는 방식으로 종양 세포의 사멸을 용이하게 하도록 조작되었다. 다른 예시적인 BsAb에는, HER2에 특이적인 제1 항원 결합 부위와, 소분자 합텐(예를 들어, DTP A, IMP288, DOTA, DOTA-Bn, DOTA-테스페리옥사민, 본원에 기재된 다른 DOTA-킬레이트, 비오틴, 플루오레세인, 또는 문헌[Goodwin, D A. *et al.*, 1994, *Cancer Res.* 54(22):5937-5946]에 기재된 것들)에 특이적인 제2 항원 결합 부위를 갖는 것들이 포함된다.

[0176] 다양한 이중특이적 융합 단백질이 분자 조작을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 전체 면역글로불린 프레임워크(예를 들어, IgG), 단일 사슬 가변 단편(scFv) 또는 이들의 조합을 이용하여 BsAb가 작제되었다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 융합 단백질은, 예를 들어 하나의 항원에 대한 단일 결합 부위를 갖는 scFv와 제2 항원에 대한 단일 결합 부위를 갖는 Fab 단편을 포함하는 2가이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 융합 단백질은, 예를 들어 하나의 항원에 대한 단일 결합 부위를 갖는 scFv와 제2 항원에 대한 단일 결합 부위를 갖는 또 다른 scFv 단편을 포함하는 2가이다. 다른 실시형태에서, 이중특이적 융합 단백질은, 예를 들어 하나의 항원에 대한 2개의 결합 부위와 제2 항원에 대한 2개의 동일한 scFv를 갖는 면역글로불린(예를 들어, IgG)을 포함하는 4가이다. 2개의 scFv 단위가 직렬로 구성된 BsAb가 임상적으로 성공적인 이중특이적 항체 형식인 것으로 확인되었다. 일부 실시형태에서, BsAb는, 종양 항원(예를 들어, HER2)에 결합하는 scFv가 (예를 들어, CD3에 결합하는 방식으로) T세포와 결합하는 scFv에 연결되도록 직렬로 설계된 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다. 이러한 방식으로, T세포는 종양 세포의 세포독성 사멸을 매개할 수 있도록 종양 부위에 동원된다. 예를 들어, 문헌[Dreier *et al.*, *J. Immunol.* 170:4397-4402 (2003)]; 문헌[Bargou *et al.*, *Science* 321:974- 977 (2008)] 참조. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 BsAb는, 종양 항원(예를 들어, HER2)에 결합하는 scFv가 소분자 DOTA 합텐과 결합하는 scFv에 연결되도록 직렬로 설계된 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한다.

[0177] BsAb를 생산하는 최신 방법은, 더 흔한 면역글로불린 아이소타입보다 더 강하게 가교결합하도록 추가의 시스템인 잔기를 갖는 조작된 재조합 단클론 항체를 포함한다. 예를 들어, 문헌[FitzGerald *et al.*, *Protein Eng.* 10(10):1221-1225 (1997)] 참조. 또 다른 접근법은 필요한 이중 특이성을 갖는 2개 이상의 상이한 단일 사슬 항체 또는 항체 단편 분절을 연결하는 재조합 융합 단백질을 조작하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Coloma *et al.*, *Nature Biotech.* 15:159-163 (1997)] 참조. 다양한 이중특이적 융합 단백질이 분자 조작을 사용하여 생산될 수 있다.

[0178] 2개 이상의 상이한 단일 사슬 항체 또는 항체 단편을 연결하는 이중특이적 융합 단백질이 유사한 방식으로 생산된다. 재조합 방법을 사용하여 다양한 융합 단백질을 생산할 수 있다. 일부 특정 실시형태에서, 본 발명의 기술에 따른 BsAb는 중쇄와 경쇄, 및 scFv를 포함하는 면역글로불린을 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, scFv는

본원에 개시된 임의의 HER2 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결된다. 일부 특정 실시형태에서, scFv는 본원에 개시된 임의의 HER2 면역글로불린의 경쇄의 C-말단에 연결된다. 다양한 실시형태에서, scFv는 링커 서열을 통해 중쇄 또는 경쇄에 연결된다. 중쇄 Fd의 scFv에의 인프레임 연결에 필요한 적절한 링커 서열이 PCR 반응을 통해 V_L 도메인과 $V_{H\text{카}}$ 도메인에 도입된다. 이어서, scFv를 인코딩하는 DNA 단편이 CH1 도메인을 인코딩하는 DNA 서열을 함유하는 스테이징(staging) 벡터에 결합된다. 생성된 scFv-CH1 작제물은 절단되어, HER2 항체의 V_H 영역을 인코딩하는 DNA 서열을 함유하는 벡터에 결합된다. 생성된 벡터는 이중특이적 융합 단백질의 발현을 위해 포유류 세포와 같은 적절한 숙주세포를 트랜스펙션하는 데 사용될 수 있다.

[0179] 일부 실시형태에서, 링커의 길이는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개 또는 그 이상의 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 링커는 강성의 3차원 구조를 채택하지 않지만, 폴리펩타이드(예를 들어, 제1 및/또는 제2 항원 결합 부위)에 가요성을 제공하는 경향이 있는 것을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 링커는, 예를 들어 안정성의 증가와 같은 BsAb에 부여된 특정한 특성에 기반하여 본원에 기재된 BsAb에 이용된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 BsAb는 G_4S 링커를 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 본 발명의 기술의 BsAb는 $(G_4S)_n$ 링커(여기서, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 그 이상임)를 포함한다.

[0180] *Fc 변형*. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 변이체 Fc 영역을 포함하며, 여기서 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 Fc 영역(또는 모 Fc 영역)에 비해 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하여, 상기 분자가 Fc 수용체(예를 들어, $Fc\gamma R$)에 대해 변경된 친화도를 갖게 하지만, 상기 변이체 Fc 영역은 문헌[Sondermann *et al.*, *Nature*, 406:267-273 (2000)]에 개시된 바와 같이 Fc-Fc 수용체 상호작용의 결정학적 및 구조적 분석에 기반하여 Fc 수용체와 직접 접촉하는 위치에 치환을 갖지 않는다. $Fc\gamma R$ 과 같은 Fc 수용체와 직접 접촉하는 Fc 영역 내 위치의 예에는, 234번 내지 239번 아미노산(힌지 영역), 265번 내지 269번 아미노산(B/C 루프), 297번 내지 299번 아미노산(C7E 루프), 및 327번 내지 332번 아미노산(F/G 루프)이 포함된다.

[0181] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 변이체 Fc 영역을 갖는 활성화 및/또는 저해 수용체에 대해 변경된 친화도를 가지며, 여기서 상기 하나 이상의 아미노산 변형은 알라닌으로의 N297 치환 또는 알라닌으로의 K322 치환이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 HER2 항체의 Fc 영역은 $Fc\gamma RIIa$ 결합을 제거하기 위해 2개의 아미노산 치환, Leu234Ala 및 Leu235Ala(소위 LALA 돌연변이)를 포함한다. LALA 돌연변이는 통상적으로 T세포에서 사이토카인 유도를 완하시켜 항체의 독성을 감소시키는 데 사용된다(문헌[Wines BD, *et al.*, *J Immunol* 164:5313-5318 (2000)]).

[0182] *글리코실화 변형*. 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 모 Fc 영역과 비교하여 글리코실화 변형을 갖는 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시형태에서, 글리코실화 변형은 푸코오스의 부재를 포함하며; 일부 실시형태에서, 글리코실화 변형은 GnT1 결핍 CHO 세포에서의 발현에서 기인한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항체는 항체의 기능성, 예를 들어 항원에 대한 결합 활성을 변경시키지 않으면서, 관심 항원(예를 들어, HER2)에 결합하는 적절한 참조 항체에 비해 변형된 글리코실화 부위를 가질 수 있다. 본원에 사용된 "글리코실화 부위"는 올리고당(즉, 함께 연결된 2개 이상의 단순당을 함유하는 탄수화물)이 특이적으로 및 공유결합으로 부착되는 항체 내 임의의 특정 아미노산 서열을 포함한다.

[0184] 올리고당 측쇄는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결을 통해 항체의 백본에 연결된다. N-연결된 글리코실화는 아스파라긴 잔기의 측쇄에 올리고당 모이어티가 부착된 것을 나타낸다. O-연결된 글리코실화는 히드록시아미노산, 예를 들어 세린, 트레오닌에 올리고당 모이어티가 부착된 것을 나타낸다. 예를 들어, 푸코오스 및 말단 N-아세틸글루코사민을 포함하는 특정 올리고당이 결합된 Fc-당형태(glycoform)(hHER2-IgG1n)는 특정 CHO 세포에서 생산될 수 있으며, 증강된 ADCC 이펙터 기능을 나타낼 수 있다.

[0185] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역글로불린 관련 조성물의 탄수화물 함량은 글리코실화 부위를 부가하거나 결실시키는 방식으로 변형된다. 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법은 당업계에 널리 알려져 있으며, 본 발명의 기술 내에 포함된다(미국 특허 제6,218,149호; 유럽 특허 EP 0359096B1호; 미국 특허출원 공개공보 US 2002/0028486호; 국제 특허출원 공개공보 WO 03/035835호; 미국 특허출원 공개공보 2003/0115614호; 미국 특허 제6,218,149호; 미국 특허 제6,472,511호(상기 문헌들은 모두 그 전문이 본원에 참조로 인용됨) 참조). 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 관련 부분 또는 구성요소)의 탄수화물 함량은 항체의 하나 이상의 내인성 탄수화물 모이어티를 결실시키는 방식으로 변형된다. 일부 특정 실시형태에서, 본 발명의 기술은 297번 위치를 아스파라

긴에서 알라닌으로 변형시키는 방식으로 항체의 Fc 영역의 글리코실화 부위를 결실시키는 것을 포함한다.

[0186] 조작된 당형태는, 비제한적으로, 이펙터 기능을 증강시키거나 감소시키는 것을 포함하는 다양한 목적에 유용할 수 있다. 조작된 당형태는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해, 예를 들어 조작된 또는 변이체 발현 균주를 사용하거나, 하나 이상의 효소, 예를 들어 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III(GnTIII)를 이용하여 공동 발현시키거나, 다양한 유기체 또는 다양한 유기체의 세포주에서 Fc 영역을 포함하는 분자를 발현시키거나, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 후 탄수화물(들)을 변형시키는 방식으로 생성될 수 있다. 조작된 당형태를 생성하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 이에는, 비제한적으로, 문헌[Umana *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17: 176-180]; 문헌[Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 74:288-294]; 문헌[Shields *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740]; 문헌[Shinkawa *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473]; 미국 특허 제 6,602,684호; 미국 특허출원 제10/277,370호; 미국 특허출원 제10/113,929호; 국제 특허출원 공개공보 WO 00/61739A1호; WO 01/292246A1호; WO 02/311140A1호; WO 02/30954A1호; POTILLEGENT™ 기술(Biowa, Inc. Princeton, N.J.); GLYCOMAB™ 글리코실화 조작 기술(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)이 포함되며; 상기 문헌들은 각각 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 예를 들어, 국제 특허출원 공개공보 WO 00/061739호; 미국 특허출원 공개공보 제2003/0115614호; 문헌[Okazaki *et al.*, 2004, *JMB*, 336: 1239-49] 참조.

[0187] **융합 단백질.** 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 융합 단백질이다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는, 제2 단백질에 융합될 때, 항원성 태그로 사용될 수 있다. 폴리펩타이드에 융합될 수 있는 도메인의 예에는, 이중 신호 서열뿐 아니라, 다른 이중 기능성 영역이 포함된다. 융합은 반드시 직접적인 필요는 없지만, 링커 서열을 통해 일어날 수 있다. 나아가, 본 발명의 기술의 융합 단백질은 또한 항-HER2 항체의 특징을 개선시키기 위해 조작될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포로부터의 정제, 또는 후속 취급 및 저장 동안 안정성과 지속성을 개선시키기 위해, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 항-HER2 항체의 N-말단에 추가될 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하기 위해 펩타이드 모이어티가 항-HER2 항체에 추가될 수 있다. 이러한 영역은 항-HER2 항체의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 폴리펩타이드의 취급을 용이하게 하기 위한 펩타이드 모이어티의 부가는 당업계에서 친숙하고 통상적인 기술이다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 융합된 폴리펩타이드의 정제를 용이하게 하는 펩타이드와 같은 마커 서열에 융합될 수 있다. 선택된 실시형태에서, 마커 아미노산 서열은 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif)에 제공된 태그와 같은 헥사히스티딘 펩타이드이며, 이들 중 다수는 상업적으로 입수 가능하다. 문헌[Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824, 1989]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 헥사히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 또 다른 펩타이드 태그인, "HA" 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유도된 에피토프에 해당한다. 문헌[Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767, 1984].

[0188] 따라서, 이러한 상기 융합 단백질 중 임의의 것은 본 발명의 기술의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 사용하여 조작될 수 있다. 또한, 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 융합 단백질은 감소된 생체내 반감기를 나타낸다.

[0189] 디설파이드 결합된 이량체 구조(IgG로 인해)를 갖는 융합 단백질은 단량체성 분비 단백질 또는 단백질 단편 단독에 비해 다른 분자와 결합하고 이를 중화시키는 데 더 효율적일 수 있다. 문헌[Fountoulakis *et al.*, *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995].

[0190] 유사하게, EP-A-0 464 533(캐나다 대응특허 제2045869호)에는, 또 다른 인간 단백질 또는 이의 단편과 함께 면역글로불린 분자의 불변 영역의 다양한 부분을 포함하는 융합 단백질이 개시되어 있다. 다수의 경우, 융합 단백질 내 Fc 부분은 치료 및 진단에 유익하기 때문에, 예를 들어 개선된 약동학적 특성을 유도할 수 있다. EP-A 0232 262 참조. 대안적으로, 융합 단백질이 발현, 검출 및 정제된 후 Fc 부분을 결실시키거나 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질이 면역화를 위한 항원으로 사용되는 경우, Fc 부분은 치료 및 진단을 방해할 수 있다. 신약 개발에서, 예를 들어 hIL-5의 안타고니스트를 식별하기 위한 고속처리 스크리닝 검정을 위해 hIL-5와 같은 인간 단백질을 Fc 부분과 융합시켰다. 문헌[Bennett *et al.*, *J. Molecular Recognition* 8: 52-58, 1995]; 문헌[Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471, 1995].

[0191] **표지된 항-HER2 항체.** 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 표지 모이어티, 즉, 검출 가능한 기와 커플링되어 있다. 항-HER2 항체에 접합된 특정 표지 또는 검출 가능한 기는, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 HER2 단백질에의 특이적 결합을 유의하게 방해하지 않는 한 기술의 중요한 측면이 아니다. 검출 가능한 기는 검출 가능한 물리적 또는 화학적 특성을 갖는 임의의 물질일 수 있다. 이러한 검출 가능한 표지는 면역검정

및 이미지화 분야에서 널리 개발되었다. 일반적으로, 이러한 방법에 유용한 거의 모든 표지는 본 발명의 기술에 적용 가능하다. 따라서, 표지는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출 가능한 임의의 조성물이다. 본 발명의 기술의 실시예에 유용한 표지에는, 자기 비드(예를 들어, Dynabeads™), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드(Texas red), 로다민 등), 방사성표지(예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 미세기포(microbubble)(초음파 이미지화용), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{89}Zr (양전자 방출 단층촬영용), $^{90\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In (단일 광자 방출 단층촬영용)와 같은 다른 조영제, 효소(예를 들어, 홀스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼리성 포스페이트, 및 ELISA에서 통상적으로 사용되는 다른 것들), 및 콜로이드 금, 또는 유색 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드와 같은 비색검출용 표지가 포함된다. 이러한 표지의 사용을 설명한 특허에는, 미국 특허 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호; 및 제4,366,241호가 포함되며, 상기 문헌들은 각각 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 또한, 문헌[Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.)] 참조.

[0192] 표지는 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 검정의 목적하는 구성요소에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 상기 제시된 바와 같이, 필요한 민감도, 화합물과의 접합 용이성, 안정성 요건, 이용 가능한 기기 및 폐기 조향과 같은 요인에 따라 표지를 선택하는 방식으로 다양한 표지가 사용될 수 있다.

[0193] 비방사성 표지는 종종 간접적 수단을 통해 부착된다. 일반적으로, 리간드 분자(예를 들어, 비오틴)는 분자에 공유결합으로 결합된다. 이어서, 리간드는 본질적으로 검출 가능하거나, 검출 가능한 효소, 형광 화합물 또는 화학발광 화합물과 같은 신호 시스템에 공유결합으로 결합된 항-리간드(예를 들어, 스트렙타비딘) 분자에 결합한다. 다수의 리간드와 항-리간드가 사용될 수 있다. 리간드가 천연 항-리간드, 예를 들어 비오틴, 티록신 및 코르티솔을 갖는 경우, 이는 표지된 자연 발생 항-리간드와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 임의의 합텐성 또는 항원성 화합물이 항체, 예를 들어 항-HER2 항체와 조합으로 사용될 수 있다.

[0194] 분자는 또한, 예를 들어 효소 또는 형광단과의 접합에 의해 신호 생성 화합물에 직접 접합될 수 있다. 표지로서 관심있는 효소는 주로 히드롤라아제, 특히 포스파타아제, 에스테라아제 및 글리코시다아제, 또는 옥시도리덕타아제, 특히 퍼옥시다아제일 것이다. 모이어티를 표지하는 데 유용한 형광 화합물에는, 비제한적으로, 예를 들어 플루오레세인과 이의 유도체, 로다민과 이의 유도체, 단실, 움벨리페론 등이 포함된다. 모이어티를 표지하는 데 유용한 화학발광 화합물에는, 비제한적으로, 예를 들어 루시페린, 및 2,3-디히드로프탈라진디온, 예를 들어 루미놀이 포함된다. 사용될 수 있는 다양한 표지 또는 신호 생성 시스템에 대한 검토를 위해, 미국 특허 제 4,391,904호를 참조한다.

[0195] 표지를 검출하는 수단은 당업자에게 널리 알려져 있다. 따라서, 예를 들어 표지가 방사성 표지인 경우, 검출 수단은 자가방사선촬영술(autoradiography)에서와 같이 섬광 계수기 또는 사진 필름을 포함한다. 표지가 형광 표지인 경우, 이는 적절한 파장의 광으로 형광색소를 여기시키고, 생성된 형광을 검출하는 방식으로 검출될 수 있다. 형광은 시각적으로, 사진 필름을 통해, 전하 결합 소자(CCD: charge coupled device) 또는 광전자증배관과 같은 전자 검출기를 사용하는 것과 같은 방식으로 검출될 수 있다. 유사하게, 효소 표지는 효소에 대한 적절한 기질을 제공하고, 생성된 반응 산물을 검출하는 방식으로 검출될 수 있다. 최종적으로, 간단한 비색검출용 표지는 표지와 관련된 색상을 관찰하는 방식으로 간단하게 검출될 수 있다. 따라서, 다양한 덤스틱 검정에서, 접합된 금은 종종 분홍색으로 나타나지만, 다양한 접합된 비드는 비드의 색상으로 나타난다.

[0196] 일부 검정 형식은 표지된 구성요소의 사용을 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 표적 항체, 예를 들어 항-HER2 항체의 존재를 검출하는 데 응집반응 검정이 사용될 수 있다. 이러한 경우, 항원 코팅된 입자는 표적 항체를 포함하는 샘플에 의해 응집된다. 이러한 형식에서, 어떠한 구성요소도 표지될 필요가 없으며, 표적 항체의 존재는 간단한 육안 검사로 검출된다.

[0197] B. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 식별 및 특징분석

[0198] 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 식별하고/하거나 스크리닝하는 방법. HER2 단백질에 대해 목적하는 특이성을 갖는 것들(예를 들어, GenBank: NP 004439.2(서열번호 84)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드와 같은 HER2 단백질의 세포외 도메인에 결합하는 것들)에 대해 HER2 폴리펩타이드에 대한 항체를 식별하고 스크리닝하는 데 유용한 방법에는, 당업계에 알려진 임의의 면역화적 매개 기술이 포함된다. 면역반응 구성요소는 당업자에게 널리 알려진 다양한 방법에 의해 시험관내에서 검출될 수 있다. 예를 들어, (1) 세포독성 T 림프구를 방사성 표지된 표적세포와 함께 인큐베이션하여, 이러한 표적세포의 용해를 방사능 방출에 의해 검출할 수 있음;

(2) 헬퍼 T 림프구를 항원 및 항원 제시 세포와 함께 인큐베이션하여, 표준 방법으로 사이토카인의 합성과 분비를 측정할 수 있음(문헌[Windhagen A *et al.*, *Immunity*, 2: 373-80, 1995]); (3) 항원 제시 세포를 전체 단백질 항원과 함께 인큐베이션하여, T 림프구 활성화 검정 또는 생물물리적 방법으로 MHC 상의 항원의 제시를 검출할 수 있음(문헌[Harding *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989]); (4) 비만세포를 Fc-엡실론 수용체와 가교결합하는 시약과 함께 인큐베이션하여, 효소 면역검정으로 히스타민 방출을 측정할 수 있음(문헌[Siraganian *et al.*, *TIPS*, 4: 432-437, 1983]); 및 (5) 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA).

- [0199] 유사하게, 모델 유기체(예를 들어, 마우스) 또는 인간 대상에서의 면역반응의 산물이 또한 당업자에게 널리 알려진 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, (1) 임상 실험실에서 현재 사용되는 표준 방법, 예를 들어 ELISA를 통해 백신접종에 대한 항체 생산을 용이하게 검출할 수 있음; (2) 피부의 표면에 스크래치를 생성하고, 이동하는 세포를 스크래치 부위 상에 포획하기 위해 멸균 용기를 배치하는 방식으로 염증 부위의 면역 세포의 이동을 검출할 수 있음(문헌[Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988]); (3) ³H-티미딘을 사용하여 미토겐 또는 혼합 림프구 반응에 대한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 증식을 측정할 수 있음; (4) PBMC를 표지된 입자와 함께 웰에 위치시키는 방식으로 PBMC에서 과립구, 대식세포 및 다른 포식세포의 식세포능을 측정할 수 있음(문헌[Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988]); 및 (5) PBMC를 CD4 및 CD8과 같은 CD 분자에 대한 항체로 표지하고, 이러한 마커를 발현하는 PBMC의 분율을 측정하는 방식으로 면역계 세포의 분화를 측정할 수 있음.
- [0200] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 복제 가능한 유전자 패키지의 표면 상에의 HER2 펩타이드의 디스플레이를 사용하여 선별된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,514,548호; 제5,837,500호; 제5,871,907호; 제5,885,793호; 제5,969,108호; 제6,225,447호; 제6,291,650호; 제6,492,160호; 유럽 특허 EP 585 287호; EP 605522호; EP 616640호; EP 1024191호; EP 589 877호; EP 774 511호; EP 844 306호 참조. 목적하는 특이성을 갖는 결합 분자를 인코딩하는 파지미드 계통을 함유하는 사상 박테리오파지 입자를 생산/선별하는 데 유용한 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 유럽 특허 EP 774 511호; 미국 특허 제5871907호; 제5969108호; 제6225447호; 제6291650호; 제6492160호 참조.
- [0201] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 효모 숙주세포의 표면 상에의 HER2 펩타이드의 디스플레이를 사용하여 선별된다. 효모 표면 디스플레이에 의한 scFv 폴리펩타이드의 단리에 유용한 방법은 문헌[Kieck *et al.*, *Protein Eng.* 1997 Nov; 10(11): 1303-10]에 기재되어 있다.
- [0202] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 리보솜 디스플레이를 사용하여 선별된다. 리보솜 디스플레이를 사용하여 펩타이드 라이브러리에서 리간드를 식별하는 데 유용한 방법은 문헌[Mattheakis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9022-26, 1994]; 및 문헌[Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937-42, 1997]에 기재되어 있다.
- [0203] 특정 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 HER2 펩타이드의 tRNA 디스플레이를 사용하여 선별된다. tRNA 디스플레이를 사용하여 리간드를 시험관내에서 선별하는 데 유용한 방법은 문헌[Merryman *et al.*, *Chem. Biol.*, 9: 741-46, 2002]에 기재되어 있다.
- [0204] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 RNA 디스플레이를 사용하여 선별된다. RNA 디스플레이 라이브러리를 사용하여 펩타이드와 단백질을 선별하는 데 유용한 방법은 문헌[Roberts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-302, 1997]; 및 문헌[Nemoto *et al.*, *FEBS Lett.*, 414: 405-8, 1997]에 기재되어 있다. 비천연 RNA 디스플레이 라이브러리를 사용하여 펩타이드와 단백질을 선별하는 데 유용한 방법은 문헌[Frankel *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13: 506-12, 2003]에 기재되어 있다.
- [0205] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 그람 음성 박테리아의 주변 세포질에서 발현되고, 표지된 HER2 단백질과 혼합된다. WO 02/34886 참조. HER2 단백질에 대해 친화성을 갖는 재조합 폴리펩타이드를 발현하는 클론에서, 항-HER2 항체에 결합된 표지된 HER2 단백질의 농도가 증가하여, 세포가 문헌[Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22: 9193-98 2004] 및 미국 특허출원 공개공보 제2004/0058403호에 기재된 바와 같이 나머지 라이브러리에서 단리될 수 있다.
- [0206] 목적하는 항-HER2 항체의 선별 후, 상기 항체는 당업자에게 알려진 임의의 기술, 예를 들어 원핵생물 또는 진핵생물 세포 발현 등에 의해 대량 생산될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 비제한적으로, 항-HER2 하이브리드 항체 또는 단편인 항-HER2 항체는, 기원 중 항체 결합 특이성을 유지하는 데 필요한 CDR, 및 필요한 경우, 가변 영역 프레임워크의 최소 부분(본원에 기재된 기술에 따라 조작됨)이 기원 중 항체에서 유도되고, 항체의 나머지 부분이 본원에 기재된 바와 같이 조작될 수 있는 표적 중 면역글로불린에서 유도되는 항체 중쇄를 인코

당하는 발현 벡터를 작제하는 통상적인 기술을 사용하여, 하이브리드 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하는 방식으로 생산될 수 있다.

[0207] **HER2 결합의 측정.** 일부 실시형태에서, HER2 결합 검정은 HER2 단백질과 항-HER2 항체를 HER2 단백질과 항-HER2 항체 사이의 결합에 적합한 조건 하에서 혼합하고, HER2 단백질과 항-HER2 항체 사이의 결합량을 평가하는 검정 형식을 나타낸다. 결합량을, HER2 단백질의 부재 하에서의 결합량, 비특이적 면역글로불린 조성물의 존재 하에서의 결합량, 또는 둘 모두일 수 있는 적합한 대조군과 비교한다. 결합량은 임의의 적합한 방법으로 평가될 수 있다. 결합 검정 방법에는, 예를 들어 ELISA, 방사면역검정, 섬광 근접 검정, 형광 에너지 전달 검정, 액체 크로마토그래피, 막 여과 검정 등이 포함된다. 항-HER2 항체에 대한 HER2 단백질 결합의 직접적인 측정을 위한 생물물리적 검정은, 예를 들어 핵 자기 공명, 형광, 형광 편광, 표면 플라즈몬 공명(BIACORE 칩) 등이다. 특이적 결합은 당업계에 알려진 표준 검정, 예를 들어 방사성리간드 결합 검정, ELISA, FRET, 면역침강, SPR, NMR(2D-NMR), 질량분석법 등으로 측정된다. 후보 항-HER2 항체의 특이적 결합이 후보 항-HER2 항체의 부재 하에서 관찰된 결합보다 적어도 1% 더 큰 경우, 후보 항-HER2 항체는 본 발명의 기술의 항-HER2 항체로서 유용하다.

[0208] **본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 용도**

[0209] **개발.** 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 HER2 단백질의 국소화 및/또는 정량화와 관련된 당업계에 알려진 방법(예를 들어, 적절한 생리학적 샘플 내 HER2 단백질 수준 측정에서의 사용, 진단 방법에서의 사용, 폴리펩타이드의 이미징에서의 사용 등)에 유용하다. 본 발명의 기술의 항체는 친화성 크로마토그래피 또는 면역침강과 같은 표준 기술에 따라 HER2 단백질을 분리하는 데 유용하다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 생물학적 샘플, 예를 들어, 포유류 혈청 또는 세포 유래의 천연 면역반응성 HER2 단백질뿐 아니라, 숙주 시스템에서 발현된 재조합적으로 생산된 면역반응성 HER2 단백질의 정제를 용이하게 할 수 있다. 나아가, 항-HER2 항체는 면역반응성 폴리펩타이드의 풍부함과 발현 패턴을 평가하기 위해(예를 들어, 혈장, 세포 용해물 또는 세포 상청액에서) 면역반응성 HER2 단백질을 검출하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는, 예를 들어 소정의 치료 요법의 효능을 결정하기 위해, 임상 시험 절차의 일부로서 조직에서 면역반응성 HER2 단백질 수준을 모니터링하는 데 진단적으로 사용될 수 있다. 상기 제시된 바와 같이, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 검출 가능한 물질에 커플링(즉, 물리적으로 연결)시켜 검출을 용이하게 할 수 있다.

[0210] **HER2 단백질의 검출.** 생물학적 샘플에서 면역반응성 HER2 단백질의 존재 또는 부재를 검출하는 예시적인 방법은, 시험 대상에서 생물학적 샘플을 수득하는 단계와, 면역반응성 HER2 단백질의 존재가 생물학적 샘플에서 검출되도록 생물학적 샘플을 면역반응성 HER2 단백질을 검출할 수 있는 본 발명의 기술의 항-HER2 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 검출은 항체에 부착된 검출 가능한 표지를 통해 달성될 수 있다.

[0211] 항-HER2 항체와 관련하여 "표지된"이라는 용어는, 검출 가능한 물질을 항체에 커플링(즉, 물리적으로 연결)시켜 항체를 직접적으로 표지하는 것뿐 아니라, 2차 항체와 같이 직접 표지된 또 다른 화합물과의 반응성에 의해 항체를 간접적으로 표지하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 간접 표지화의 예에는 형광으로 표지된 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 검출하고, 형광으로 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 DNA 탐침을 비오틴으로 말단 표지하는 것이 포함된다.

[0212] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 항-HER2 항체는 하나 이상의 검출 가능한 표지에 접합된다. 이러한 용도를 위해, 항-HER2 항체는 발색, 효소, 방사성동위원소, 동위원소, 형광, 독성, 화학발광, 핵 자기 공명 조영제 또는 다른 표지의 공유결합성 또는 비공유결합성 부착에 의해 검출 가능하게 표지될 수 있다.

[0213] 적합한 발색 표지의 예에는, 디아미노벤지딘과 4-히드록시아조벤젠-2-카르복실산이 포함된다. 적합한 효소 표지의 예에는, 말레이트 데히드로게나아제, 포도구균 뉴클레아제, Δ-5-스테로이드 이소머라아제, 효모-알코올 데히드로게나아제, α-글리세롤 포스페이트 데히드로게나아제, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 피옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제, 아스파라기나아제, 글루코오스 옥시다아제, β-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라아제, 글루코오스-6-포스페이트 데히드로게나아제, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린 에스테라아제가 포함된다.

[0214] 적합한 방사성동위원소 표지의 예에는, ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ac , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd 등이 포함된다. ^{111}In 은 간에 의한 ^{125}I 또는 ^{131}I -표지된 HER2 결합 항체의 탈할로겐화의 문제를 회피하기 때문에 생체내 이미징에 사용되는 예시적인 동위원소이다. 또한, 이러한 동위원소는 이미징에 보다 유리한 감마 방출 에너지를 갖는다(문헌[Perkins *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.* 70:296-301 (1985)]; 문헌[Carasquillo *et al.*, *J. Nucl. Med.* 25:281-287 (1987)]). 예를 들어, 1-(P-이소티

오시아나토벤질)-DPTA를 갖는 단클론 항체에 커플링된 ^{111}In 은 비종양 조직, 특히 간에서 거의 흡수되지 않아, 종양 국소화 특이성을 증강시킨다(문헌[Esteban *et al.*, *J. Nucl. Med.* 28:861-870 (1987)]). 적합한 비방사성 동위원소 표지의 예에는, ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr 및 ^{56}Fe 가 포함된다.

[0215] 적합한 형광 표지의 예에는, ^{152}Eu 표지, 플루오레세인 표지, 이소티오시아네이트 표지, 로다민 표지, 피코에리트린 표지, 피코시아닌 표지, 알로피코시아닌 표지, 녹색 형광 단백질(GFP) 표지, o-프탈알데히드 표지 및 플루오레사민 표지가 포함된다. 적합한 독소 표지의 예에는, 디프테리아 독소, 리신 및 콜레라 독소가 포함된다.

[0216] 화학발광 표지의 예에는, 루미놀 표지, 이소루미놀 표지, 방향족 아크리디늄 에스테르 표지, 이미다졸 표지, 아크리디늄 염 표지, 옥살레이트 에스테르 표지, 루시페린 표지, 루시페라아제 표지 및 에쿠오린 표지가 포함된다. 핵 자기 공명 조영제의 예에는, Gd, Mn 및 철과 같은 중금속 핵이 포함된다.

[0217] 본 발명의 기술의 검출 방법은 시험관내뿐 아니라 생체내 생물학적 샘플에서 면역반응성 HER2 단백질을 검출하는 데 사용될 수 있다. 면역반응성 HER2 단백질의 검출을 위한 시험관내 기술에는, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침강, 방사면역검정 및 면역형광이 포함된다. 나아가, 면역반응성 HER2 단백질의 검출을 위한 생체내 기술은 표지된 항-HER2 항체를 대상에 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항-HER2 항체는 대상에서의 존재 및 위치가 표준 이미지화 기술에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 생물학적 샘플은 시험 대상 유래의 HER2 단백질 분자를 함유한다.

[0218] 면역검정 및 이미지화. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 항체 기반 기술을 사용하여 생물학적 샘플(예를 들어, 인간 혈장)에서 면역반응성 HER2 단백질 수준을 검정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 조직 내 단백질 발현은 전형적인 면역조직학적 방법으로 연구될 수 있다. 문헌[Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985, 1985]; 문헌[Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096, 1987]. 단백질 유전자 발현을 검출하는 데 유용한 다른 항체 기반 방법에는, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 및 방사면역검정(RIA)과 같은 면역검정이 포함된다. 적합한 항체 검정 표지는 당업계에 알려져 있으며, 이에, 글루코오스 옥시다아제와 같은 효소 표지, 요오드(^{125}I , ^{121}I , ^{131}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 트리튬(^3H), 인듐(^{111}In) 및 테크네튬(technetium)(^{99}mTc)과 같은 방사성동위원소 또는 다른 방사능제, 및 플루오레세인, 로다민 및 녹색 형광 단백질(GFP)과 같은 형광 표지뿐 아니라 비오틴이 포함된다.

[0219] 생물학적 샘플에서 면역반응성 HER2 단백질 수준을 검정하는 것에 더하여, 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 HER2의 생체내 이미지화에 사용될 수 있다. 이러한 방법에 유용한 항체에는 X-방사선 촬영, NMR 또는 ESR에 의해 검출 가능한 것들이 포함된다. X-방사선 촬영의 경우, 적합한 표지에는, 검출 가능한 방사선을 방출하지만 대상에게 명백하게 유해하지 않은 바륨 또는 세슘과 같은 방사성동위원소가 포함된다. NMR 및 ESR에 적합한 마커에는 관련 scFv 클론에 대한 영양소를 표지하는 방식으로 항-HER2 항체에 혼입될 수 있는, 듀테륨과 같이 검출 가능한 특징적인 스핀을 갖는 것들이 포함된다.

[0220] 방사성동위원소(예를 들어, ^{131}I , ^{112}In , ^{99}mTc), 방사선비투과 물질, 또는 핵 자기 공명에 의해 검출 가능한 물질과 같은 적절한 검출 가능한 이미지화 모이어티로 표지된 항-HER2 항체가, (예를 들어, 비경구, 피하 또는 복강 내로) 대상에 도입된다. 대상의 크기와 사용되는 이미지화 시스템이 진단적 이미지를 생성하는 데 필요한 이미지화 모이어티의 양을 결정한다고 당업계에서 이해된다. 인간 대상을 위한 방사성동위원소 모이어티의 경우, 주입되는 방사능의 양은 통상적으로 ^{99}mTc 약 5밀리퀴리(millicurie) 내지 20밀리퀴리 범위일 것이다. 이어서, 표지된 항-HER2 항체는 특정 표적 폴리펩타이드를 함유하는 세포의 위치에 축적되게 된다. 예를 들어, 표지된 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 HER2 단백질이 국소화되어 있는 대상의 세포 및 조직에 축적되게 된다.

[0221] 따라서, 본 발명의 기술은 하기 단계를 포함하는 의학적 병태를 진단하는 방법을 제공한다: (a) 개체의 세포 또는 체액에서 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 결합을 측정하는 방식으로 면역반응성 HER2 단백질의 발현을 검정하는 단계와, (b) 샘플에 존재하는 면역반응성 HER2 단백질의 양을 표준 참조물질과 비교하는 단계로서, 여기서 표준물질과 비교한 면역반응성 HER2 단백질 수준의 증가 또는 감소가 의학적 병태를 나타내는 단계.

[0222] 친화성 정제. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 샘플에서 면역반응성 HER2 단백질을 정제하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 고체 지지체 상에 고정된다. 이러한 고체 지지체의 예에는, 폴리카르보네이트와 같은 플라스틱, 아가로스 및 세파로오스와 같은 복합 탄수화물, 폴리아크릴아미드와 같은 아크릴계 수지, 및 라텍스 비드가 포함된다. 이러한 고체 지지체에 항체를 커플링시키는 기술은 당업계에 널리 알려져 있다(문헌

[Weir *et al.*, "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10 (1986)]; 문헌[Jacoby *et al.*, *Meth. Enzym.* 34 Academic Press, N.Y. (1974)]).

- [0223] 항원을 항체 지지체 매트릭스에 결합시키는 가장 간단한 방법은 컬럼에 비드를 수집하고, 항원 용액을 컬럼 아래로 흘려 보내는 방법이다. 이러한 방법의 효율성은 고정된 항체와 항원 사이의 접촉 시간에 따라 달라지며, 이러한 시간은 느린 유속을 사용하여 연장시킬 수 있다. 고정된 항체는 항원이 지나갈 때 이를 포획한다. 대안적으로, 항원 용액을 지지체(예를 들어, 비드)와 혼합하고, 항원과 고정된 항체 사이의 최대 접촉이 가능하도록 슬러리를 회전 또는 진동시키는 방식으로 항원을 항체 지지체 매트릭스와 접촉시킬 수 있다. 결합 반응이 완결된 후, 슬러리를 비드 수집을 위해 컬럼에 통과시킨다. 비드를 적합한 세척 완충액으로 세척한 후, 순수하거나 실질적으로 순수한 항원을 용리시킨다.
- [0224] 관심있는 항체 또는 폴리펩타이드가 비드와 같은 고체 지지체에 접합될 수 있다. 또한, 비드와 같은 제1 고체 지지체를, 목적하는 경우, 폴리펩타이드를 지지체에 접합시키는 본원에 개시된 수단을 포함하는 임의의 적합한 수단을 통해, 제2 비드 또는 다른 지지체일 수 있는 제2 고체 지지체에 접합시킬 수도 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 고체 지지체에 접합시키는 것과 관련하여 본원에 개시된 임의의 접합 방법 및 수단이 또한 제1 지지체를 제2 지지체에 접합시키는 데 적용될 수 있으며, 여기서 제1 고체 지지체와 제2 고체 지지체는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0225] 폴리펩타이드를 고체 지지체에 접합시키기 위해 사용되는 가교제일 수 있는 적절한 링커에는, 지지체의 표면에 존재하는 관능기, 또는 폴리펩타이드, 또는 둘 모두와 반응할 수 있는 다양한 작용제가 포함된다. 가교제로서 유용한 시약에는, 동종이관능성, 및 특히 이종이관능성 시약이 포함된다. 유용한 이관능성 가교제에는, 비제한적으로, *N*-SIAB, 디말레이미드, DTNB, *N*-SATA, *N*-SPDP, SMCC 및 6-HYNIC가 포함된다. 폴리펩타이드와 고체 지지체 사이에 선택적으로 절단 가능한 결합을 제공하기 위해 가교제가 선택될 수 있다. 예를 들어, 3-아미노-(2-니트로페닐)프로피온산과 같은 광 불안정성 가교제가 고체 지지체로부터 폴리펩타이드를 절단하는 수단으로 이용될 수 있다. (문헌[Brown *et al.*, *Mol. Divers*, pp, 4-12 (1995)]; 문헌[Rothschild *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 24:351-66 (1996)]; 및 미국 특허 제5,643,722호). 다른 가교제는 당업계에 널리 알려져 있다. (예를 들어, Wong (1991)의 문헌(상기 참조); 및 Hermanson (1996)의 문헌(상기 참조)).
- [0226] 항체 또는 폴리펩타이드는 카르복시기 관능화된 비드와 폴리펩타이드의 아미노 말단 사이에 형성된 공유결합성 아마이드 결합을 통해, 또는 반대로 아미노기 관능화된 비드와 폴리펩타이드의 카르복시 말단 사이에 형성된 공유결합성 아마이드 결합을 통해 비드와 같은 고체 지지체 상에 고정될 수 있다. 또한, 이관능성 트리틸 링커는 아미노 수지를 통해 수지 상의 아미노기 또는 카르복시기를 통해, 지지체, 예를 들어 Wang 수지와 같은 수지 상의 4-니트로페닐 황성 에스테르에 부착될 수 있다. 이관능성 트리틸 접근법을 사용하는 경우, 폴리펩타이드가 절단되고 제거될 수 있도록 고체 지지체를 포름산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 휘발성 산으로 처리해야 할 필요가 있을 수 있다. 이러한 경우, 폴리펩타이드는 고체 지지체의 웰의 바닥 또는 고체 지지체의 편평한 표면에 비드 없는 패치로 증착될 수 있다. 매트릭스 용액의 첨가 후, 폴리펩타이드는 MS로 탈착될 수 있다.
- [0227] 소수성 트리틸 링커는 또한 휘발성 산 또는 적절한 매트릭스 용액, 예를 들어 3-HPA를 함유하는 매트릭스 용액을 사용하여 폴리펩타이드에서 아미노 결합된 트리틸기를 절단하는 방식으로 산 불안정성 링커로서 이용될 수 있다. 산 불안정성은 또한 변경될 수 있다. 예를 들어, 트리틸, 모노메톡시트리틸, 디메톡시트리틸 또는 트리메톡시트리틸은 폴리펩타이드의 적절한 *p*-치환된 또는 보다 산 불안정한 트리틸아민 유도체로 변경될 수 있으며, 즉, 폴리펩타이드에 트리틸 에테르와 트리틸아민이 결합될 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드는, 예를 들어 소수성 인력을 파괴하거나, 목적하는 경우, 3-HPA와 같은 매트릭스가 산으로 작용하는 전형적인 MS 조건을 포함하는 산성 조건 하에서 트리틸 에테르 또는 트리틸아민 결합을 절단하는 방식으로 소수성 링커로부터 제거될 수 있다.
- [0228] 제1 고체 지지체, 예를 들어 비드를 제2 고체 지지체에 결합하거나, 관심 폴리펩타이드를 고체 지지체에 결합하는 데에는 직각으로 절단 가능한 링커가 또한 유용할 수 있다. 이러한 링커를 사용하면, 지지체로부터 폴리펩타이드의 절단 없이 제1 고체 지지체, 예를 들어 비드를 제2 고체 지지체로부터 선택적으로 절단할 수 있으며; 이후에 폴리펩타이드를 비드에서 절단할 수 있다. 예를 들어, DTT와 같은 환원제를 사용하여 절단될 수 있는 디설파이드 링커는 비드를 제2 고체 지지체에 결합하는 데 이용될 수 있으며, 산 절단 가능한 이관능성 트리틸기는 폴리펩타이드를 지지체에 고정시키는 데 사용될 수 있다. 목적하는 경우, 고체 지지체에 대한 폴리펩타이드의 결합이 먼저 절단될 수 있으며, 예를 들어 제1 지지체와 제2 지지체 사이의 결합은 온전하게 남게 된다. 트리틸 링커는 공유결합성 또는 소수성 접합을 제공할 수 있으며, 접합 특성에 관계없이, 트리틸기는 산성 조건 하에서

쉽게 절단된다.

[0229] 예를 들어, 비드는, 고체 지지체에 대한 비드의 고밀도 결합, 또는 비드에 대한 폴리펩타이드의 고밀도 결합이 촉진되도록 하는 화학적 특성과 길이를 갖도록 선택될 수 있는 연결기를 통해 제2 지지체에 결합될 수 있다. 이러한 연결기는, 예를 들어 "트리형(tree-like)" 구조를 가질 수 있어, 고체 지지체 상의 부착 부위당 다수의 관능기를 제공할 수 있다. 이러한 연결기의 예에는, 폴리리신, 폴리글루탐산, 펜타에리트룰 및 트리스-히드록시아미노메탄이 포함된다.

[0230] 비공유결합성 결합 회합. 비공유결합성 상호작용을 통해, 항체 또는 폴리펩타이드가 고체 지지체에 접합될 수 있거나, 제1 고체 지지체가 또한 제2 고체 지지체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 자성화될 수 있는 강자성 물질로 이루어진 자성 비드는 자성 고체 지지체에 끌릴 수 있고, 자기장의 제거 시 지지체로부터 제거될 수 있다. 대안적으로, 이온성 또는 소수성 모이어티와, 각각, 폴리펩타이드, 예를 들어 부착된 트리틸기를 함유하는 폴리펩타이드, 또는 소수성 특성을 갖는 제2 고체 지지체의 상호작용을 가능하게 할 수 있는 이온성 또는 소수성 모이어티가 고체 지지체에 제공될 수 있다.

[0231] 고체 지지체는 또한 특정 결합 쌍의 구성원을 가질 수 있으며, 따라서 상보적 결합 모이어티를 함유하는 폴리펩타이드 또는 제2 고체 지지체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘으로 코팅된 비드는 내부에 혼입된 비오틴 모이어티를 갖는 폴리펩타이드, 또는 비오틴, 또는 이미노비오틴과 같은 비오틴의 유도체로 코팅된 제2 고체 지지체에 결합될 수 있다.

[0232] 본원에 개시되거나 당업계에 널리 알려진 임의의 결합 구성원이 역전될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 예를 들어 비오틴이 폴리펩타이드 또는 고체 지지체에 혼입될 수 있고, 반대로 아비딘 또는 다른 비오틴 결합 모이어티가, 각각, 지지체 또는 폴리펩타이드에 혼입될 수 있다. 본원에서의 사용을 위해 고려되는 다른 특정 결합 쌍에는, 비제한적으로, 호르몬과 이의 수용체, 효소와 이의 기질, 뉴클레오타이드 서열과 이의 상보적 서열, 특이적으로 상호작용하는 항체와 항원, 및 당업자에게 알려진 다른 이러한 쌍이 포함된다.

[0233] A. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 진단적 용도

[0234] 개괄. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 진단 방법에 유용하다. 이와 같이, 본 발명의 기술은 대상에서 HER2 활성의 진단에 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 임의의 수준의 에피토프 결합 특이성과 HER2 단백질에 대한 매우 높은 결합 친화도를 갖도록 선택될 수 있다. 일반적으로, 항체의 결합 친화도가 높을수록, 표적 폴리펩타이드를 제거하지 않으면서 비특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위해 면역검정에서 더 엄격한 세척 조건이 이용될 수 있다. 따라서, 진단 검정에 유용한 본 발명의 기술의 항-HER2 항체는 통상적으로 약 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} 또는 10^{12} M^{-1} 의 결합 친화도를 갖는다. 나아가, 진단 시약으로 사용되는 항-HER2 항체가 표준 조건 하에서 적어도 12시간, 적어도 5시간 또는 적어도 1시간 내에 평형에 도달하기에 충분한 반응속도 증가율을 갖는 것이 바람직하다.

[0235] 항-HER2 항체는 다양한 표준 검정 형식에서 면역반응성 HER2 단백질을 검출하는 데 사용될 수 있다. 이러한 형식에는, 면역침강, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사면역검정 및 면역측정검정이 포함된다. 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)]; 미국 특허 제 3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,879,262호; 제4,034,074호, 제3,791,932호; 제3,817,837호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 및 제4,098,876호 참조. 생물학적 샘플은 대상의 임의의 조직 또는 체액에서 얻을 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상은 암의 초기 단계에 있다. 하나의 실시형태에서, 암의 초기 단계는 대상에서 얻은 샘플에서 HER2 단백질의 수준 또는 발현 패턴에 의해 결정된다. 특정 실시형태에서, 샘플은 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 양수, 뇌척수액(CSF) 및 생검된 신세포 조직으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0236] 면역측정 또는 샌드위치 검정이 본 발명의 기술의 진단 방법을 위한 하나의 형식이다. 미국 특허 제4,376,110호, 제4,486,530호, 제5,914,241호 및 제5,965,375호 참조. 이러한 검정은 고체상에 고정된 하나의 항체, 예를 들어 항-HER2 항체 또는 항-HER2 항체의 집단과, 용액 중 또 다른 항-HER2 항체 또는 항-HER2 항체의 집단을 사용한다. 전형적으로, 항-HER2 항체 또는 항-HER2 항체 집단의 용액이 표지된다. 항체 집단이 사용되는 경우, 집단은 표적 폴리펩타이드 내 상이한 에피토프 특이성에 결합하는 항체를 함유할 수 있다. 따라서, 고체상 항체와 용액 항체 둘 모두에 동일한 집단이 사용될 수 있다. 항-HER2 단클론 항체가 사용되는 경우, 상이한 결합 특이성을 갖는 제1 HER2 단클론 항체와 제2 HER2 단클론 항체가 고체상과 용액상에 사용된다. 고체상

("포획"으로도 지칭됨) 항체와 용액("검출"로도 지칭됨) 항체를 순서대로 또는 동시에 표적 항원과 접촉시킬 수 있다. 고체상 항체가 먼저 접촉되는 경우, 검정은 정방향 검정으로 지칭된다. 반대로, 용액 항체가 먼저 접촉되는 경우, 검정은 역방향 검정으로 지칭된다. 두 가지 항체가 동시에 표적에 접촉되는 경우, 검정은 동시 검정으로 지칭된다. HER2 단백질과 항-HER2 항체를 접촉시킨 후, 샘플을 통상적으로 약 10분 내지 약 24시간 범위의 기간 동안, 통상적으로 약 1시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 진단 시약으로 사용되는 항-HER2 항체에 특이적으로 결합하지 않은 샘플의 구성요소를 제거하기 위해 세척 단계를 수행한다. 고체상 항체와 용액 항체가 별도의 단계에서 결합되는 경우, 세척은 결합 단계 중 하나 또는 둘 모두 이후에 수행될 수 있다. 세척 후, 전형적으로 표지된 용액 항체의 결합을 통해 고체상에 연결된 표지를 검출하는 방식으로 결합을 정량화한다. 통상적으로, 소정의 항체 쌍 또는 항체 집단과 주어진 반응 조건에 대해, 알려진 농도의 표적 항원을 함유하는 샘플로부터 보정 곡선을 생성한다. 이어서, 보정 곡선(즉, 표준 곡선)에서 내삽하여 시험되는 샘플 내 면역반응성 HER2 단백질의 농도를 판독한다. 평형 상태에서 결합된 표지된 용액 항체의 양으로부터, 또는 평형에 도달하기 전 일련의 시점에서 결합된 표지된 용액 항체의 반응속도 측정을 통해 분석물을 측정할 수 있다. 이러한 곡선의 기울기가 샘플 내 HER2 단백질의 농도 측정치이다.

[0237] 상기 방법에 사용하기에 적합한 지지체에는, 예를 들어 니트로셀룰로오스 막, 나일론 막, 유도체화된 나일론 막, 및 또한 입자, 예컨대 아가로오스, 텍스트란 기반 겔, 덤스틱, 미립자, 미소구체, 자성 입자, 시험관, 마이크로티터 웰, SEPHADEX™(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.) 등이 포함된다. 고정화는 흡착 또는 공유결합 부착에 의해 이루어질 수 있다. 선택적으로, 항-HER2 항체는 아비딘과 같은 표면 결합 링커에 부착하기 위해 비오틴과 같은 링커 분자에 결합될 수 있다.

[0238] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 진단제에 접합된 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 제공한다. 진단제는 방사성 또는 비방사성 표지와 조영제(예컨대, 자기 공명 이미지화, 컴퓨터 단층촬영 또는 초음파용)를 포함할 수 있으며, 방사성 표지는 감마, 베타, 알파, 오거 전자(Auger electron) 또는 양전자 방출 동위원소일 수 있다. 진단제는 항체 모이어티, 즉 항체, 또는 항체 단편 또는 하위단편에 접합되어 투여되는 분자이며, 항원을 함유하는 세포의 위치를 찾는 방식으로 질환을 진단 또는 검출하는 데 유용하다.

[0239] 유용한 진단제에는, 비제한적으로, 방사성동위원소, 염료(예컨대, 비오틴-스트렙타비딘 복합체), 조영제, 형광 화합물 또는 분자, 및 자기 공명 이미지화(MRI)용 증강제(예를 들어, 상자성 이온)이 포함된다. 미국 특허 제 6,331,175호는 MRI 기술과 MRI 증강제에 접합된 항체의 제조를 설명하고 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 참조로 인용된다. 일부 실시형태에서, 진단제는 방사성동위원소, 자기 공명 이미지화에 사용되는 증강제, 및 형광 화합물로 이루어지는 군에서 선택된다. 항체 구성요소에 방사성 금속 또는 상자성 이온을 로딩하기 위해, 이온 결합을 위한 다수의 킬레이트기가 부착된 긴 테일을 갖는 시약과 반응시키는 것이 필요할 수 있다. 이러한 테일은 폴리리신, 다당류, 또는 킬레이트기, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA), 포르피린, 폴리아민, 크라운 에테르, 비스-티오세미카르바존, 폴리옥심 및 이러한 목적에 유용한 것으로 알려진 기타 기가 결합될 수 있는 펜던트기를 갖는 다른 유도체화된 또는 유도체화 가능한 사슬일 수 있다. 킬레이트제는 표준 화학반응을 사용하여 본 발명의 기술의 항체에 커플링될 수 있다. 킬레이트제는 통상적으로 면역반응성의 최소 손실, 및 최소 응집 및/또는 내부 가교결합으로 분자에 결합을 형성할 수 있는 기에 의해 항체에 연결된다. 킬레이트제를 항체에 접합시키는 다른 방법 및 시약은 미국 특허 제 4,824,659호에 개시되어 있다. 특히 유용한 금속-킬레이트제 조합물에는, 방사성 이미지화를 위해 진단용 동위원소와 함께 사용되는, 2-벤질-DTPA, 및 이의 모노메틸 및 시클로헥실 유사체가 포함된다. 상기 동일한 킬레이트제는, 마그네슘, 철 및 가돌리늄과 같은 비방사성 금속과 복합체화되는 경우, 본 발명의 기술의 HER2 항체와 함께 사용될 때, MRI에 유용하다. NOTA(1,4,7-트리아자-시클로노난-N,N',N"-트리아세트산), DOTA 및 TETA(p-브로모아세트아미도-벤질-테트라에틸아민테트라아세트산)과 같은 거대고리 킬레이트제는, 각각, 갈륨, 이트륨 및 구리의 방사성핵종과 같은 다양한 금속 및 방사성금속과 함께 사용된다. 이러한 금속-킬레이트제 복합체는 관심 금속에 맞게 고리 크기를 조정하는 방식으로 안정화될 수 있다. 다른 DOTA 킬레이트제의 예에는, (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂; (ii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂; (iii) DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂; (iv) DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂; (v) DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂; (vi) DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂; (vii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂; (viii) Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH₂; (ix) Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂; (x) Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH₂; (xi) Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂; (xii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂; (xiii)

(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH₂; (xiv) Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂; (xv) (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂; (xvi) Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH₂; (xvii) Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂; (xviii) Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂; 및 (xix) Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂가 포함된다.

[0240] RAIT에 대한 ²²³Ra와 같이 안정적으로 결합하는 핵종에 관심이 있는 거대고리 폴리에테르와 같은 다른 고리 유형 킬레이트제도 고려된다.

[0241] B. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 치료적 용도

[0242] 하나의 양태에서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 HER2 관련 암의 치료에 유용하다. HER2 관련 암의 예에는, 비제한적으로, 유방암, 위암, 골육종, 결합조직형성 소원형세포암, 두경부암의 편평세포 암종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 다형성 교모세포종, 위 접합부 선암종, 위식도 접합부 선암종, 자궁경부암, 타액선암, 연조직 육종, 백혈병, 흑색종, 유잉 육종, 횡문근육종, 신경모세포종, 또는 HER2 수용체를 발현하는 임의의 다른 신생물 조직이 포함된다. 일부 실시형태에서, HER2 관련 암은 고형 종양이다. 이러한 치료는 병리학적으로 높은 수준의 HER2를 갖는 것으로 확인된 환자(예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 진단된 환자), 또는 이러한 병리학적 수준과 관련이 있는 것으로 알려진 질환으로 진단된 환자에서 사용될 수 있다.

[0243] 본 발명의 기술의 조성물은 HER2 관련 암의 치료에 유용한 다른 치료제와 함께 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 기술의 항체 또는 항원 결합 단편은 알킬화제, 백금제, 탁산, 빈카제, 항에스트로겐 약물, 아로마타아제 저해제, 난소 억제제, VEGF/VEGFR 저해제, EGF/EGFR 저해제, PARP 저해제, 세포증식 억제 알칼로이드, 세포독성 항생제, 항대사산물, 내분비/호르몬 작용제, T세포, 비스포스포네이트 요법제, 및 표적화된 생물학적 치료제(예를 들어, US 6306832, WO 2012007137, WO 2005000889, WO 2010096603 등에 기재된 치료용 펩타이드)로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 추가 치료제와 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 화학요법제이다. 특정 화학요법제에는, 비제한적으로, 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 플루오로우라실(fluorouracil)(또는 5-플루오로우라실 또는 5-FU), 메토틱세이트, 에다트렉세이트(edatrexate)(10-에틸-10-테아자-아미노프테린), 티오테파(thiotepa), 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 탁산, 파클리탁셀(paclitaxel), 단백질 결합된 파클리탁셀, 도세탁셀(docetaxel), 비노렐빈(vinorelbine), 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 토레미펜(toremifene), 풀베스트란트(fulvestrant), 겐시타빈(gemcitabine), 이리노테칸(irinotecan), 익사베필론(ixabepilone), 테모졸미드(temozolamide), 토포테칸(topotecan), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 에리불린(eribulin), 무타마이신(mutamycin), 카페시타빈(capecitabine), 아나스트로졸(anastrozole), 엑세메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole), 류프롤리드(leuprolide), 아바렐릭스(abarelix), 부세렐린(buserelin), 고세렐린(goserelin), 메게스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 리세드로네이트(risedronate), 파미드로네이트(pamidronate), 이반드로네이트(ibandronate), 알렌드로네이트(alendronate), 데노수맙(denosumab), 졸레드로네이트(zoledronate), 트라스투주맙(trastuzumab), 티케립(tykerb), 안트라시클린(anthracycline)(예를 들어, 다우노루비신(daunorubicin) 및 독소루비신(doxorubicin)), 베바시주맙(bevacizumab), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 멜팔란(melphalan), 에토포시드(etoposide), 메클로레타민(mechlorethamine), 블레오마이신(bleomycin), 미세소관 독성물질, 번여지과 아세토게닌(annonaceous acetogenin), 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0244] 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항체 또는 항원 결합 단편은, 비제한적으로, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-TIM3 항체, 항-4-1BB 항체, 항-CD73 항체, 항-GITR 항체 및 항-LAG-3 항체를 포함하는 적어도 하나의 추가 면역 조절/자극 항체와 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0245] 본 발명의 기술의 조성물은 선택적으로 이를 필요로 하는 대상에 단일 볼루스로 투여될 수 있다. 대안적으로, 투여 요법은 종양의 출현 후 다양한 시점에 수행되는 다회 투여를 포함할 수 있다.

[0246] 투여는 경구, 비강내, 비경구(정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하), 직장, 경막내, 종양내, 경막내 또는 국소를 포함하는 임의의 적합한 경로를 통해 수행될 수 있다. 투여는 자가 투여와 다른 이에 의한 투여를 포함한다. 또

한, 기재된 바와 같은 의학적 병태의 다양한 치료 방식은 전체적인 치료뿐 아니라 전체보다 적은 치료도 포함하며, 일부 생물학적으로 또는 의학적으로 관련된 결과가 달성되는 "실질적인" 치료를 의미하는 것으로 의도된다는 것을 이해해야 한다.

[0247] 일부 실시형태에서, 본 발명의 기술의 항체는 1회 이상의 용량으로 이를 필요로 하는 대상에 투여될 수 있는 약제학적 제형을 포함한다. 투여 요법은 목적하는 반응(예를 들어 치료 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다.

[0248] 전형적으로, 치료 효과를 달성하는 데 충분한 본 발명의 기술의 항체 조성물의 유효량은, 1일 체중 1 kg당 약 0.000001 mg 내지 1일 체중 1 kg당 약 10,000 mg 범위이다. 전형적으로, 투여량은 1일 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 1일 체중 1 kg당 약 100 mg 범위이다. 항-HER2 항체 투여의 경우, 투여량은 매주, 격주 또는 3주마다 대상 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 100 mg, 및 보다 통상적으로 대상 체중 1 kg당 0.01 mg 내지 5 mg 범위이다. 예를 들어, 투여량은 매주, 격주 또는 3주마다 체중 1 kg당 1 mg 또는 체중 1 kg당 10 mg, 또는 매주, 격주 또는 3주마다 체중 1 kg당 1 mg 내지 10 mg 범위 내일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항체의 단일 투여량은 체중 1 kg당 0.1 μ g 내지 10,000 μ g 범위이다. 하나의 실시형태에서, 담체 중 항체 농도는 0.2 μ g/ml 내지 2000 μ g/ml 범위이다. 예시적인 치료 요법은 격주에 1회, 또는 1개월에 1회, 또는 3개월 내지 6개월에 1회 투여를 포함한다. 항-HER2 항체는 여러 차례 투여될 수 있다. 단일 투여량 사이의 간격은 매시간, 매일, 매주, 매월 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 대상에서 혈중 항체 수준을 측정하여 지시되는 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 대상의 혈청 항체 농도를 약 75 μ g/mL 내지 약 125 μ g/mL, 100 μ g/mL 내지 약 150 μ g/mL, 약 125 μ g/mL 내지 약 175 μ g/mL, 또는 약 150 μ g/mL 내지 약 200 μ g/mL로 달성하도록 조정된다. 대안적으로, 항-HER2 항체는 지속 방출 제형으로 투여될 수 있으며, 이러한 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량과 빈도는 대상에서 항체의 반감기에 따라 달라진다. 투여의 투여량과 반감기는 치료가 예방용인지 치료용인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서, 비교적 적은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 또는 대상이 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자에게 예방적 요법이 투여될 수 있다.

[0249] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상의 생체내에서 암을 검출하는 방법으로서, (a) 본 발명의 기술의 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 유효량을 대상에게 투여하는 단계로서, 여기서 항체는 HER2를 발현하는 암 세포에 국소화되도록 구성되고, 방사성동위원소로 표지된 것인 단계와, (b) 참조 값보다 높은 항체에 의해 방출되는 방사능 수준을 검출하는 방식으로 대상에서 종양의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 참조 값은 그램당 주입된 용량(%ID/g)으로 표시된다. 참조 값은 비종양(정상) 조직에 존재하는 방사능 수준을 측정하고, 비종양(정상) 조직에 존재하는 방사능 수준의 평균 $\pm$ 표준편차를 계산하는 방식으로 계산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 종양 조직과 정상 조직 사이의 방사능 수준의 비는, 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1이다.

[0250] 일부 실시형태에서, 대상은 암으로 진단되거나 암을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상이다. 항체에 의해 방출되는 방사능 수준은 양전자 방출 단층촬영 또는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영을 사용하여 검출될 수 있다.

[0251] 부가적으로 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 상기 방법은 방사성핵종에 접합된 본 발명의 기술의 항체를 포함하는 면역접합체의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방사성핵종은 알파 입자 방출 동위원소, 베타 입자 방출 동위원소, 오거 방출체, 또는 이들의 임의의 조합이다. 베타 입자 방출 동위원소의 예에는, ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu 및 ^{67}Cu 가 포함된다. 알파 입자 방출 동위원소의 예에는, ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At 및 ^{255}Fm 가 포함된다. 오거 방출체의 예에는, ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl 및 ^{203}Pb 가 포함된다. 상기 방법의 일부 실시형태에서, 정상 조직에서의 비특이적 FcR 의존적 결합은 (예를 들어, 비글리코실화(aglycosylation)를 유도하는 Fc 영역 내 N297A 돌연변이를 통해) 제거되거나 감소된다. 이러한 면역접합체의 치료 효과는 곡선하면적(AUC) 종양:AUC 정상 조직의 비를 계산하는 방식으로 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역접합체의 AUC 종양:AUC 정상 조직 비는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1이다.

[0252] 독성. 선택적으로, 본원에 기재된 항-HER2 항체의 유효량(예를 들어, 용량)은 대상에게 실질적인 독성을 유발하

지 않으면서 치료적 유익을 제공할 것이다. 본원에 기재된 항-HER2 항체의 독성은 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 따라, 예를 들어 LD₅₀(집단의 50%에 치명적인 용량) 또는 LD₁₀₀(집단의 100%에 치명적인 용량)를 결정하는 방식으로 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비가 치료 지수이다. 이러한 세포 배양물 검정 및 동물 연구에서 얻은 데이터는 인간에서 사용하기에 독성이 없는 투여량 범위를 정하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 항-HER2 항체의 투여량은 독성이 없거나 거의 없는 유효 용량을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 이용되는 투여 형태와 이용되는 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 대상의 상태를 고려하여 개별 의사가 선택할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Fingl *et al.*, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1 (1975)] 참조.

[0253] **약제학적 조성물의 제형.** 본 발명의 기술의 방법에 따르면, 항-HER2 항체는 투여에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 재조합 또는 실질적으로 정제된 항체와 약제학적으로 허용 가능한 담체를 대상에게 투여하기에 적합한 형태로 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 부분적으로 투여되는 특정 조성물뿐 아니라, 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 따라 결정된다. 따라서, 항체 조성물을 투여하기 위한 약제학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 존재한다(예를 들어, 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990] 참조). 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균되고, 실질적으로 등장성이며, 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)의 모든 우수 의약품 제조 관리 기준(Good Manufacturing Practice: GMP) 규정을 완전히 준수하여 제형화된다. 약제학적 조성물은 동위원소, 염료, 크로마젠, 조영제, 약물, 독소, 사이토키인, 효소, 효소 저해제, 호르몬, 호르몬 안타고니스트, 성장인자, 방사성핵종, 금속, 리포솜, 나노입자, RNA, DNA 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0254] "약제학적으로 허용 가능한", "생리학적으로 용인 가능한"이라는 용어, 및 이들의 문법적 변형은, 이들이 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 나타낼 때, 상호 교환적으로 사용되며, 해당 물질이 조성물의 투여가 금지될 수 있는 정도로 바람직하지 않은 생리학적 효과를 생성하지 않으면서 대상에게 또는 대상에 대해 투여될 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, "약제학적으로 허용 가능한 부형제"는, 일반적으로 안전하고, 비독성이며 바람직한 약제학적 조성물을 제조하는 데 유용한 부형제를 의미하며, 수의과적 용도뿐 아니라 인간의 약제학적 용도에도 허용 가능한 부형제를 포함한다. 이러한 부형제는 고체, 액체, 반고체일 수 있으며, 에어로졸 조성물의 경우에는 기체일 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 염 및 에스테르"는 약제학적으로 허용 가능하며 목적하는 약리학적 특성을 갖는 염 및 에스테르를 의미한다. 이러한 염에는, 조성물에 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있는 경우 형성될 수 있는 염이 포함된다. 적합한 무기 염에는, 알칼리 금속, 예를 들어 소듐, 포타슘, 마그네슘, 칼슘 및 알루미늄으로 형성된 것들이 포함된다. 적합한 유기 염에는, 아민 염기, 예를 들어 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N-메틸글루카민 등과 같은 유기 염기로 형성된 것들이 포함된다. 이러한 염에는 또한, 무기산(예를 들어, 염화수소산 및 브롬화수소산)과 유기산(예를 들어, 아세트산, 시트르산, 말레산, 및 알칸 및 아렌 설폰산(예컨대, 메탄설폰산 및 벤젠설폰산))으로 형성된 산 부가 염이 포함된다. 약제학적으로 허용 가능한 에스테르에는, 항-HER2 항체에 존재하는 카르복시기, 설포닐옥시기 및 포스포녹시기로 형성된 에스테르, 예를 들어 C₁₋₆ 알킬 에스테르가 포함된다. 2개의 산성기가 존재하는 경우, 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 에스테르는 1-산 1-염 또는 에스테르, 또는 2-염 또는 에스테르일 수 있으며; 유사하게 2개 초과 산성기가 존재하는 경우, 이러한 기의 일부 또는 전부는 염화되거나 에스테르화될 수 있다. 이러한 기술에서 명명된 항-HER2 항체는 비염화 또는 비에스테르화된 형태, 또는 염화 및/또는 에스테르화된 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 항-HER2 항체의 명명은 원래(비염화 및 비에스테르화) 화합물과, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 에스테르를 모두 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명의 기술의 특정 실시형태는 하나 초과 입체이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 항-HER2 항체의 명명은 모든 단일 입체이성질체와 이러한 입체이성질체의 모든 혼합물(라세미체이든 아니든)을 포함하는 것으로 의도된다. 당업자는 본 발명의 기술의 특정 약물 및 조성물에 대한 적절한 투여 시기, 순서 및 투여량을 결정하는 데 어려움이 없을 것이다.

[0255] 이러한 담체 또는 희석제의 예에는, 비제한적으로, 물, 식염수, 링거액, 텍스트로오스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민이 포함된다. 리포솜과, 불휘발성 오일과 같은 비수성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질과 화합물의 사용은 당업계에 널리 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 화합물이 항-HER2 항체와 상용 가능하지 않은 경우를 제외하고, 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

- [0256] 본 발명의 기술의 약학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 본 발명의 기술의 항-HER2 항체 조성물은 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 피내, 경피, 직장, 두개내, 척수강내, 복강내, 비강내 또는 근육내 경로로, 또는 흡입제로 투여될 수 있다. 항-HER2 항체는 선택적으로 다양한 HER2 관련 암을 치료하는데 있어서 적어도 부분적으로 효과적인 다른 작용제와 조합으로 투여될 수 있다.
- [0257] 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 구성요소를 포함할 수 있다: 주사용수, 식염수 용액, 불휘발성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균 화합물; 아스코르브산 또는 아황산수소소듐과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 킬레이트 화합물; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제; 및 염화소듐 또는 텍스트로오스와 같은 등장성 조정용 화합물. pH는 염산 또는 수산화소듐과 같은 산 또는 염기를 이용하여 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 1회용 시린지 또는 다회 용량 바이알에 동봉될 수 있다.
- [0258] 주사용으로 적합한 약제학적 조성물에는, 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체에는, 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)가 포함된다. 모든 경우, 조성물은 멸균되어야 하고, 주사 용이성이 존재할 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에틸렌(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균 화합물, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우, 조성물에 등장성 화합물, 예를 들어 당, 폴리알코올, 에센셜 오일, 소르비톨, 염화소듐을 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트와 젤라틴을 조성물에 포함시키는 방식으로 이루어질 수 있다.
- [0259] 멸균 주사 용액은, 필요한 경우, 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합을 갖는 적절한 용매 중에 필요한 양의 본 발명의 기술의 항-HER2 항체를 혼입시킨 후, 멸균 여과하는 방식으로 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 항-HER2 항체를, 기본 분산 매질과 상기 열거된 것들 중에서 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시키는 방식으로 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 활성 성분 + 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 목적하는 임의의 추가 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다. 본 발명의 기술의 항체는 활성 성분의 지속적 또는 박동성 방출을 가능하게 하는 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0260] 경구용 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이는 젤라틴 캡슐에 동봉되거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료적 투여의 경우, 항-HER2 항체는 부형제와 통합되어, 정제, 트로키 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구용 조성물은 또한 구강세정제로 사용하기 위해 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있으며, 여기서 유체 담체 내 화합물은 경구로 적용되고, 가글된 후, 뱉어지거나 삼켜진다. 약제학적으로 적합한 결합 화합물, 및/또는 아췌반트 물질이 또한 조성물의 일부로 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 하기 성분, 또는 유사한 성질의 화합물 중 임의의 것을 함유할 수 있다: 미세결정질 셀룰로오스, 트래거캔스 검 또는 젤라틴과 같은 결합제; 전분 또는 락토오스와 같은 부형제; 알긴산, Primogel 또는 옥수수 전분과 같은 붕해 화합물; 마그네슘 스테아레이트 또는 Sterotes와 같은 윤활제; 콜로이드성 이산화규소와 같은 활택제; 수크로오스 또는 사카린과 같은 감미 화합물; 또는 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향료와 같은 향료 화합물.
- [0261] 흡입에 의한 투여의 경우, 항-HER2 항체는 적합한 추진제, 예를 들어 이산화탄소와 같은 가스를 함유하는 가압 용기 또는 디스펜서, 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다.
- [0262] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단을 통해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 침투하고자 하는 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 알려져 있으며, 이에는, 예를 들어 경점막 투여의 경우, 세제, 담즙산 및 푸시드산 유도체가 포함된다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제를 사용하여 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 항-HER2 항체는 일반적으로 당업계에 알려진 바와 같은 연고, 고약 또는 크림으로 제형화된다.

- [0263] 항-HER2 항체는 또한 좌제 형태(예를 들어, 통상적인 좌제 베이스, 예컨대 코코아 버터 및 다른 글리세리드 포함), 또는 직장 전달용 정제 관장제(retention enemas) 형태의 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.
- [0264] 하나의 실시형태에서, 항-HER2 항체는 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출형 제형과 같이, 항-HER2 항체가 신체로부터 신속하게 제거되는 것을 보호하는 담체를 이용하여 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 물질은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.에서 상업적으로 입수 가능하다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단클론 항체로 감염된 세포를 표적으로 하는 리포솜 포함)이 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체로 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0265] 본원에 개시된 HER2 다중특이적 결합 분자에 결합된 T세포. 임의의 이론에 구애됨 없이, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 절차에 따라 본원에 제공된 항-CD3 다중특이적 결합 분자(예를 들어, HER2 × CD3)가 T세포에 결합되는 경우, 다중특이적 결합 분자의 항-CD3 scFv는 T세포의 표면 상의 CD3에 결합한다. 임의의 이론에 구애됨 없이, T세포에 대한 다중특이적 결합 분자의 결합(즉, T세포 상에서 발현된 CD3에 대한 항-CD3 scFv의 결합)은 T세포를 활성화시켜, 결과적으로 T세포 수용체 기반 세포독성이 MHC 제한을 우회하여 목적하는 종양 표적으로 방향 전환되게 한다.
- [0266] 따라서, 본 개시내용은 또한 본 발명의 기술의 다중특이적 결합 분자에 결합된 T세포를 제공한다. 특정 실시형태에서, T세포는 비공유결합으로 다중특이적 결합 분자에 결합된다. 특정 실시형태에서, T세포는 T세포가 투여되는 대상의 자가 세포이다. 특정 실시형태에서, T세포는 T세포가 투여되는 대상의 동종이계 세포이다. 특정 실시형태에서, T세포는 인간 T세포이다.
- [0267] 특정 실시형태에서, 본 발명의 다중특이적 결합 분자에 결합된 T세포는 본원에 기재된 치료 방법에 따라 사용된다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 다중특이적 결합 분자에 결합된 T세포는 하기 기재되는 바와 같은 병용 요법의 일부로 사용된다.
- [0268] T세포 주입과의 병용 요법을 포함하는 특정 실시형태에서, (a) 본원에 기재된 다중특이적 결합 분자; (b) T세포; 및/또는 (c) 약제학적으로 유효한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, T세포는 T세포가 투여되는 대상의 자가 세포이다. 특정 실시형태에서, T세포는 T세포가 투여되는 대상의 이종이계 세포이다. 특정 실시형태에서, T세포는 다중특이적 결합 분자에 결합되거나 결합되지 않는다. 특정 실시형태에서, 다중특이적 결합 분자에 대한 T세포의 결합은 비공유결합이다. 특정 실시형태에서, T세포는 인간 T세포이다. 다중특이적 결합 분자를 T세포에 결합시키는 데 사용될 수 있는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Lum *et al.*, 2013, *Biol Blood Marrow Transplant*, 19:925-33], 문헌[Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, New York: Garland Science]; 문헌[Vaishampayan *et al.*, 2015, *Prostate Cancer*, 2015:285193] 및 문헌[Stromnes *et al.*, 2014, *Immunol Rev.* 257(1):145-164] 참조.
- [0269] 특정 실시형태에서, 본원에 제공된 다중특이적 결합 분자, 다중특이적 결합 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포, 또는 다중특이적 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는, 환자를 T세포 주입으로 치료한 후에 수행된다. 특정 실시형태에서, T세포 주입은 T세포가 투여되는 대상의 자가 세포인 T세포를 이용하여 수행된다. 특정 실시형태에서, T세포 주입은 T세포가 투여되는 대상의 이종이계 세포인 T세포를 이용하여 수행된다. 특정 실시형태에서, T세포는 본원에 기재된 바와 같은 다중특이적 결합 분자와 동일한 분자에 결합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 다중특이적 결합 분자와 동일한 분자에 대한 T세포의 결합은 비공유결합이다. 특정 실시형태에서, T세포는 인간 T세포이다.
- [0270] C. 키트
- [0271] 본 발명의 기술은 HER2의 검출 및/또는 HER2 관련 암의 치료를 위한 키트로서, 본 발명의 기술의 적어도 하나의 면역글로불린 관련 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편) 또는 이의 기능성 변이체(예를 들어, 치환 변이체)를 포함하는 키트를 제공한다. 선택적으로, 본 발명의 기술의 키트의 상기 기재된 구성요소는 HER2 관련 암의 진단 및/또는 치료를 위해 적합한 용기에 패키징되고 표시된다. 상기 언급된 구성요소는 1회 또는 다회 용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플, 바이알, 병, 시린지 및 시험관에, 바람직하게는 수성 멸균 용액으로, 또는 바람직하게는 재구성을 위한 동결건조된 멸균 제형으로 저장될 수 있다. 키트는 약제학적

조성물을 큰 부피로 희석하는 데 적합한 희석제가 포함된 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 희석제에는, 비제한적으로, 약제학적 조성물의 약제학적으로 허용 가능한 부형제 및 식염수 용액이 포함된다. 나아가, 키트는 약제학적 조성물 희석에 관한 설명서 및/또는 희석 여부에 관계없이 약제학적 조성물 투여에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있으며, 멸균 접근 포트를 포함할 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 키트는 인산염 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로오스 용액과 같은 약제학적으로 허용 가능한 완충액을 포함하는 더 많은 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 하나 이상의 적합한 숙주를 위한 배양 배지를 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로, 예를 들어 이러한 치료용 또는 진단용 제품의 사용에 관한 지시사항, 사용법, 투여량, 제조, 투여, 금기사항 및/또는 주의사항에 대한 정보를 포함하는, 치료용 또는 진단용 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 포함한다.

[0272] 키트는 생물학적 샘플, 예를 들어, 비제한적으로, 혈청, 혈장, 림프, 낭액(cystic fluid), 소변, 대변, 뇌척수액, 복수 또는 혈액을 포함하는 임의의 체액, 및 신체 조직의 생검 샘플에서 면역반응성 HER2 단백질의 존재를 검출하는 데 유용하다. 예를 들어, 키트는 생물학적 샘플에서 HER2 단백질에 결합할 수 있는 본 발명의 기술의 하나 이상의 인간화, 키메라, 이중특이적 또는 다중특이적 항-HER2 항체(또는 이의 항원 결합 단편); 샘플에서 HER2 단백질의 양을 결정하기 위한 수단; 및 샘플 내 면역반응성 HER2 단백질의 양을 표준물과 비교하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 하나 이상의 항-HER2 항체가 표지될 수 있다. 키트 구성요소(예를 들어, 시약)는 적합한 용기에 패키징될 수 있다. 키트는 면역반응성 HER2 단백질을 검출하기 위해 키트를 사용하는 것에 대한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0273] 항체 기반 키트의 경우, 키트는, 예를 들어, 1) 제1 항체, 예를 들어 HER2 단백질에 결합하는 고체 지지체에 부착된 본 발명의 기술의 인간화, 키메라, 이중특이적 또는 다중특이적 HER2 항체(또는 이의 항원 결합 단편)와, 선택적으로 2) HER2 단백질 또는 제1 항체에 결합하고, 검출 가능한 표지에 접합된 제2 상이한 항체를 포함할 수 있다.

[0274] 키트는 또한, 예를 들어 완충제, 보존제 또는 단백질 안정화제를 포함할 수 있다. 키트는 검출 가능한 표지를 검출하는 데 필요한 구성요소, 예를 들어 효소 또는 기질을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 분석되고 시험 샘플과 비교될 수 있는 대조군 샘플 또는 일련의 대조군 샘플을 함유할 수 있다. 키트의 각각의 구성요소는 개별 용기 내에 동봉될 수 있으며, 다양한 용기들은 모두 키트를 사용하여 수행되는 검정 결과를 해석하기 위한 설명서와 함께 단일 패키지 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 기술의 키트는 키트 용기 상에 또는 내에 서면으로 된 제작물을 함유할 수 있다. 서면으로 된 제작물에는, 키트 내에 포함된 시약의 사용 방법, 예를 들어 시험관 내 또는 생체내에서 HER2 단백질을 검출하는 방법, 또는 HER2 관련 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 HER2 관련 암을 치료하는 방법이 설명되어 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 기술의 방법에 따라 시약의 사용이 이루어질 수 있다.

[0275] 실시예

[0276] 본 발명의 기술은 하기 실시예를 통해 추가로 예시되며, 이는 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 하기 실시예는 본 발명의 기술의 예시적인 항-HER2 항체의 제조, 특징분석 및 용도를 설명한다.

[0277] 실시예 1: 도입 및 예비 실험

[0278] 초기 이중특이적 T세포 결합제(TCE: T cell engager)에 대한 활용은 환자에서 T세포 고갈 또는 결핍과 사이토카인 방출에 대한 잠재력이 높은 생물학적 결과를 예상하지 못한 채, 시험관내 세포 기반 검정에 기반하여 세포독성 활성을 최대화시키는 데 주로 초점을 맞춰왔다. 이러한 안전성 문제는 CD3 TCE 안전성 평가에 대한 최근 FDA 후원 워크숍에서 개략되었다(문헌[Kamperschroer *et al.*, *J Immunotoxicol.* 17(1):67-85 (2020)]). 차세대 TCE에는 반감기 연장을 목적으로 한 Fc 또는 기타 유사한 도메인이 포함되지만, 유해사례와 임상 보류는, 고효능 TCE를 이용한 반감기 연장이 신경독성 및 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 관련된 중증 유해사례를 악화시킬 수 있음을 시사한다(문헌[Vafa *et al.*, *Front. Oncol.* 10: 446 (2020)]).

[0279] 현재 표적화 요법에 대한 내성을 극복하기 위한 한 가지 가능성 있는 전략은, BsAb를 이용하는 방식으로 T세포의 사멸 활성을 활용하여 암을 퇴치하는 것이다. 이러한 T세포 결합 항체는 종양 세포 상의 항원과, 공동수용체 CD3과 같은 T세포 활성화제에 동시에 결합하도록 설계되어 있다. T세포의 BsAb 결합은 CD3의 결합을 통해 T세포를 활성화시키고 세포융해성 시냅스를 형성하는 방식으로 종양 세포의 사멸을 매개하여, 구조적적합복합체(MH

C)와 독립적인 방식으로 사멸 활성을 항원 발현 종양 세포로 방향 전환시킨다.

[0280] 트라스투주맙 × huOKT3(ABP100)은, 비제한적으로, 유방암, 위암 및 결장직장암을 포함하는 HER2+ 유형의 암을 앓고 있는 환자를 치료하기 위해 개발된 이중특이적 항체이다. 이러한 분자는 HER2+ 종양에 결합하여 자연 면역 T세포를 종양으로 가져와 종양을 감소시킨다. 이러한 BsAb는 2가지 널리 알려진 분자, 즉, 완전 인간화 HER2 표적화 면역글로불린 G1(IgG1)인 트라스투주맙과, CD3 표적화 IgG1인 인간화 무로모나브(muromonab)-CD3(huOKT3)을 기반으로 한다. ABP100의 핵심적인 특징은, 인간 CD3을 인식하는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이 각각의 항종양 IgG 항체 경쇄의 C-말단에 융합된 대칭 2가 BsAb 플랫폼 IgG-[L]-scFv를 사용하여 작제되었다는 점이다(도 4). 대칭 IgG-[L]-scFv 설계는 다수의 종양 항원(GD2, CD3, GPA33 및 HER2)에 대해 강력한 시험관내 및 생체내 항종양 활성을 제공하였으며, 최근 보고에 따르면, IgG-L-scFv 플랫폼 원자가와 공간 입체배치가 다수의 다른 BsAb 형식보다 실질적으로 더 강력한 항종양 반응을 유도하는 것으로 나타났다(문헌[Santich *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 12: eaax1315 (2020)], 도 5a와 도 5b). CRS의 위험을 감소시키기 위해, 2가지 널리 특징분석된 돌연변이, 즉, 글리코실화를 제거하는 N297A와 보체 활성화를 감소시키는 K322A를 도입하는 방식으로 ABP100의 Fc 도메인 기능을 침묵시켜 잠재적인 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성화와 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 제거하였다.

[0281] 제1 세대 TCE 및 CAR T세포 치료제와 통상적으로 관련이 있는 독성 효과를 제한하기 위해, 주형으로서 상기 기재된 전체 형식의 ABP100에서 출발하는 CD3×HER2 이중특이적 항체 프로그램에 대한 이중 전략이 제안되었다. 이러한 이중 전략의 2가지 산물은 1) 재주입용으로 환자 T세포의 생체의 로딩을 위해 설계된 HER2 고발현 세포를 선택적으로 사멸시키는 HER2 친화도 조정된 BsAb인 ABP100a와, 2) CD3과 HER2에의 결합에 대한 친화도가 이중으로 조정된 아암을 갖는 정맥내 전달용으로 정밀하게 재설계된 BsAb인 ABP102이다(도 4).

[0282] ABP100a는 ABP100의 huOKT3 부분을 신규한 인간화 huSP34 CD3 결합 아암으로 대체하고, 신규한 친화도 조정된 HER2 결합 아암을 도입하는 방식으로 작제되었다(도 4). 인간화 huSP34 CD3 결합 아암은 비인간 영장류(Cyno) CD3과 교차 반응하기 때문에, 인간에서의 독성을 평가하고 예측하는 데 적합한 모델이 된다. 친화도 조정된 HER2 결합 아암은 ABP100a가 HER2 고발현 세포는 선택적으로 사멸시키지만, HER2를 낮은 내인성 수준으로 발현하는 세포는 그대로 남겨두게 한다. 전임상 모델에서 큰 잠재력을 나타낸 기술인, ABP100a를 환자 유래의 활성화된 T세포에 직접 무장시킬 수 있는 가능성이 탐구될 것이다(도 6). 이러한 접근법은 해리 속도가 낮은 상대적으로 고친화도 CD3 결합 아암을 사용하여 탐구될 예정이며, 사전 활성화된 T세포를 직접 무장시키는 방식으로 CRS 문제를 최소화해야 한다는 점을 염두에 두어야 한다.

[0283] 동시에, ABP102는 인터페론 감마(IFN γ) 및 종양괴사인자 알파(TNF α)와 같은 사이토카인의 T세포 생성이 제한된 HER2 증폭된 암 세포를 강력하게 사멸시키면서, CD3 친화도를 선택하기 위해 CD3 T세포 결합 아암의 친화도를 추가로 조정하는 방식으로 개발되었다. 이러한 접근법은 BsAb의 각각의 결합 아암을 개별적으로 조정한다고 해도 분자 전체의 전반적인 효능 또는 안전성 프로파일이 반드시 개선되는 것이 아니라는 중요한 이해를 불러일으키기 때문에, 모든 변형이 완전히 구현된 전체 BsAb의 맥락에서 이중 친화도 조정된 BsAb가 평가되었다. 이러한 ABP102에 대한 HER2 결합 친화도와 CD3 결합 친화도의 이중 변형은 HER2 증폭된 암 세포를 선택적으로 사멸시키는 전신 전달용 신규한 BsAb를 생성하였으며, 임상에서 더 나은 안정성을 위한 사이토카인 생산 감소를 보여줄 것으로 예상된다.

[0284] 실시예 2: 항체 인간화, 친화도 조정 및 특징분석

[0285] 합리적 설계에 의한 항체 인간화와 역돌연변이

[0286] 마우스 항-CD3 항체의 상보성 결정 영역(CDR), 초가변 루프 및 프레임워크 영역(FR)을 가변 서열 내에서 분석하고, KABAT 묘사 시스템에 따라 식별하였다. 마우스 항체의 CDR을 마우스 대응물과 가장 높은 서열 동일성을 공유하는 중쇄 가변 도메인(V_H)과 경쇄 가변 도메인(V_L)을 사용하여 인간 수용체 프레임워크에 직접 이식하였다. 이어서, 상동성 모델링을 수행하여 마우스 항체의 모델링된 구조를 얻고, 프레임워크 잔기의 용매 접근 가능 표면적을 계산하여 묻혀 있는 프레임워크 잔기를 식별하였다. 이어서, 이식된 서열과 마우스 항체 프레임워크 서열에서 상이한 V_H 서열과 V_L 서열 내 중요한 잔기를 식별하고 역돌연변이시켰다. 최종적으로, 이식된 서열을 이식된 항체의 결합 활성에 영향을 미칠 수 있는 N-글리코실화 부위, 번역 후 변형 및 짝을 이루지 않은 시스템 잔기와 같은 잠재적인 위험에 대해 검사하였다.

[0287] NNK 라이브러리의 설계와 작제, FASEBA 스크리닝 및 친화도 순위 매김

- [0288] 초기에, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 바이오센서인 Biacore 8K(GE Healthcare, Marlborough, MA)를 사용하여 HER2와 모 BsAb의 친화도를 측정하였다. ka에 대한 kd의 비로 평형 해리 상수(KD)를 계산하였다. 항체 친화도 및 발현에 대한 특정 잔기의 기여를 결정하기 위해, NNK 라이브러리를 스크리닝하는 방식으로 과라토프 매핑을 수행하였다. 간략하게, NCBI Ig-Blast(www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/)를 사용하여 모 항체의 V_H과 V_L을 검색하고, KABAT 묘사 시스템으로 CDR을 정의하였다. CDR 내 모든 잔기를 정의하고, NNK 방법으로 돌연변이시켰다. 이론적 다양성 20을 이용하여 FASEBA 플랫폼에 기반하여 잔기별로 각각의 개별 NNK 라이브러리를 생성하였다. 96 웰 플레이트 내 대장균(*E. coli*)에서의 발현을 위해 각각의 NNK 라이브러리에서 48개가 넘는 클론을 무작위로 선택하였다. 모든 클론을 시퀀싱하고, 고유한 클론을 선택하였다. 발현과 결합 특이성을 각각 평가하기 위해, 배지에서 분비된 선택된 미정제 단백질을 소혈청 알부민(BSA)과, 인간 및 cyno 항원 단백질에 대해 ELISA로 분석하였다. 스크리닝과 친화도 순위 매김을 통해 GenScript의 FASEBA(Fast Screening for Expression level, Biophysical properties, and Affinities) 플랫폼을 이용하여, 항체 발현을 손상시키지 않으면서 항체 친화도가 감소된 "유리한 돌연변이체"를 확인하였다.
- [0289] 친화도 조정된 이중특이적 항체의 선별 및 합성
- [0290] 돌연변이체 라이브러리로부터, Expi-CHO-S 세포에서의 발현을 위해 발현 벡터에 서브클로닝하는 방식으로 인간 및 cyno HER2에 대한 친화도가 상이한 일련의 항체를 이중특이적 항체 형식으로 작제하였다. 이중특이적 항체를 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하였다.
- [0291] 모 및 친화도 조정된 이중특이적 항체와 인간 및 cyno 표적 단백질(HER2 및 CD3) 사이의 결합을 ELISA로 평가하고, Biacore 8K를 사용하여 항원과 이중특이적 항체 사이의 상호작용 동역학을 연구하였다. 도 10, 도 12, 및 도 17a와 도 17b 참조.
- [0292] 실시예 3: 본 발명의 기술의 항-HER2 항체의 시험관내 특징분석
- [0293] 유세포분석에 의한 T세포와 표적 세포 결합
- [0294] 정제된 CD3+ T세포와 전체 인간 PBMC를 Live/Dead 염색을 이용하여 대량으로 염색한 후, 결합에 대해 평가하기 위해 다양한 농도의 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션하였다. 대조군에는 적절한 단클론 항체(인간화 SP34-hIgG1)와 아이소타입 대조군(hIgG1)이 포함되어 있었다. 검출을 위해 항인간 IgG Fc 특이적 PE 접합체인 2차 항체를 사용하였다.
- [0295] 세포주를 세포주 공급원의 권장사항에 따라 성장시킨 후, 세포를 들어올리기 위해 Accutase 처리하였다. 세포를 배지에 재현탁시키고, Live/Dead 염색을 이용하여 대량으로 염색한 후, 이중특이적 항체와 대조군 단클론 항체(트라스투주맵 hIgG1)로 염색하였다. 검출을 위해 항인간 IgG Fc 특이적 PE 접합체인 2차 항체를 사용하였다. BD FACSCelesta용 HTS 플랫폼을 사용하여 데이터를 수집하고, FlowJo 소프트웨어로 데이터 분석을 수행하였다. 도 7a는, 본 발명의 기술의 항-HER2×CD3 BsAb가 인간화 SP34-hIgG1 대조군과 비교하여 T세포에 대해 감소된 결합을 나타냈음을 보여준다.
- [0296] 시험관내 T세포 의존성 세포독성(TDCC) 검정
- [0297] 생물학적 활성을 평가하기 위해, 이펙터 인간 CD3+ T세포를 사용하여 확립된 자체 TDCC 검정(Cell Titer Glo 2.0(Promega)과 Caspase3/7 녹색 세포자멸사 검정(IncuCyte))을 수행하여 상이한 표적 세포주에 대해 CD3 친화도가 상이한 이중특이적 HER2 × CD3 항체를 시험하였다. 항-HER2 × CD3 BsAb는, HER2를 높은 수준으로 발현하는 표적 세포주(SKBR-3 세포주)는 선택적으로 사멸시키지만, 내인성에 가까운 수준으로 HER2를 발현하는 표적 세포(MCF-7 세포주)는 그대로 남겨 두는 것으로 나타났다(도 7b와 도 7c, 및 도 9a와 도 9b). 본 실험에서, ABP100s.10.0은 WT-트라스투주맵과 유사한 친화도를 나타냈고, ABP100s.10.5와 ABP100s.10.6은 (각각, 약 64배와 약 108배) 더 낮은 HER2 친화도를 나타냈지만, 모든 이중특이적 작제물은 동일한 고친화도 CD3 scFv 아암을 함유하고 있었다. 특히, HER2 친화도가 낮은 ABP100s.10.5 작제물과 ABP100s.10.6 작제물은, WT와 유사한 친화도를 나타내는 항체(ABP100s.10.0)와 대조적으로, HER2를 낮은 수준으로 발현하는 표적 세포(MCF-7)의 차등적이고 선택적인 사멸을 가능하게 하였다.
- [0298] 대조적으로, 트라스투주맵 × huOKT3 모 항체는 SKBR-3 세포주와 MCF-7 세포주를 모두 비선택적으로 사멸시키는 것으로 나타났다. 도 8a와 도 8b 참조. HER2 고발현 세포주의 사멸은 HER2 저발현 세포주보다 낮은 농도의 트라스투주맵 × huOKT3에서 달성되었지만, HER2 저발현 세포주의 사멸은 완전히 제거될 수 없는 것으로 관찰되었다(도 8b).

- [0299] 백색 웰 플레이트를 사용하는 표준 발광 96웰 플레이트 판독기인 Spectramax iD3에서 CTG2.0 검정 판독을 수행하였다. 이미지 기반 분석을 위한 IncuCyte S3 플랫폼과 소프트웨어로 백색 투명 바닥 96웰 조직 배양 처리된 플레이트를 사용하여 Caspase3/7 녹색 시약에 의한 이미지당 전체 녹색 면적을 결정할 수 있었다. 이러한 검정은 각각의 웰 내 세포자멸성 세포의 상대적인 빈도를 예측할 수 있게 하였다.
- [0300] 이러한 결과는, CD3 scFv 친화도의 감소가 HER2 고발현 표적 세포(SKBR-3)의 사멸에 최소한의 영향을 미치면서, HER2 저발현 세포(MCF-7)는 계속 사멸시키지 않는 것으로 나타났음을 입증한다.
- [0301] Her2를 다양한 수준으로 발현하는 종양 세포주의 존재 또는 부재 하에서, 항체 결합, T세포 활성화, T세포 매개 사멸 및 사이토카인 생산에 대한 본 발명의 기술의 각각의 HER2×CD3 BsAb의 다양한 Her2 및 CD3 친화도의 영향을 조사하였다. SKBR3과 HCC1954는 SKBR3에 대한 HercepTest 결과가 3+에 해당하는(Dako HercepTest Interpretation Manual, www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf) 유사한 Her2 발현 수준을 나타내는 고밀도 Her2 발현 세포주를 나타내기 때문에 선택되었고(문헌[Ram et al., *MAbs*. 2014 6(5): 1211-1219]), MCF-7과 HT55는 서로 및 Her2를 내인성 비암성 수준으로 발현하는 세포와 발현 수준이 유사하며, 여기서 MCF-7은 HercepTest 점수가 0-1+을 나타내는 저밀도 Her2 발현 세포를 나타내기 때문에 선택되었다(문헌[Rhodes et al., *Am J Clin Pathol* 2002 118(3):408-17]; 문헌[Subik et al., *Breast Cancer* (Auckl). 2010; 4: 35-41]; 문헌[Slaga et al., *Sci Transl Med* 2018 Oct 17;10(463):eaat5775]). NFAT T세포 수용체 활성화 검정, 세포독성 검정 및 사이토카인 검정에 대한 하기 데이터의 모든 p 값은, Graphpad Prism Version 9.4.0.에서 실행된 이원분산분석(two-Way ANOVA)과 Tukey 다중 비교 분석에서 유도된 값이었다.
- [0302] **CD3/TCR NFAT T세포 활성화 리포터 검정:** 이중특이적 및 단클론 항체에 의한 T세포 활성화를 평가하기 위해, T세포 활성화 생물검정 키트(Promega J1621/J1625)를 TCR/CD3 Jurkat 이펙터 세포(NFAT 리포터)와 함께 사용하였으며, Bio-Glo 루시퍼라아제 검정 시스템(Promega G7941)을 사용하여 검출하였다. 간략하게, 백색 바닥/침니(chimney)(순백색) TC 처리된 플레이트(Corning 3917)를 사용하여, 40,000개 표적 세포(*Her2* 고발현: SK-BR-3, HCC1954; *Her2* 저발현: MCF-7, HT55)를 100 μ L 배지 중에 밤새 플레이트팅하고, 표적 세포가 없는 조건도 사용하였다. 이어서, 검정 키트와 함께 제공된 상세한 설명서에 따라, 7시간 동안 인큐베이션한 후 발광 판독을 통해 검정을 수행하였다.
- [0303] 일반적으로, 더 많은 양의 Her2를 발현하는 표적 세포에서 더 높은 활성화가 확인되었다(**도 13a**와 **도 13b**). 특히, 10.5.1과 10.6.1은 Her2 고발현 표적(SK-BR-3, HCC1954)에 대해 모 작제물(10.0)보다 약간만 감소되었으며, 시험된 가장 높은 용량(40 nM)에서 모든 작제물에 대한 모든 활성화 판독값은 300,000 RLU 내지 600,000 RLU 이내였다(**도 13a**와 **도 13b**). Her2 저발현 표적의 경우, 10.0 작제물은 활성도가 약간 더 낮지만 유사하게 나타났으며(MCF-7 세포주와 HT-55 세포주 모두 40 nM에서 대략 300,000 RLU), 10.5 작제물과 10.6 작제물은 두 가지 세포주 모두에 대해 10.0과 비교 시 유의하게 감소된 활성화(대략 200,000 RLU)를 나타냈다(두 가지 비교 모두에서 $p < 0.0001$)(**도 13c**와 **도 13d**). 나아가, 10.5.1 작제물과 10.6.1 작제물은 Her2 저발현 표적 세포(HT55, MCF-7; **도 13c**와 **도 13d**)에 대해 40 nM에서 10.5와 10.6보다 유의하게 낮은 활성화(대략 100,000 RLU)(두 가지 비교 모두에서 $p < 0.0001$)를 나타냈고, 아이소타입 대조군과는 통계적으로 상이하지 않았으며, 표적 세포의 부재 하에서 관찰된 배경 활성화와 유사하였다(**도 13e**). 종합하면, 이러한 데이터는, Her2 저발현 세포에서 10.5.1 및 10.6.1 유도 T세포 활성도가 결여되어 있다는 것과 일치한다.
- [0304] **T세포 의존성 세포독성(TDCC):** Her2 발현 표적 세포의 T세포 매개 사멸을 매개하는 이중특이적 항체의 시험관내 기능적 능력을 평가하기 위해, CD3+ T세포를 이용하여 T세포 의존성 세포독성(TDCC) 검정을 수행하였다. 표적 세포를 백색 바닥/침니 조직 배양물 처리된 플레이트(Corning 3917) 내 100 μ L 배지 중에 웰당 10,000개 세포로 플레이트팅하고, 밤새 인큐베이션하였다(*Her2* 고발현: SK-BR-3, HCC1954; *Her2* 저발현: MCF-7, HT55). 이중특이적 항체를 RPMI 1640/10% 열 불활성화된 FBS 중에 희석하였다(범위: 최종 농도 30 nM, 0.3 nM, 0.003 nM, 0.00003 nM). 표적 세포에서 배양 배지를 제거하고, 이중특이적 항체를 100 μ L로 첨가한 후, 정제되고 동결보존된 인간 T세포(StemCell Technologies 70024)를 이펙터:표적 비 5:1(T세포:표적 세포)로 첨가하였다. CellTiterGlo2.0(Promega)을 이용하여 40시간 차에 검출을 수행하였으며, SpectraMax iD3 플레이트 판독기에서 발광을 검출하였다. 표시된 도면의 결과는 3개의 별개의 공여체 CD3+ T세포 샘플을 이용하여 수행된 실험을 대표한다.
- [0305] SK-BR-3 표적 세포의 경우, 10.5.1과 10.6.1은 40 nM에서 모 작제물(10.0)에 비해 미미하지만 유의한 사멸의 감

소를 나타냈다(10.0과 10.5.1의 비교: $p = 0.0042$; 10.0과 10.6.1의 비교: $p = 0.0002$)(도 14a). SKBR3 세포의 존재 하에서 Her2 돌연변이되고 CD3 돌연변이되지 않은 10.5 및 10.6과 모 10.0 사이에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며(도 14a), 이는 10.5.1과 10.6.1에 의한 Her2 고발현 세포의 의도된 표적화와 일치한다. HCC1954 표적 세포의 경우, 10.5와 10.6은 10.0 모 작제물과 비교하여 유의하게 감소된 사멸을 나타냈지만(도 14b), 이러한 감소(SKBR3과 HCC1954의 경우 10.0 사멸 수준의 대략 10% 내지 20% 감소)는 Her2 저발현 세포에서 확인된 감소(MCF-7과 HT55의 경우 10.0 사멸 수준의 대략 67% 내지 75% 감소)와 비교하여 미미한 수준이었다. 40 nM에서 Her2 저발현(HT55, MCF-7) 표적 세포의 경우, 아이소타입 대조군 사멸 수준과 10.5, 10.6, 10.5.1 및 10.6.1의 사멸 수준 사이에는 유의한 차이가 존재하지 않았다(도 14c와 도 14d)(MCF-7 세포주에 대한 아이소타입과 10.5의 비교 제외, 도 14c). 대조적으로, MCF-7 세포주와 HT-55 세포주의 경우 동일한 용량에서, 이러한 작제물은 모두 10.0 모 작제물과 비교하여 유의하게 감소된 사멸을 나타냈으며(10.0과 10.5의 비교, 10.0과 10.6의 비교, 10.0과 10.5.1의 비교, 및 10.0과 10.6.1의 비교에서 $p < 0.0001$)(도 14c와 도 14d), 이는 Her2 및 CD3 돌연변이된 작제물에 의한 Her2 저발현 세포주의 사멸이 존재하지 않거나 거의 존재하지 않았음을 나타낸다. MCF-7 세포주에서 10.5로 인해 유도된 유의하게 증가된 사멸이 다수의 실험에서 일관되게 관찰되었으며, 이는 Her2에 대한 10.5의 친화도(KD는 대략 45 nM임)가 10.6(KD는 대략 67 nM임)보다 약간 더 강력하기 때문일 수 있음을 나타낸다.

[0306]

인간 PBMC를 이용한 Her2 고발현 표적 세포주와 Her2 저발현 표적 세포주에 대한 다중 사이토카인 검출 검정, 및 관련 세포독성. 이종특이적 항체 작제물에 의해 매개된 사이토카인 방출을 분석하기 위해, 인간 PBMC를 SKBR-3(Her2 고발현)과 MCF-7(Her2 저발현)을 포함하는 가용성 항체뿐 아니라, "표적 세포가 없는" 조건과 접촉시켰다. 단클론 항-CD3/항-CD28 항체를 대조군으로 사용하였다. 간략하게, SKBR-3(Her2 고발현) 표적 세포주와 MCF-7(Her2 저발현) 표적 세포주를 검정 전날 밤에 플레이팅하였다. 이종특이적 항체를 RPMI 1640/10% 열 불활성화된 FBS 중에 희석하였다(범위: 최종 농도 30 nM, 0.3 nM, 0.003 nM, 0.00003 nM). 표적 세포에서 배양 배지를 제거하고, 이종특이적 항체를 100 μ L로 첨가한 후, 인간 PBMC(하나의 공여체, Stem Cell Technologies, PBMC 약 5×10^7 개 세포/바이알)(E:T 비 10:1; 100,000개 PBMC:10,000개 표적 세포)를 백색 침니/바닥 플레이트 내 RPMI/10% HI FBS 중에 첨가하였다. Magpix(Luminex)를 사용하는 신호 검출과 함께 다중 비드 기반 사이토카인 방출 검정(R&D Systems Human High Sensitivity Cytokine Base Kit B: IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6, GM-CSF)을 위해 24시간 차에 배양 상청액을 수확하고 -80° C로 동결시켰으며, Luminex xMAP 소프트웨어를 사용하여 표준 웰과 비교하여 사이토카인을 피코그램/mL 단위로 정량화하였다. TDCC 세포독성 평가를 위해 CellTiterGlo2.0(Promega)을 사용하여 검정을 전개시켰으며, SpectraMax iD3 플레이트 판독기에서 발광을 검출하였다. 표시된 도면의 결과는 3개의 별개의 공여체 PBMC 샘플을 이용하여 수행된 실험을 대표한다. 세포독성 및 사이토카인 방출 결과를 Excel로 작성하고, GraphPAD PRISM으로 그래프화하였다.

[0307]

T세포 결합제 투여와 관련된 과량의 사이토카인 생산은 T세포 결합제의 1차 독성인 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 초래할 수 있기 때문에, Her2를 높은 수준(SKBR3) 또는 낮은 수준(MCF-7)으로 발현하는 종양 세포주와, 인간 PBMC의 존재 하에서 사이토카인 생산에 대한 Her2와 CD3의 약화된 친화도의 영향을 조사하였다. 10.0 모 작제물, Her2 친화도 감소된 10.5 작제물과 10.6 작제물, 및 Her2 및 CD3 친화도 약화된 10.5.1 작제물과 10.6.1 작제물은 모두 SKBR3 세포의 존재 하에서 아이소타입 대조군(배경 사이토카인 생산을 나타내는 대조군)보다 유의하게 높았던 사이토카인 생산을 자극하였다(도 15a 내지 도 15d). 하지만, MCF-7 세포의 존재 하에서, 10.0만 아이소타입 대조군과 비교하여 유의하게 증가된 사이토카인 생산을 나타냈는데, 이는 사이토카인 생산을 자극하는 Her2 및/또는 CD3 약화된 작제물의 능력이 감소되었음을 나타낸다(도 15e 내지 도 15h). 30 nM에서, 친화도 약화된 작제물은 모두 MCF-7 세포의 존재 하에서 유의하게 감소된 IL-2, IFN- γ 및 TNF- α 생산을 나타냈다(10.0과 10.5의 비교, 10.0과 10.6의 비교, 10.0과 10.5.1의 비교, 및 10.0과 10.6.1의 비교에서 $p < 0.0001$). 중요한 것은, 면역조절제와 관련된 CRS의 중요한 매개체 사이토카인인 IL-6의 생산(문헌[Morris *et al.*, *Nat Rev Immunol* 2022;22(2):85-96])이 MCF-7 세포의 존재 하에서 10.0과 비교하여 Her2와 CD3이 이중으로 약화된 10.5.1 작제물과 10.6.1 작제물에서 유의하게 감소되었다는 점이다(각각, $p = 0.0432$ 와 $p = 0.029$)(도 15f). 10.0 모 작제물과 비교하여 Her2 친화도 약화된 10.5 작제물과 10.6 작제물에서 관찰된 IL-6 생산에 유의한 차이가 없다는 것은, 낮은 IL-6 수준을 달성하기 위해서는 Her2 친화도 약화와 CD3 친화도 약화가 모두 중요함을 강조한다. "표적 세포가 없는" 조건은, 이종특이적 항체를 갖는 PBMC가 단독으로 사이토카인 방출을 촉진시키지 못했음을 보여주었다. SKBR-3(Her2 고발현) 표적 세포의 경우, 세포독성은, 약간의 차이는 관찰되었지만, 모 작제물(10.0)에 비해 10.5.1과 10.6.1에 대해 비슷하였다.

[0308]

이러한 결과는, 이러한 작용제가 내인성, 비암성 조직 수준의 Her2를 갖는 Her2 저발현(Herceptest 점수 0-1+)

조직은 그대로 남겨 두어 임상에서 표적내, 종양의 독성을 감소시키면서, Her2 고발현(예를 들어, Herceptest 점수 3+) 세포에 반응하여 이를 선택적으로 사멸시키고 사이토카인을 생산하는 방식으로 Her2 고발현 암을 앓고 있는 환자를 치료할 때 CRS의 발생률을 감소시키는 데 유용하다는 것을 입증한다.

[0309] **활성화된 T세포와 Her2 발현 표적 세포에 결합하는 이중특이적 항체의 유세포분석.** 활성화된 T세포에 대한 이중 특이적 항체의 유세포분석 결합을 평가하기 위해, 인간 PBMC(StemCell Technologies 70025.2)를 12일에 걸친 OKT3/IL-2 자극 프로토콜에 따라 자극시켰다. 간략하게, PBMC를 100 IU/mL의 재조합 인간 IL-2(Stemcell Technologies, cat #78145.1)와 20 ng/mL의 OKT3(Biolegend, 마우스 IgG2a, Cat#317326)을 이용하여 3일 동안 가용성 형식으로 활성화시킨 후, RPMI 1640/10%FBS 중에 세포를 1×10^6 개 세포/mL로 정규화하는 방식으로 새로운 배지와 IL-2만 사용하여 확장/유지시켰다. 활성화된 T세포를 동결보존하고, 액체 질소 동결기에 보관하였다. 검정 당일, T세포를 해동시키고 세척한 후, 희석된 이중특이적 항체로 염색하였다(초기 작업 스톱은 최종 농도 120 nM에 대해 240 nM(2x)이었고, 총 7회 연속 희석에 대해 FACS 완충액 중에 1:10으로 연속 희석하였음). 세포를 냉각된 PBS/1% BSA 중 1차 항체로 4° C에서 30분 동안 염색한 후, 세척하고, 냉각된 PBS/1% BSA 중 1:250의 2차 항체(항인간 IgG-PE, Thermo Fisher Scientific)를 4° C에서 30분 동안 첨가하였다. 세척 단계 후, 150 μ L PBS/1% BSA 중에 세포를 재현탁시키고, 96웰 V 바닥 플레이트가 장착된 FACSCelesta HTS 시스템에서 PE 신호를 검출하였다. 검정 전 BV421 채널(Zombie violet, Thermo Fisher Scientific) 또는 트립판 블루(Trypan Blue)를 사용하여 생존/사멸을 평가하였다.

[0310] Her2 고발현(SKBR-3, SKOV-3)와 Her2 저발현(MCF-7, HT55)을 포함하는 세포주에 대한 이중특이적 항체의 유세포분석 결합을 평가하기 위해, 세포를 ATCC 프로토콜에 따라 각각의 배양 배지에서 70% 내지 80% 컨플루언시까지 성장시켰다. 유세포분석용 세포 표면 에피토프를 보존하기 위해 세포주를 Accutase로 처리하였다. 세포를 5 mL PBS(BSA 없음) 중에 재현탁시키고, Live/Dead Zombie 염료(Biolegend)의 1:1000 희석액으로 실온에서 20분 동안 염색하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 96웰 V 바닥 플레이트 상에 웰당 100,000개 세포로 첨가하여 정규화하고, 냉각된 PBS/1% BSA 중 1차 항체로 4° C에서 30분 동안 염색하였다. 이어서, 세척하고, 냉각된 PBS/1% BSA 중 1:250의 2차 항체(항인간 IgG-PE, Thermo Fisher Scientific)를 4° C에서 30분 동안 첨가하였다. 세척 단계 후, 150 μ L PBS/1% BSA 중에 세포를 재현탁시키고, 96웰 V 바닥 플레이트가 장착된 FACSCelesta HTS 시스템에서 PE 신호를 검출하였다. 검정 전 BV421 채널(Zombie violet, Thermo Fisher Scientific) 또는 트립판 블루(Trypan Blue)를 사용하여 생존/사멸을 평가하였다. FlowJo 소프트웨어로 분석을 수행하여 PE(항인간 IgG-PE) 중앙값(MFI)을 얻은 후, 데이터를 Microsoft Excel과, GraphPAD Prism 소프트웨어의 GraphPad PRISM 소프트웨어로 정리하고 플롯팅하였다.

[0311] 결과: 활성화된 T세포 결합은 모 작제물(10.0)과 비교하여 10.5.1 및 10.6.1의 경우 감소되었다(도 16e). 10.5.1과 10.6.1에서 관찰된 감소된 T세포 결합은 감소된 친화도를 나타내는 CD3 아암을 갖는 것에 적어도 부분적으로 기인할 수 있다.

[0312] Her2 고발현(SK-BR-3, SK-OV-3) 세포주에 대한 표적 세포주 결합은 모 작제물(10.0)과 비교하여 10.5.1 작제물과 10.6.1 작제물에서 약간 감소하였다(약 100 nM 농도에서 10.0과 비교하여 10.5.1과 10.6.1 모두 MFI가 대략 33% 감소됨)(도 16a 와 도 16b). Her2 저발현(MCF-7, HT55) 표적 세포주에 대한 표적 세포주 결합은 모 작제물(10.0)과 비교하여 10.5.1 작제물과 10.6.1 작제물에서 크게 감소하였다(약 100 nM 농도에서 10.0과 비교하여 두 가지 작제물 모두 MFI가 대략 84% 감소됨)(도 16c 와 도 16d). 종합하면, 이러한 결과는, 이중으로 친화도 약화된 HER2 x CD3 작제물(10.5.1, 10.6.1)이 Her2 고발현 표적 세포주에 대한 선택성에 기여하며, 세포독성을 강화시키기 위해 CD3+ T세포에 결합하는 능력을 유지하는 특성을 가지고 있음을 입증한다. 전체적으로, 친화도 약화된 작제물 10.5.1과 10.6.1은, 모 작제물과 비교 시 Her2 저발현 표적 세포에 대해 감소된 세포독성과 사이토카인 방출을 나타냈다.

[0313] 종합하면, 10.5.1 및 10.6.1과 비슷한 친화도를 갖는 도 10에 기재된 HER2 및 CD3 친화도 감소된 이중특이적 항체 작제물은, NFAT 활성화, TDCC 및/또는 FACS 중 적어도 하나에서 10.5.1 및 10.6.1과 유사한 거동을 나타낼 것으로 예상된다.

[0314] 실시예 4: 본 발명의 기술의 HER2 친화도 조정된 이중특이적 항체의 생체내 효능

[0315] 본 발명의 기술의 친화도 조정된 이중특이적 항체의 생체내 효능을 평가하기 위해, 마우스에서 인간 종양과 말초혈액 단클론 세포(PBMC)의 공동 이중이식이 수행될 것이다. 시험관내에서 HER2에 대한 저친화도 결합이 HER2 고발현 종양의 선택적 사멸을 유도하고, HER2 저발현 종양(정상적인 비암성 조직의 내인성 HER2 발현에 대한 대용물로 사용됨)을 그대로 남겨 둔다는 점을 고려할 때(도 14), 본 발명자들은 이러한 선택적 사멸이 생체내에서

도 관찰될 수 있는지를 평가하려고 한다. NSG 마우스에 100만개 내지 500만개의 HER2 발현 종양과 인간 PBMC(PBMC:종양(E:T) 비 1:2 또는 1:3)의 혼합물이 피하로 이식될 것이다. HCC1954 세포와 같은 Her2 고발현 종양 세포주(임상에서 예상되는 종양의 발현 수준을 나타냄(예를 들어, HecepTest 점수가 2+ 또는 3+임)) 또는 HT55 세포와 같은 Her2 저발현 종양 세포주(비암성 조직에서의 Her2 수준을 나타냄)가 Nod-Scid-감마(NSG) 마우스 또는 이와 유사한 것과 같이 충분히 면역손상된 마우스에 이식될 것이다. 종양 세포와 PBMC의 이식 후, 다양한 Her2 및 CD3 친화도 약화된 작제물의 상이한 용량 수준(적어도 5 mg/kg 내지 0.005 mg/kg을 포함하는 범위)이 마우스에 투여될 것이다. 용량은 1주 이상 동안 1주에 1회 이상 비경구(예를 들어, i.v. 또는 i.p.)로 투여될 것이다. 종양 부피가 연구 지속기간 동안 측정될 것이다.

[0316] 10.0 모 작제물은, 10.5.1과 10.6.1이 Her2 고발현 종양의 성장은 선택적으로 저해하지만, Her2 저발현 종양에 대해서는 성장 저해 활성을 나타내지 않거나 거의 나타내지 않는 용량에서, Her2 고발현 종양 세포와 Her2 저발현 종양 세포 모두의 성장을 비선택적으로 저해할 것으로 예상된다. 또한, IL-2, IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 사이토카인의 수준이 10.0 모 작제물과 비교하여 10.5.1 클론과 10.6.1 클론이 투여된 동물에서 감소될 것으로 예상된다.

[0317] 따라서, 본 발명의 기술의 면역글로불린 관련 조성물은 HER2 관련 암의 치료를 필요로 하는 대상에서 HER2 관련 암을 치료하는 데 유용하다.

[0318] 등가물

[0319] 본 발명의 기술은, 본 발명의 기술의 개별 양태의 단일 예시로서 의도된 본 출원에 기재된 특정 실시형태의 측면에 제한되지 않는다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 출원의 사상 및 범위에서 벗어나지 않는 한 본 발명의 기술에 대한 다수의 변형 및 변경이 이루어질 수 있다. 본원에 열거된 것들에 더하여, 본 발명의 기술의 범위 내에서 기능적으로 동등한 방법 및 장치가 또한 전술한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변형 및 변경은 본 발명의 기술의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다. 본 발명의 기술은 특정 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않으며, 당연히 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하기 위한 것이며, 제한하고자 의도된 것이 아님을 이해해야 한다.

[0320] 또한, 본 개시내용의 특징 또는 양태가 Markush 그룹의 관점에서 설명되는 경우, 당업자는 본 개시내용이 Markush 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 구성원들의 하위그룹의 관점에서도 설명된다는 것을 이해할 것이다.

[0321] 당업자가 이해하는 바와 같이, 임의의 및 모든 목적을 위해, 특히 서면 설명을 제공하는 관점에서, 본원에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 모든 가능한 하위범위 및 이들 하위범위들의 조합을 포함한다. 임의의 열거된 범위는, 이러한 범위가 적어도 절반, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10 등으로 나누어지는 것을 충분히 설명하고 이를 가능하게 하는 것으로 쉽게 인식될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에 논의된 각각의 범위는 하위 1/3, 중간 1/3 및 상위 1/3 등으로 쉽게 나눌 수 있다. 또한, 당업자가 이해하는 바와 같이, "최대", "적어도", "초과", "미만" 등과 같은 모든 언어는 인용된 숫자를 포함하며, 상기 논의된 바와 같이 이후에 하위범위로 나눌 수 있는 범위를 나타낸다. 최종적으로, 당업자가 이해하는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어 1개 내지 3개의 세포를 갖는 그룹은 1개, 2개 또는 3개의 세포를 갖는 그룹을 나타낸다. 유사하게, 1개 내지 5개의 세포를 갖는 그룹은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 세포를 갖는 그룹을 나타내는 것과 같다.

[0322] 본원에 인용된 모든 특허, 특허출원, 임시출원 및 공개공보는, 본 명세서의 명백한 교시와 모순되지 않는 범위 내에서, 모든 도면 및 표를 포함하여 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

도면

도면1

HER2-VH CDR1 (서열번호 1): GFNIKDTYIH
HER2-VH CDR2 (서열번호 2): RIYPTNGYTRYADSVKG
HER2-VH CDR2-변이체 (서열번호 7): RGYPTNGYTRYADSVKG
HER2-VH CDR3 (서열번호 3): WGGDGFYAMDY
HER2-VH CDR3-변이체 (서열번호 8): WGD~~D~~GFYAMDY
HER2-VL CDR1 (서열번호 4): RASQDVNTAVA
HER2-VL CDR1-변이체 (서열번호 9): RASQDV~~N~~TAVA
HER2-VL CDR2 (서열번호 5): SASFLYS
HER2-VL CDR2-변이체-1 (서열번호 10): SAS~~D~~LYS
HER2-VL CDR2-변이체-2 (서열번호 11): ~~D~~ASFLYS
HER2-VL CDR3 (서열번호 6): QQHYTTPPT
HER2-VL CDR3-변이체 (서열번호 12): QQHYT~~A~~PPT

도면2

ABP100s.10.1 HER2-VH (서열번호 13):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.1 L HER2-VL (서열번호 14):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPIFGQGTKVEIK

ABP100s.10.2 HER2-VH (서열번호 15):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.2 HER2-VL (서열번호 16):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTAPPIFGQGTKVEIK

ABP100s.10.3 HER2-VH (서열번호 17):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARQYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.3 HER2-VL (서열번호 18):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPIFGQGTKVEIK

ABP100s.10.4 HER2-VH (서열번호 15):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.4 HER2-VL (서열번호 18):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASDLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPIFGQGTKVEIK

ABP100s.10.5 HER2-VH (서열번호 15):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.5 HER2-VL (서열번호 19):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPIFGQGTKVEIK

ABP100s.10.6 HER2-VH (서열번호 15):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS

ABP100s.10.6 HER2-VL (서열번호 20):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVPTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPIFGQGTKVEIK

도면 3a

ABP100s.1 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNKIDTYYHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ABP100s.1 LC (서열번호 22):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF~~LYSG~~
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTENTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS
WEAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGS
LIGDKAALTITGAQADDESDFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

ABP100s.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNKIDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

ABP100s.2 LC (서열번호 23):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGL
VPSRFSGSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY
SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS
WEAYWGQGTLLTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSE
SVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGS
LIGDKAALTITGAQADDESDFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

도면 3b

ABP100s.3 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCA**A**VSNKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ABP100s.3 LC (서열번호 24):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTTFGGQGTKVEIKRTVAAPS
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASQFTENTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGFNGNSYVS
WEAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQEP
SFVSPPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPDRFSG
SLIGDKAALTITGAQADDESDYFCALWYSLNWVFGGGTKLTVL

ABP100s.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNKIDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
QGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNAKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ABP100s.4 LC (서열번호 25):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHHYTTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKSSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCVRHIGNEGNSYVS
WEAYWGQGTLLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQAVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCGSSIGAVTTISNYANWVQQTPGQAFRGLIGGINKRAPGVPDRFSGS
LIGDKAALTITGAOADESDYFCALWYSLWYFGGGTKITVL

도면3c

ABP100s.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.5 LC (서열번호 26):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLEIK

ABP100s.6 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.6 LC (서열번호 27):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLEIK

도면3d

ABP100s.7 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNAKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.7 LC (서열번호 28):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLEIK

ABP100s.5.1 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNAKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.5.1 LC (서열번호 29):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGCGTKLEIK

도면3e

ABP100s.5.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYAASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.5.2 LC (서열번호 30):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKAALTSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLEIK

ABP100s.5.3 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYAASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.5.3 LC (서열번호 31):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKAALTSGVQPEDEAIYFCALYYSNLWVFGGGTKLEIK

도면3f

ABP100s.5.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPING
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.5.4 LC (서열번호 32):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
 SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
 GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

ABP100s.10.0 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPING
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0 LC (서열번호 33):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
 SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
 GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

도면 3g

ABP100s.10.1 HC (서열번호 34):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD^YTIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGDDGFYAMDYW
GQGT^LLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^SWSNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV^PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV^EPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.1 LC (서열번호 33):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF~~LYSG~~
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHY~~TTPPI~~FGQGTKVEIKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS~~TY~~
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEAYWGQGT~~LVTVSS~~GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT~~VTV~~QEPS
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSN~~LWVFG~~GT~~KLTVL~~

ABP100s.10.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNKIDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEFYAMDYW
GQGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ABP100s.10.2 LC (서열번호 35):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNTAYAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGL
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTA~~PP~~TFGGGTKVEIKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARISK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEAYWGQGTLLTVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
VTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGINKRAPGVPARFS
GSLGGAALTLGSGVPEDEAIYFCALWYSLWVFGCGTKLTVL

도면3h

ABP100s.10.3 HC (서열번호 36):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FNIKDTYIH**WVRQAPGKGLEWVARG**GYPTNG**
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR**WG**GDGFY**AMDYW**
 GQGT**LV**TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT**VS**WNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**CA**VS**NK**ALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSC**SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.3 LC (서열번호 33):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODVNTAVAWYQQKPGKAP**KLLIYSAS**FLYSG
 VPSR**FG**SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQH**Y**TIP**PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASV**VCL**LN**FYP**REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**STY**
 SL**SSTL**TL**SKAD**YEKHKVYACEVTHQGLS**SP**VT**KSF**NRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
 SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**FT**FN**TYAMN**WVRQAPGK**Q**LEWVARIRSK
 YNNYATYYADSV**KDR**FTISRDDS**KNTAYLQMN**SLK**TEDTAVYYCVR**HGNE**FGNSYV**
 SW**FAYW**GQGT**LV**TVSS**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QTVVTQEPS
 LTVSPGGTVTLTCR**SSTGAVTISNYAN**WVQQKPGQAFRGLIGGT**NKR**APGV**PARFS**
 GSLLGGKAALTL**SGVQ**PEDEAIYFCALWYSNLWVFG**Q**GTKL**TVL**

ABP100s.10.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FNIKDTYIH**WVRQAPGKGLEWVARI**YPTNG**
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR**WG**GDGFY**AMDYW**
 GQGT**LV**TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT**VS**WNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**CA**VS**NK**ALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSC**SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.4 LC (서열번호 37):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASODVNTAVAWYQQKPGKAP**KLLIYSAS**DLYSG
 VPSR**FG**SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQH**Y**TIP**PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASV**VCL**LN**FYP**REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**STY**
 SL**SSTL**TL**SKAD**YEKHKVYACEVTHQGLS**SP**VT**KSF**NRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
 SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**FT**FN**TYAMN**WVRQAPGK**Q**LEWVARIRSK
 YNNYATYYADSV**KDR**FTISRDDS**KNTAYLQMN**SLK**TEDTAVYYCVR**HGNE**FGNSYV**
 SW**FAYW**GQGT**LV**TVSS**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QTVVTQEPS
 LTVSPGGTVTLTCR**SSTGAVTISNYAN**WVQQKPGQAFRGLIGGT**NKR**APGV**PARFS**
 GSLLGGKAALTL**SGVQ**PEDEAIYFCALWYSNLWVFG**Q**GTKL**TVL**

도면3i

ABP100s.10.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGQDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYA^ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCA^AVSNAKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5 LC (서열번호 38):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTISNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFG^CGTKLT^{TVL}

ABP100s.10.6 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGQDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYA^ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCA^AVSNAKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6 LC (서열번호 39):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVPTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTISNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFG^CGTKLT^{TVL}

도면3j

ABP100s.10.0.1 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FNI**KDTYIH**W**VRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C****A**VSNAKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0.1 LC (서열번호 40):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QOH**YITPP**I**FGQGTKVEIKRTVAAPS**V**
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**D**STY
SLSSTLTL**S**KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**F**TENTYAMN**W**VRQAPGK**C**LEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFGYWGQGTLLTVSS**GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**SQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCR**S**STGAVTTSNYAN**W**VQQKPGQAFRGLIGGT**N**KRAPGVPARFS
GSLGGKAALTL**S**GVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFG**C**GTKL**T**VL

ABP100s.10.0.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FNI**KDTYIH**W**VRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C****A**VSNAKALPAIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0.2 LC (서열번호 41):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QOH**YITPP**I**FGQGTKVEIKRTVAAPS**V**
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**D**STY
SLSSTLTL**S**KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**F**TENTYAMN**W**VRQAPGK**C**LEWVARIRSK
YNNYATY**K**ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSS**GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**SQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCR**S**STGAVTTSNYAN**W**VQQKPGQAFRGLIGGT**N**KRAPGVPARFS
GSLGGKAALTL**S**GVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFG**C**GTKL**T**VL

도면3k

ABP100s.10.0.3 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0.3 LC (서열번호 42):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYS
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADKVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

ABP100s.10.0.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0.4 LC (서열번호 43):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYS
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYWDSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

도면31

ABP100s.10.0.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD^YTIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.0.5 LC (서열번호 44):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEMYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLGGAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLSWFGCGTKLTVL

ABP100s.10.0.6 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEYAMDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ABP100s.10.0.6 LC (서열번호 45):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAYAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEAYWGQGTLLTVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAFGVPARFS
GSLGGAALTLSGVQPEDEAIYFCMLWYSNLTWVFGGCTKLTVL

도면3m

ABP100s.10.5.1 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYA**ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV**SNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.1 LC (서열번호 46):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFITENTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFGYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLLWVFGCGTKLTVL

ABP100s.10.5.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYA**ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV**SNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.2 LC (서열번호 85):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFITENTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLLWVFGCGTKLTVL

도면3n

ABP100s.10.5.3 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYAASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.3 LC (서열번호 47):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFSSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADKVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

ABP100s.10.5.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYAASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.4 LC (서열번호 48):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFSSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTTPPIFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTENTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYWDSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

도면30

ABP100s.10.5.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNKIDTYYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.5 LC (서열번호 49):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY
SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFMYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLGGAALTLGVQPEDEAIYFCALWYSNLTWVFGGTGLTTL

ABP100s.10.5.6 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNNKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTING
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GGQTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.5.6 LC (서열번호 50):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASELYSG
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTIFGGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVTVTEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSITGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLGGAALTLSGVQPEDEAIYFCMLWYNLWVFGCGTKLTVL

도면3p

ABP100s.10.6.1 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPING
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6.1 LC (서열번호 51):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVPTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFGYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

ABP100s.10.6.2 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPING
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6.2 LC (서열번호 52):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVPTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTIFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLLGKKAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL

도면3q

ABP100s.10.6.3 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIH**WVRQAPGK**GLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C****A**VSNAKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6.3 LC (서열번호 53):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV**PT**AVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASFLYSG
 VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**Q**QH**Y**T**I**PP**I**FGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
 SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
 SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**FI**F**NT**YAM**N**WVRQAPG**K**LEWVARIRSK
YNNYATYYAD**K**VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFEGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSS**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QTVVTQEPS
 LTVSPGGTVTLTC**RS**STGAVTTSNYAN**WV**QQKPGQAFRGLIGGT**N**KRAPGVPARFS
 GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFC**AL**WYS**N**LWVFG**C**GTKL**TYL**

ABP100s.10.6.4 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FN**IKDTYIH**WVRQAPGK**GLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C****A**VSNAKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6.4 LC (서열번호 54):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV**PT**AVAWYQQKPGKAPKLLIY**S**ASFLYSG
 VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**Q**QH**Y**T**I**PP**I**FGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
 SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS**GGGGSGGGSGGGG**
 SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG**FI**F**NT**YAM**N**WVRQAPG**K**LEWVARIRSK
YNNYATYY**W**DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFEGNSYV
SWFAYWGQGTLLTVSS**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QTVVTQEPS
 LTVSPGGTVTLTC**RS**STGAVTTSNYAN**WV**QQKPGQAFRGLIGGT**N**KRAPGVPARFS
 GSLLGGKAALTLSGVQPEDEAIYFC**AL**WYS**N**LWVFG**C**GTKL**TYL**

도면 3r

ABP100s.10.6.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD^YTIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGT^LLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^SWSNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV^PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV^EPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.10.6.5 LC (서열번호 55):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVPPTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFSGSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHHYTIPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEMYWGQGTLTIVTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
LTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTINKRAPGVPARFS
GSLLGGAALTLSGVQPEDEAIYFCALWYSNLTWVFGCGTKLTVL

ABP100s.10.6.6 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEYAMDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSPGK

ABP100s.10.6.6 LC (서열번호 56):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGL
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSK
YNNYATYYADSVDKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWEAYWGQGTLTIVTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
VTVQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKRA
PGVPARFSGSLLGGAALTLSGVQPEDEAIYFCMLWYSNLTWVFGCGTKLTVL

도면 3s

ABP100s.11.0 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD^YTIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.11.0 LC (서열번호 57):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYTIPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGLGGLVQPGGSLRLSCAASGFTENTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNGFGNSYVS
WEAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
TVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTLIYGTNKRAPWTPARFSGS
LLGGAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

ABP100s.11.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEYAMDYW
 GGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.11.5 LC (서열번호 58):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY
SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGLGLVQPGGSLRLSCAASGFTENTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNGNSYVS
WEAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQAVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQKPGQAPRTLIYGTNKRAPWTPARFSGS
LLGGKAALTLGAOPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

도면3t

ABP100s.12.0 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ABP100s.12.0 LC (서열번호 59):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNEFGNSYVS
WFAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
TVSPGGTVTLTCRSTGAVITSNYANWFQQKPGQAPRTLIYGTNKRAPWTPARFSGS
LLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWYFGCGTKLTVL

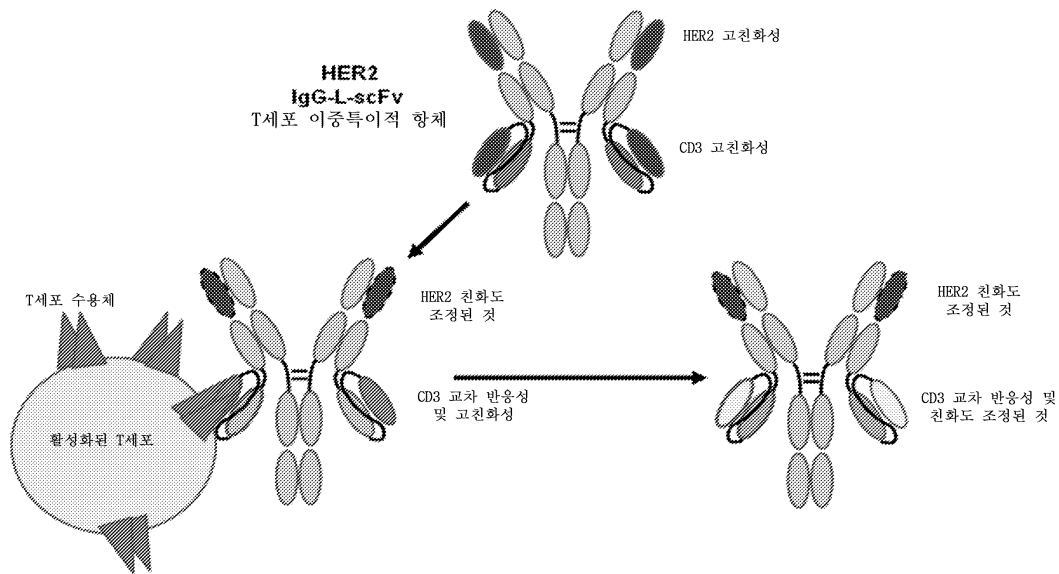
ABP100s.12.5 HC (서열번호 21):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAAVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

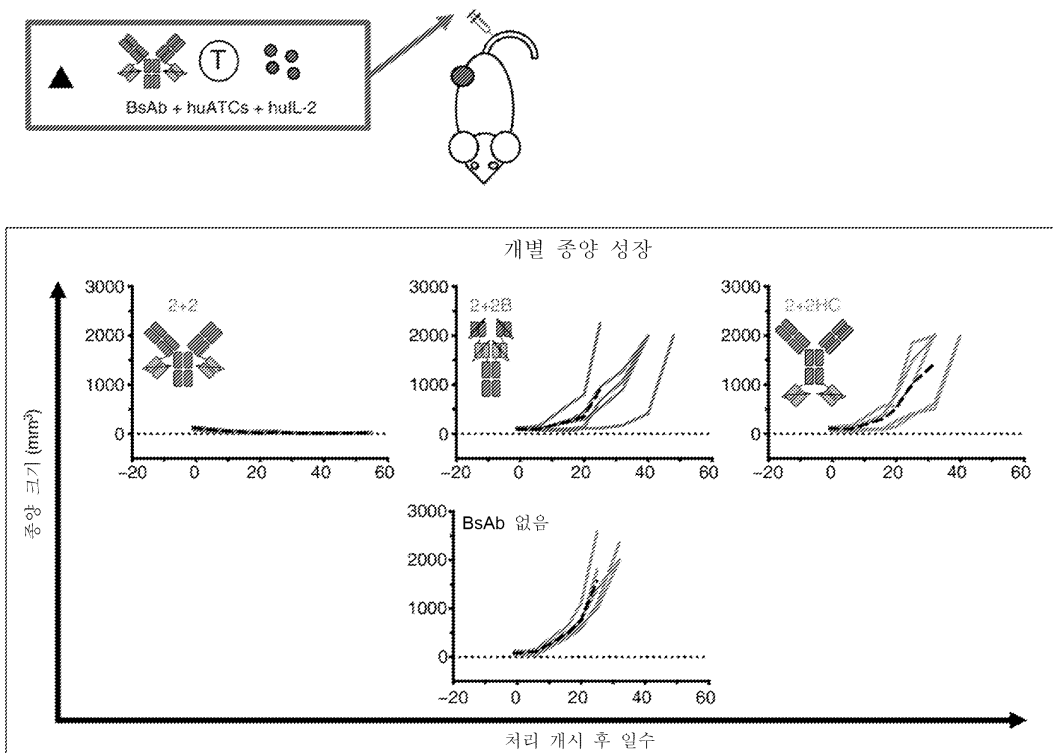
ABP100s.12.5 LC (서열번호 60):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYDASFLYSG
VPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYITPPITFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNEFGNSYVS
WFAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
TVSPGGTVTLTCRSTGAVITSNYANWFQQKPGQAPRTLIYGTNKRAPWTPARFSGS
LLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWYFGCGTKLTVL

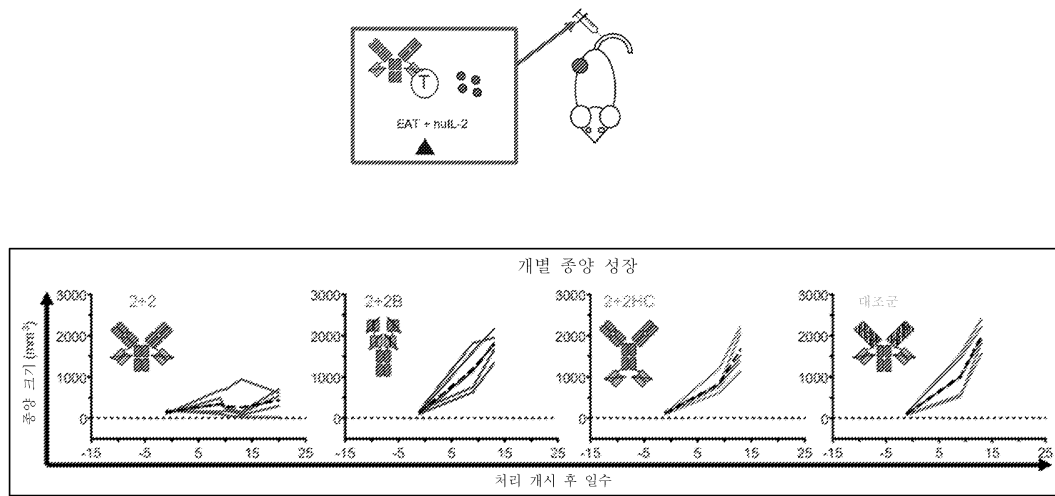
도면4



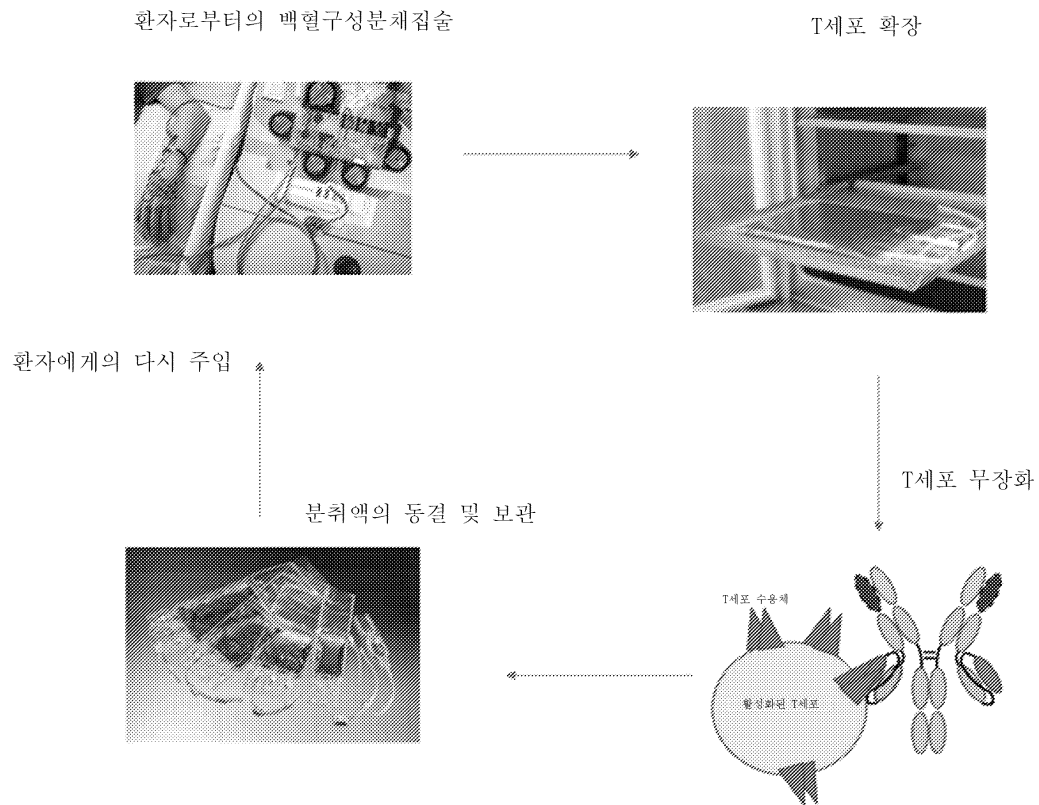
도면5a



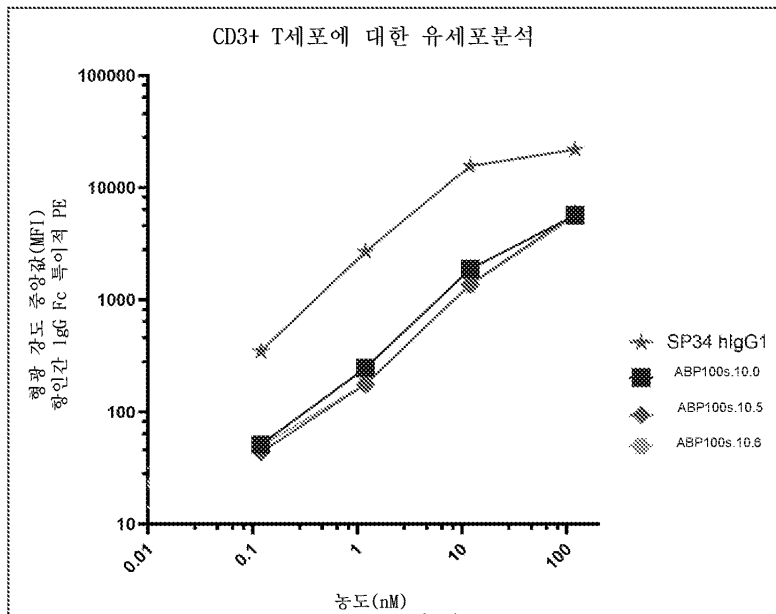
도면5b



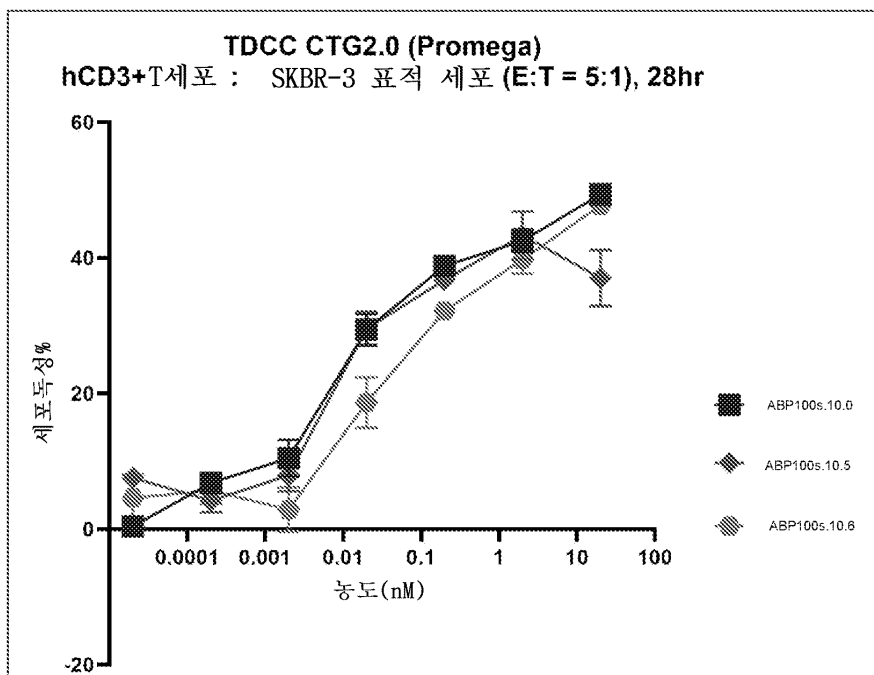
도면6



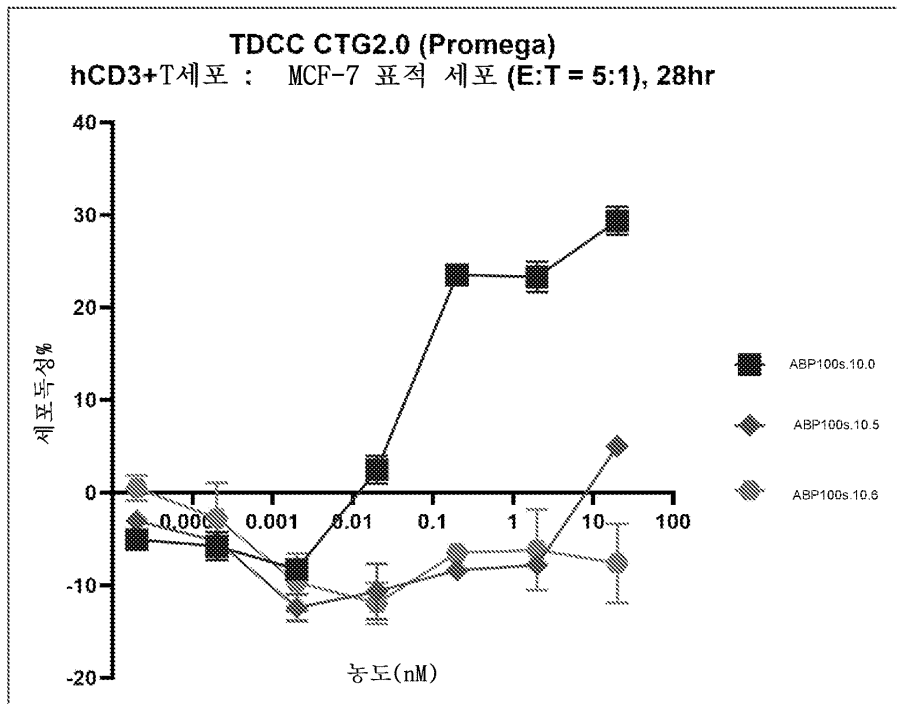
도면7a



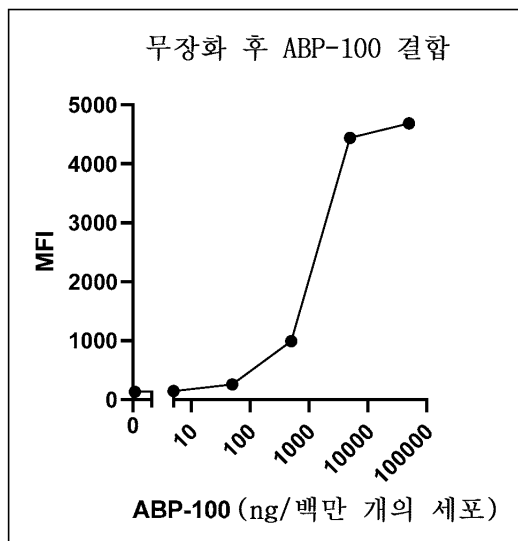
도면7b



도면7c

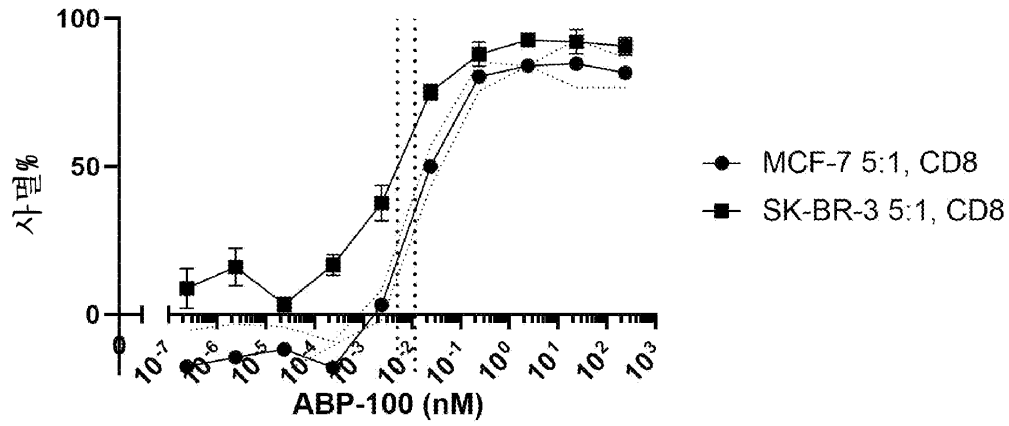


도면8a



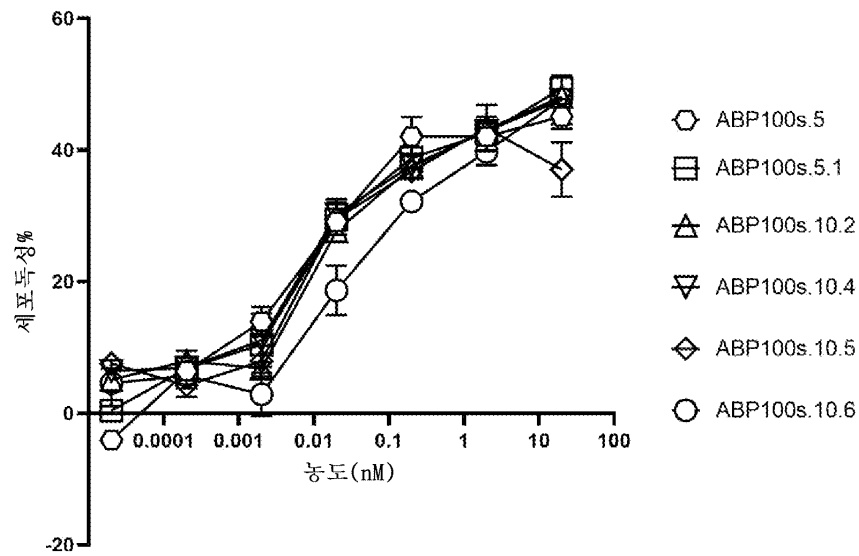
도면8b

ABP100 TDCC 검정 (Cell Titer Glo 2.0)
SK-BR-3 및 MCF-7 표적 세포

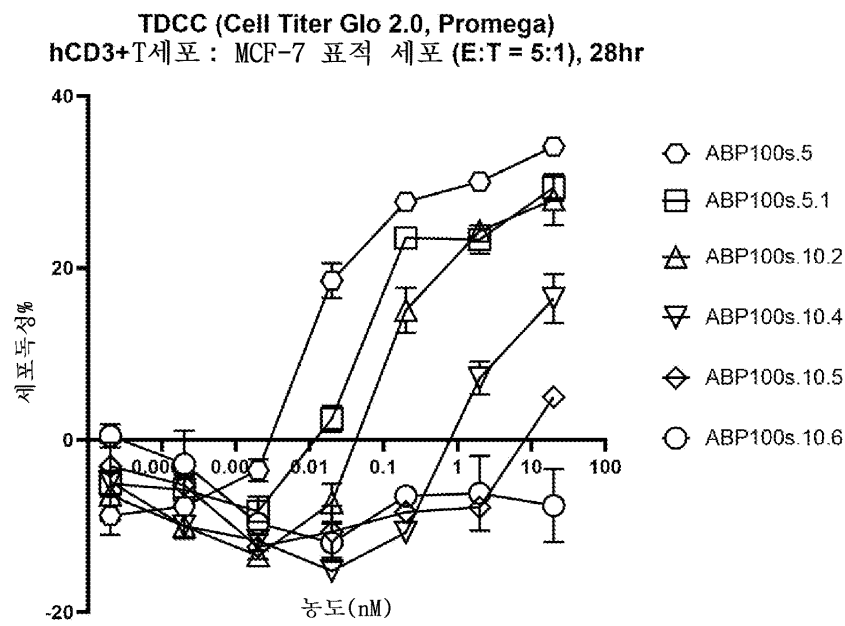


도면9a

TDCC (Cell Titer Glo 2.0, Promega)
hCD3+T세포 : SK-BR-3 표적 세포 (E:T = 5:1), 28hr



도면9b



도면10a

클론명	CD3 친화도 (고/저/중간)	Kd	HER2 친화도 (고/저/중간)	Kd
ABP100s.1	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.2	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.3	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.4	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.5	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.6	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.7	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.5.1	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.5.2	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.5.3	저	>100nM	고	<2nM
ABP100s.5.4	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.10.0	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.10.1	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.10.2	고	<10nM	중간	2 - 30nM
ABP100s.10.3	고	<10nM	중간	2 - 30nM
ABP100s.10.4	고	<10nM	중간	2 - 30nM
ABP100s.10.5	고	<10nM	저	>30nM
ABP100s.10.6	고	<10nM	저	>30nM
ABP100s.10.0.1	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.10.0.2	중간	10 - 100nM	고	<2nM

도면10b

클론명	CD3 친화도 (고/저/중간)	Kd	HER2 친화도 (고/저/중간)	Kd
ABP100s.10.0.3	중간	10 - 100nM	고	<2nM
ABP100s.10.0.4	중간	10 - 100nM	고	<2nM
ABP100s.10.0.5	저	>100nM	고	<2nM
ABP100s.10.0.6	저	>100nM	고	<2nM
ABP100s.10.5.1	고	<10nM	저	>30nM
ABP100s.10.5.2	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.5.3	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.5.4	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.5.5	저	>100nM	저	>30nM
ABP100s.10.5.6	저	>100nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.1	고	<10nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.2	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.3	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.4	중간	10 - 100nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.5	저	≥100nM	저	>30nM
ABP100s.10.6.6	저	≥100nM	저	>30nM
ABP100s.11.0	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.11.5	고	<10nM	저	<2nM
ABP100s.12.0	고	<10nM	고	<2nM
ABP100s.12.5	고	<10nM	저	<2nM

도면11a

도 11		
	HC aa 서열	LC aa 서열
ABP 100s .13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIDTYIHWRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQM NSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQ GLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTT SNYANWVQKPGQAFRLIGGTNKRAPWTPARF GSLIGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWV FGGGTKLTVL (서열번호 61)
ABP 100s .14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIDTYIHWRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQM NSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQ GLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTT SNYANWVQKPGQAFRLIGGTNKRAPWTPARF GSLIGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWV FGGGTKLTVL (서열번호 62)
ABP 100s .15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIDTYIHWRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQMN SLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGT LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGSAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTS NYANWVQKPGQAFRLIGGTNKRAPWTPARFS GSLIGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWV FGGGTKLTVL (서열번호 63)

도면11b

도 11		
	HC aa 서열	LC aa 서열
ABP 100s .16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FN IKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFY AMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQY A STYRVVSVTLVHQQDWLNGKEYK C A V SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSA SFLY SGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQHY TPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT S GGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASG FTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKSSLYLQMN SLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS GGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQKPGQAFRGLIGGTNKRAPWTPARFS GSLIGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVF GGGKTLTVL (서열번호 64)
ABP 100s .17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FN IKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFY AMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQY A STYRVVSVTLVHQQDWLNGKEYK C A V SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSA SFLY SGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQHY TPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT S GGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASG FTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQMN NSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSS GGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNKKASWTPARF SGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLW VFGGGKTLTVL (서열번호 65)
ABP 100s .18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FN IKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFY AMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQY A STYRVVSVTLVHQQDWLNGKEYK C A V SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSA SFLY SGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQHY TPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT S GGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASG FTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSSLYLQMN NSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSS GGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNKKASWTPARF SGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLW VFGGGKTLTVL (서열번호 66)
ABP 100s .19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FN IKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFY AMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICN	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSA SFLY SGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQHY TPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT

도면11c

도 11		
	HC aa 서열	LC aa 서열
	VNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	TLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQMN SLRAEDTAVYVCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGQAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKKASWTPARFS GSLLDGKAALTLSGAQPEDEAEYCALWYSNLWV FGGGTKLTVL (서열번호 67)
ABP 100s .20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWS NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKSSLYLQMN SLRAEDTAVYVCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGQAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAFRGLIGGTNKKASWTPARFS GSLLDGKAALTLSGAQPEDEAEYCALWYSNLWV FGGGTKLTVL (서열번호 68)
ABP 100s .21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWS NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSSLYLQM NSLKTEDTAVYVCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT TLVTSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGQAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTT SNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRASGVPDRF SGSLLDGKAALTITGAQADESDYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL (서열번호 69)
ABP 100s .22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWS NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECT SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSSLYLQM NSLKTEDTAVYVCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT

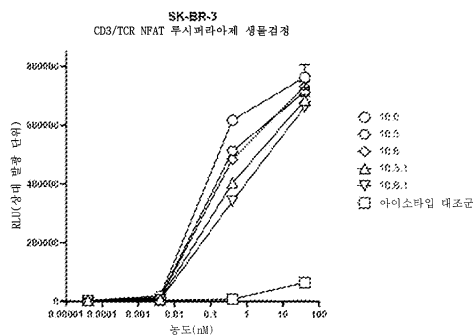
도면11d

[illegible]

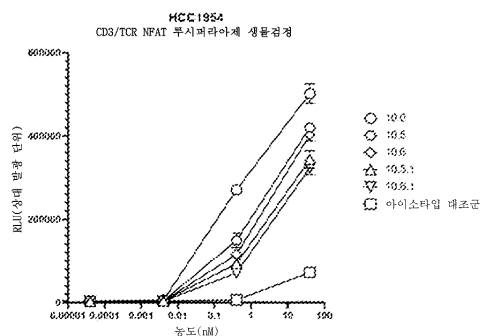
도면12

클론명	CD3 친화도 (고/저/중간)	Kd	HER2 친화도 (고/저/중간)	Kd
ABP100s.13	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.14	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.15	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.16	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.17	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.18	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.19	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.20	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.21	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.22	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.23	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM
ABP100s.24	고	<10nM	고 (HER2)	<2nM

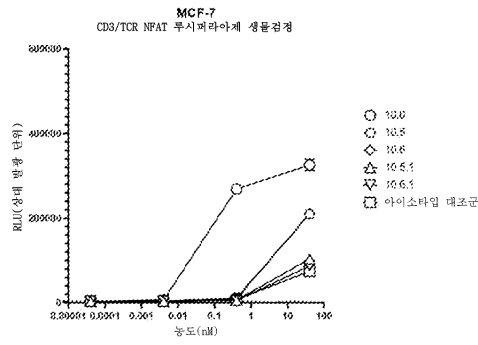
도면13a



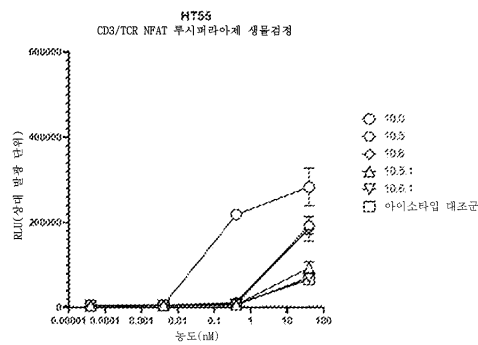
도면13b



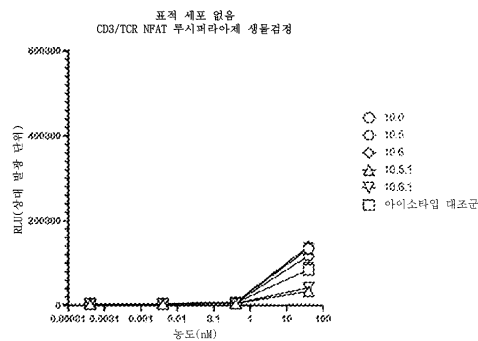
도면13c



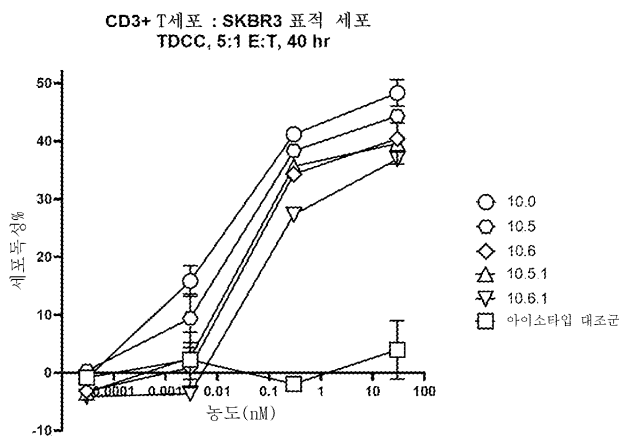
도면13d



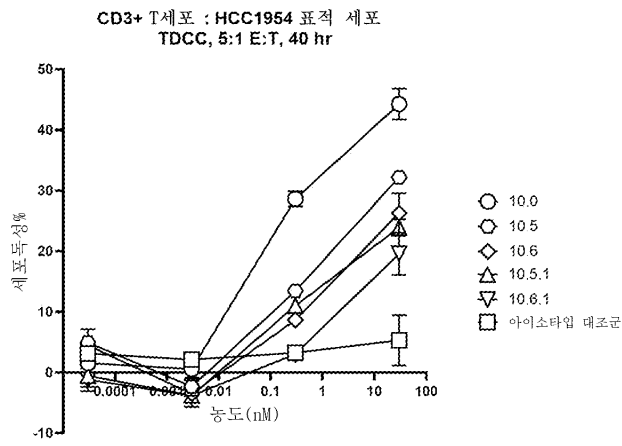
도면13e



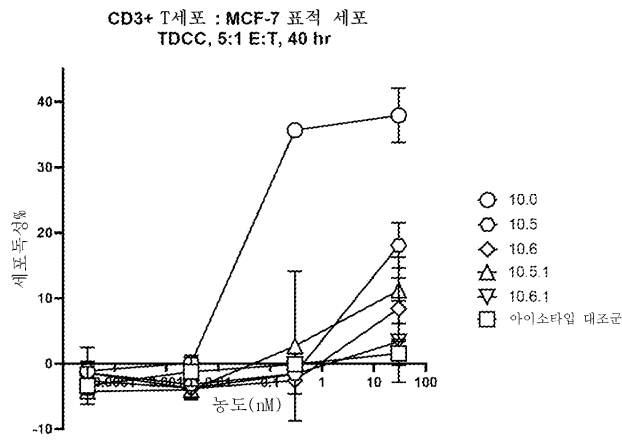
도면14a



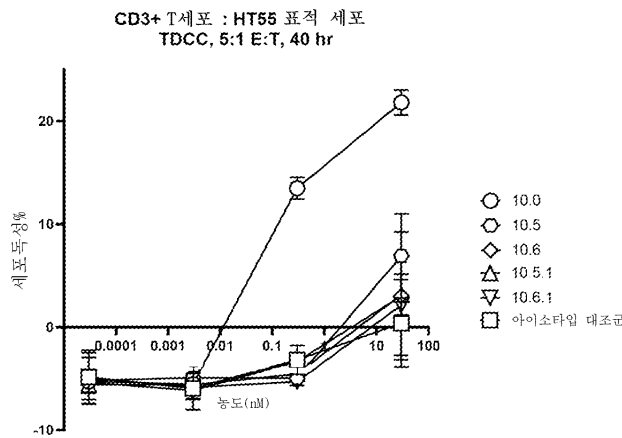
도면14b



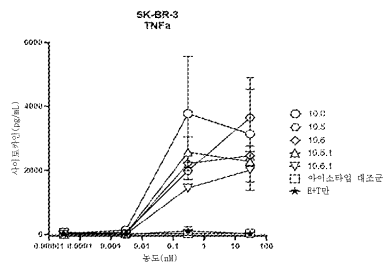
도면14c



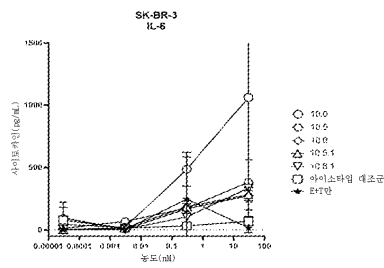
도면14d



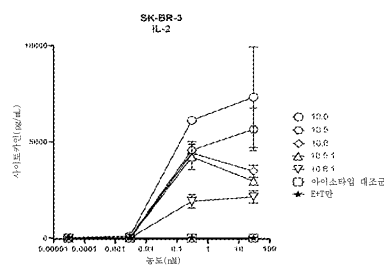
도면15a



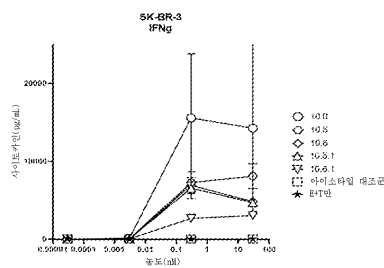
도면15b



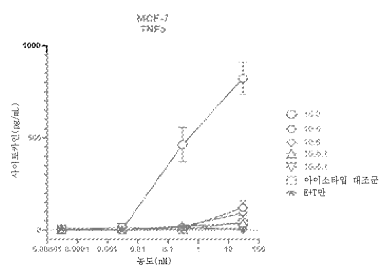
도면15c



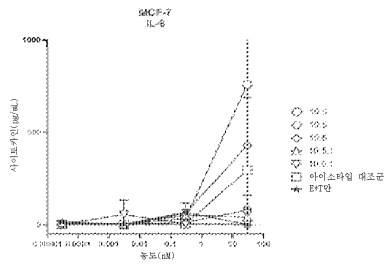
도면15d



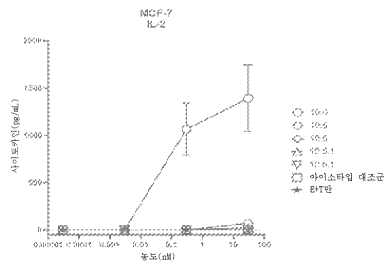
도면15e



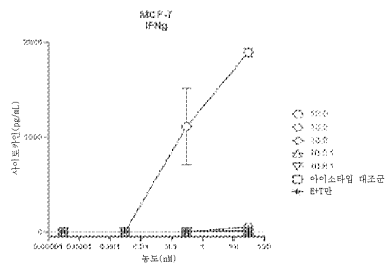
도면15f



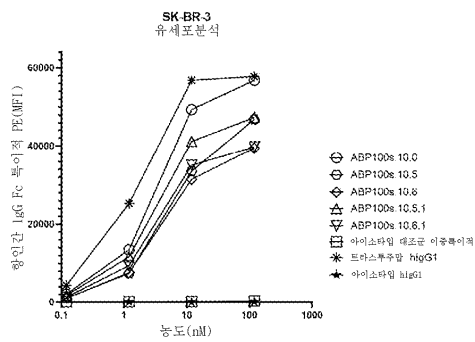
도면15g



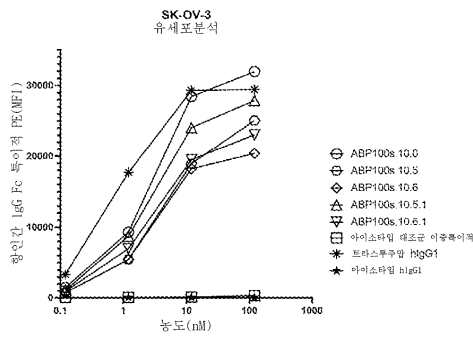
도면15h



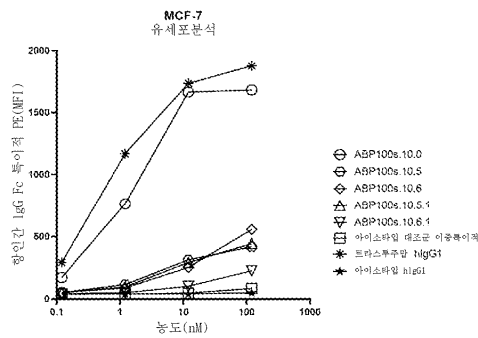
도면16a



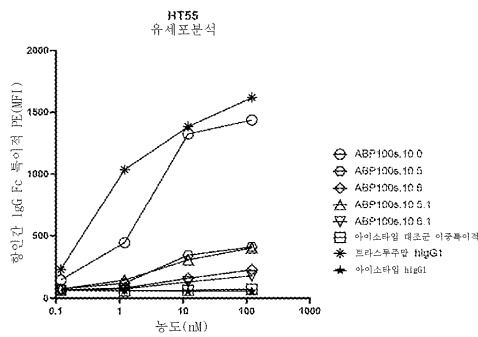
도면16b



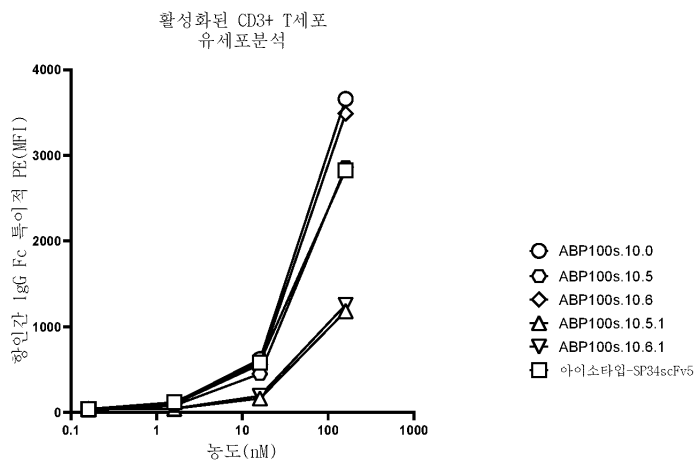
도면16c



도면16d



도면16e



도면17a

포획	분석물	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
10.0 (Fab-hIgG1)	HuHer2	1.01E+01	1.81E+05	1.13E-04	6.22E-10	132.1
10.0 (Fab-hIgG1)	CynoHer2	6.14E+00	1.81E+05	1.46E-03	8.09E-09	129.8

포획	분석물	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
10.5	HuHer2	1.11E+01	2.04E+05	8.24E-03	4.04E-08	543.5
10.5	CynoHer2	8.60E+00	1.66E+05	5.53E-03	3.33E-08	565.1

포획	분석물	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
10.6	HuHer2	3.88E+00	2.98E+05	1.99E-02	6.69E-08	176.1
10.6	CynoHer2	4.99E+00	1.76E+06	1.13E-01	6.45E-08	114.1

도면17b

포획	분석물	Chi ² (RU ²)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
10.0 (Fab-hIgG1)	HuCD3	1.67E+00	8.49E+05	1.74E-03	2.06E-09	30.1
10.0 (Fab-hIgG1)	HuCD3	1.97E-01	2.36E+05	3.38E-04	1.44E-09	25.7
10.0 (Fab-hIgG1)	HuCD3	1.43E-01	2.11E+05	3.81E-04	1.81E-09	25
10.0 (Fab-hIgG1)	HuCD3	1.43E-01	2.02E+05	3.65E-04	1.81E-09	25

10.0 (Fab-hIgG1)	CynoCD3	1.60E-01	2.66E+05	1.05E-03	3.95E-09	20.9
10.0 (Fab-hIgG1)	CynoCD3	2.89E-01	2.87E+05	1.05E-03	3.64E-09	25
10.0 (Fab-hIgG1)	CynoCD3	1.87E-01	2.69E+05	1.02E-03	3.78E-09	23.8
10.0 (Fab-hIgG1)	CynoCD3	1.41E+00	1.39E+05	7.36E-04	5.31E-09	30.1

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.