



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0004850  
(43) 공개일자 2018년01월12일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><b>A61K 39/395</b> (2006.01) <b>C07K 16/32</b> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><b>A61K 39/395</b> (2013.01)<br/><b>A61K 39/39558</b> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 <b>10-2018-7000071(분할)</b></p> <p>(22) 출원일자(국제) <b>2005년07월15일</b><br/>심사청구일자 <b>없음</b></p> <p>(62) 원출원 <b>특허 10-2017-7012110</b><br/>원출원일자(국제) <b>2005년07월15일</b><br/>심사청구일자 <b>2017년05월31일</b></p> <p>(85) 번역문제출일자 <b>2018년01월02일</b></p> <p>(86) 국제출원번호 <b>PCT/US2005/025084</b></p> <p>(87) 국제공개번호 <b>WO 2006/033700</b><br/>국제공개일자 <b>2006년03월30일</b></p> <p>(30) 우선권주장<br/><b>60/590,202 2004년07월22일 미국(US)</b></p> | <p>(71) 출원인<br/><b>제넨테크, 인크.</b><br/>미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우<br/>쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자<br/><b>카오, 융-시양</b><br/>미국 94403 캘리포니아주 샌 마테오 피코 애비뉴<br/>760<br/><b>반데르란, 마틴</b><br/>미국 94122 캘리포니아주 샌 프란시스코 14번 애<br/>비뉴 1626</p> <p>(74) 대리인<br/><b>양영준, 이귀동</b></p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **HER 2 항체 조성물**

(57) 요약

HER2의 도메인 II에 결합하는 주요종 HER2 항체, 및 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함하는 조성물이 개시된다. 또한, 상기 조성물을 포함하는 제약 제제, 조성물에 대한 치료 용도가 개시된다.

대표도

```

1      15      30      45
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S

46      60      75      90
Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F

91      105     120     135
T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F

136     150     165     180
I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E

181     195     210     225
S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T

226     233
K S F N R G E C (서열 17)
    
```

(52) CPC특허분류  
*C07K 16/32* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) HER2의 도메인 II에 결합하고, 서열 3의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 4의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 주요종 HER2 항체 및 (b) VHS- (Val-His-Ser-)를 포함하는 아미노-말단 선도자 연장물(leader extension)을 포함하는 주요종 HER2 항체를 포함하고,

양이온 교환 분석에 의해 정량된 바로, 조성물 중의 5% 내지 15%의 항체 분자가 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하며,

제조합적으로 유전자조작된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의해 산업적 규모로 제조된 암 치료용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 아미노-말단 선도자 연장물이 VHS- 연장물을 포함하는 항체의 경쇄 상에 있는 것인 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 아미노-말단 선도자 연장물이 VHS- 연장물을 포함하는 항체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 있는 것인 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 주요종 HER2 항체 및 VHS- 연장물을 포함하는 항체가 모두 비손상(intact) 항체인 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 주요종 HER2 항체가 서열 15의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 16의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, (a) 주요종 HER2 항체의 중쇄 하나 또는 둘다 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 주요종 HER2 항체, (b) 주요종 HER2 항체의 1개 또는 2개의 중쇄 상의 Asn-386, Asn-391, 또는 Asn-386 및 Asn-391 모두가 탈아미드화된(deamidated) 주요종 HER2 항체, 및 (c) 서열 16의 met-254에 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 갖는 주요종 HER2 항체를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 아미노-말단 선도자 연장물이 VHS- 로 이루어지는 것인 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, (a) 주요종 HER2 항체의 중쇄 잔기 299에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 포함하는 주요종 HER2 항체 및 (b) 비-글리코실화된 중쇄를 포함하는 주요종 HER2 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 주요종 HER2 항체의 글리코실화 변이체를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 주요종 HER2 항체가 HER2의 도메인 I, II 및 III 사이의 연결부에 결합하는 것인 조성물.

#### 청구항 10

제약상 허용가능한 담체 중에 제1항의 조성물을 포함하는 암 치료용 제약 제제.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 멸균된 제약 제제.

## 청구항 12

(a) 서열 3의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 4의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 주요종 HER2 항체 및  
(b) 그의 1개 또는 2개의 경쇄 가변 영역 상에 부착된 VHS- (Val-His-Ser-) 아미노-말단 설폰자 연장물을 포함하는 주요종 HER2 항체를 포함하고,

조성물 중의 5% 내지 20%의 항체 분자가 VHS- 아미노-말단 설폰자 연장물을 포함하며,

재조합적으로 유전자조작된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의해 산업적 규모로 제조된 암 치료용 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 HER2의 도메인 II에 결합하는 주요종 HER2 항체, 및 아미노-말단 설폰자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 제약 제제 및 상기 조성물의 치료 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] HER2 항체

[0003] 수용체 티로신 키나제의 HER 족은 세포 성장, 분화 및 생존의 중요한 매개자이다. 상기 수용체 족은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1 또는 HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 비롯한 4개의 별개의 구성원을 포함한다.

[0004] *erbB1* 유전자에 의해 코딩되는 EGFR은 인과관계로 인간 악성종양과 관련되었다. 특히, EGFR의 발현의 증가는 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암 및 위암, 뿐만 아니라 교모세포종에서 관찰되었다. EGFR 수용체 발현의 증가는 종종 자가분비성 자극 경로에 의한 수용체 활성화를 초래하는 동일한 종양 세포에 의해, EGFR 리간드, 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ )의 생성의 증가를 수반한다 (문헌 [Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)]). EGFR 또는 그의 리간드, TGF- $\alpha$  및 EGF에 대해 지정된 모노클로날 항체는 이러한 악성 종양의 치료에 있어서 치료제로서 평가되어 왔다. 예를 들어 바셀가(Baselga) 및 멘델존(Mendelsohn)의 상기 문헌; 문헌 [Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984)]; 및 [Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995)]을 참조한다.

[0005] HER 족의 제2 구성원인 p185<sup>neu</sup>는 원래 화학적으로 처리된 래트의 신경모세포종으로부터의 형질전환 유전자의 생성으로서 확인되었다. *neu* 원발암유전자의 활성화된 형태는 코딩된 단백질의 막관통 영역 내의 점 돌연변이 (발린이 글루탐산으로)로부터 초래되었다. *neu*의 인간 동족체의 증폭은 유방암 및 난소암에서 관찰되며, 나쁜 예후와 상호관련된다 (문헌 [Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)]; [Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989)]; 및 미국 특허 제4,968,603호). 지금까지, 인간 종양에 대해 *neu* 원발암유전자에서 그와 유사한 점 돌연변이는 보고되지 않았다. HER2의 과발현 (빈번하지만 균일하지 않게 유전자 증폭에 기인함)은 또한 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상샘, 췌장 및 방광의 암종을 비롯한 기타 암종에서 관찰되었다. 다른 것들에 대해서는 문헌 [King et al., *Science*, 229:974 (1985)]; [Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986)]; [Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986)]; [Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988)]; [Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989)]; [Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991)]; [Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990)]; [Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990)]; [Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990)]; [Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989)]; [Zhou et al., *Mol Carcinog.*, 3:254-257 (1990)]; [Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988)]; [Williams et al. *Pathobiology* 59:46-52 (1991)]; 및 [McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990)]를 참조한다. HER2는 전립선암에서 과발현될 수 있다 (문헌 [Gu et al. *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996)]; [Ross et al. *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997)]; [Ross et al. *Cancer* 79:2162-70 (1997)]; 및 [Sadasivan et al. *J. Urol.* 150:126-31 (1993)]).

[0006] 래트 p185<sup>neu</sup> 및 인간 HER2 단백질 생성물에 대해 지정된 항체가 기재되었다. 드레빈(Drebin)과 동료들은 래트

*neu* 유전자 생성물인 p185<sup>neu</sup>에 대한 항체를 발생시켰다. 예를 들어 문헌 [Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985)]; [Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991)]; 및 WO 94/22478을 참조한다. 문헌 [Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988)]은 p185<sup>neu</sup>의 2개의 별개의 영역과 반응성인 항체의 혼합물이, 누드 마우스 내로 이식된 *neu*-형질전환된 NIH-3T3 세포에 대한 상승적인 항종양 효과를 초래함을 보고하고 있다. 또한 1998년 10월 20일자로 허여된 미국 특허 제5,824,311호를 참조한다.

[0007] 문헌 [Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)]에는 인간 유방 종양 세포주 SK-BR-3을 사용하는 것을 특징으로 한 HER2 항체 패널의 생성이 기재되어 있다. 항체에의 노출 후의 SK-BR-3 세포의 상대적 세포 증식을 72시간 후 단층의 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 측정하였다. 상기 분석을 이용하여, 세포 증식을 56%로 억제하는 4D5로 불리는 항체로 최대 억제를 획득하였다. 상기 분석에서 패널 내의 다른 항체는 보다 적은 정도로 세포 증식을 감소시켰다. 항체 4D5는 또한 TNF- $\alpha$ 의 세포독성 효과에 대해 HER2-과발현 유방 종양 세포주를 감작화하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 예를 들어 1997년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 제5,677,171호를 참조한다. 문헌 [Hudziak et al.]에서 논의된 HER2 항체는 문헌 [Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)]; [Kotts et al. *In Vitro* 26(3):59A (1990)]; [Sarup et al. *Growth Regulation* 1:72-82 (1991)]; [Shepard et al. *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991)]; [Kumar et al. *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991)]; [Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)]; [Pietras et al. *Oncogene* 9:1829-1838 (1994)]; [Vitetta et al. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994)]; [Sliwkowski et al. *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994)]; [Scott et al. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991)]; [D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994)]; [Lewis et al. *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)]; 및 [Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]에서 추가로 특성화되었다.

[0008] 무린 HER2 항체 4D5의 재조합 인간화 형태 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, 트라스투주마브(Trastuzumab) 또는 헤르셉틴(HERCEPTIN)(등록상표); 미국 특허 제5,821,337호)는 항암 요법 전에 대량으로 투여받은 HER2-과발현 전이성 유방암을 갖는 환자에서 임상적으로 활성이다 (문헌 [Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)]). 트라스투주마브는 그의 종양이 HER2 단백질을 과발현하는 전이성 유방암을 갖는 환자의 치료에 대해 1998년 9월 25일자로 식품 의약품 안전청으로부터 시판 승인을 받았다.

[0009] 다양한 특성을 갖는 다른 HER2 항체는 문헌 [Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991)]; [McKenzie et al. *Oncogene* 4:543-548 (1989)]; [Maier et al. *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991)]; [Bacus et al. *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990)]; [Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)]; [Bacus et al. *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992)]; [Xu et al. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993)]; WO 94/00136; [Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992)]; [Hancock et al. *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991)]; [Shawver et al. *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994)]; [Arteaga et al. *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994)]; [Harwerth et al. *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992)]; 미국 특허 제5,783,186호; 및 [Klapper et al. *Oncogene* 14:2099-2109 (1997)]에 기재되었다.

[0010] 상동성 스크리닝으로 2가지 다른 HER 수용체 족 구성원, 즉 HER3 (미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호, 및 문헌 [Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)]) 및 HER4 (유럽 특허 출원 제599,274호; 문헌 [Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)]; 및 [Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)])를 확인하였다. 상기 수용체 둘다는 적어도 일부의 유방암 세포주 상에 증가된 발현을 나타낸다.

[0011] HER 수용체는 일반적으로 세포 내의 다양한 배합물에서 발견되며, 이중이량체화는 다양한 HER 리간드에 대한 세포 반응의 다양성을 증가시키는 것으로 여겨진다 (문헌 [Earp et al. *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132 (1995)]). EGFR은 6가지 상이한 리간드에 의해 결합된다: 표피 성장 인자 (EGF), 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ ), 암피레굴린, 헤파린 결합 표피 성장 인자 (HB-EGF), 베타셀룰린 및 에피레굴린 (문헌 [Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]). 단일 유전자의 별도의 스플라이싱으로부터 초래되는 헤레굴린 단백질의 족은 HER3 및 HER4에 대한 리간드이다. 헤레굴린 족은 알파, 베타 및 감마 헤레굴린 (문헌 [Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)]; 미국 특허 제5,641,869호; 및 [Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]); neu 분화 인자 (NDF), 아교 성장 인자 (GGF); 아세틸콜린 수용체 유도 활성 (ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유래된 인자 (SMDF)를 포함한다. 검토를 위해, 문헌 [Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]; [Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996)] 및 [Lee et al. *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995)]를 참고한다. 최근에, 3가지 추가의 HER 리간드가 확인되었다; HER3 또는 HER4에 결합하는 것으로 보고

된 뉴레귤린-2 (NRG-2) (문헌 [Chang et al. *Nature* 387 509-512 (1997)]; 및 [Carraway et al. *Nature* 387:512-516 (1997)]); HER4에 결합하는 뉴레귤린-3 ([Zhang et al. *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)]); 및 HER4에 결합하는 뉴레귤린-4 ([Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)]). HB-EGF, 베타셀룰린 및 에피레귤린도 HER4에 결합한다.

[0012] EGF 및 TGF- $\alpha$ 는 HER2에 결합하지 않는 반면, EGF는 EGFR 및 HER2를 자극하여 이중이량체를 형성하고, 이는 EGFR을 활성화시키며 이중이량체 내의 HER2의 인산전달을 초래한다. 이량체화 및/또는 인산전달은 HER2 티로신 키나제를 활성화시키는 것으로 보인다. 이어프(Earp) 등의 상기 문헌을 참조한다. 또한, HER3이 HER2와 공동 발현될 경우, 활성 신호전달 복합체가 형성되며, HER2에 대해 지정된 항체는 상기 복합체를 파괴시킬 수 있다 (문헌 [Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]). 또한, 헤레귤린 (HRG)에 대한 HER3의 친화도는 HER2와 공동발현될 경우 보다 높은 친화도 상태로 증가된다. 또한, HER2-HER3 단백질 복합체에 대해서는 문헌 [Levi et al., *Journal of Neuroscience* 15:1329-1340 (1995)]; [Morrissey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435 (1995)]; 및 [Lewis et al., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996)]을 참고한다. HER3과 마찬가지로, HER4는 HER2와 활성 신호전달 복합체를 형성한다 (문헌 [Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)]).

[0013] HER 신호전달 경로를 표적화하기 위해, rhuMAB 2C4 (페르투주마브, OMNITARG(상표명))는 다른 HER 수용체와 HER2의 이량체화를 억제하여 리간드-유래된 인산화 및 활성화, 및 RAS 및 AKT 경로의 하류 활성화를 억제하는 인간화 항체로서 개발되었다. 고형 종양의 치료용 단일 제제로서 페르투주마브(Pertuzumab)의 I상 시험에서, 진행된 난소암을 갖는 3가지 대상체를 페르투주마브로 처리하였다. 하나는 이중 부분 반응을 가졌고, 추가의 대상체는 15주 동안 안정한 질환을 가졌다 (문헌 [Agus et al. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:192, Abstract 771 (2003)]).

[0014] 항체 변이체 조성물

[0015] 미국 특허 제6,339,142호에는 항-HER2 항체, 및 산성 변이체(들)의 양이 약 25% 미만인 1종 이상의 그의 산성 변이체의 혼합물을 포함하는 HER2 항체 조성물이 기재되어 있다. 트라스투주마브는 예시된 HER2 항체이다.

[0016] 문헌 [Reid et al. Poster presented at Well Characterized Biotech Pharmaceuticals conference (January, 2003) "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics"]에는 그의 중쇄 상에 VHS 신호 펩티드, N-말단 글루타민 및 피로글루탐산의 조합물에 기인한 N-말단 이질성분을 갖는 비명명된 인간화 IgG1항체 조성물이 기재되어 있다.

[0017] 문헌 [Reed et al. "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" Poster presented at the IBC Antibody Production Conference (February, 2002)]는 E25의 중쇄 상의 VHS 연장물, 인간화 항-IgE 항체를 보고하고 있다.

[0018] 문헌 [Rouse et al. Poster presented at WCBP "'Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development" (January 6-9, 2004)]에는 그의 경쇄 상에  $^{-3}$ AHS 또는  $^{-2}$ HS로부터 기인하는 N-말단 이질성분을 갖는 모노클로날 항체 조성물이 기재되어 있다.

[0019] 문헌 [IBC Meeting (September, 2000) "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biloligicals"]의 발표에서, 질 포터(Jill Porter)는 그의 중쇄 상에 3개의 여분의 아미노산 잔기를 갖는 제나팍스(ZENAPAX)(상표명)의 후기-용출 형태에 대해 논의하고 있다.

## 발명의 내용

[0020] 발명의 요약

[0021] 본 발명은 HER2의 도메인 II에 결합하는 주요종 HER2 항체, 및 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0022] 또한, 본 발명은 각각 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 서열을 포함하는 주요종 HER2 항체, 및 그의 1개 또는 2개의 가변 경쇄 도메인에 부착된 VHS- 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 주요종 항체의 아미노산 서열 변이체를 포함하며, 조성물 중의 약 1% 내지 약 20%의 항체 분자가 VHS- 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 서열 23의 아미노산 서열, 또는 그의 탈아미드화된(deamidated) 및/또는 산화된 변이체를 포함하는 폴리펩티드, 및 (a) 상기 폴리펩티드를 포함하는 경쇄, 및 (b) 서열 16 및 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 및 서열 16 또는 24의 탈아미드화된 및/또는 산화된 변이체를 포함하는 중쇄를 포함하는 항체에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은 또한 제약상 허용되는 담체 중에 상기 조성물을 포함하는 제약 제제, 및 상기 제약 제제를 암 치료 유효량으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서의 HER2-발현 암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0025] HER2 항체를 사용한 치료는 질환의 징후 또는 증상의 개선을 초래할 것이다. 예를 들어, 치료될 질환이 암일 경우, 이러한 치료요법은 생존 (전체 생존 및/또는 진행이 없는 생존)의 개선을 초래할 수 있고/거나 객관적인 임상적 반응 (부분적 또는 완전한)을 초래할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 HER2 단백질 구조, 및 그의 세포외 도메인의 도메인 I 내지 IV (각각 서열 19 내지 22)에 대한 아미노산 서열의 개략도를 제공한다.

도 2a 및 2b는 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 가변 경쇄 ( $V_L$ ) (도 2a) 및 가변 중쇄 ( $V_H$ ) (도 2b) 도메인 (각각 서열 1 및 2); 인간화 2C4 형태 574의  $V_L$  및  $V_H$  도메인 (각각 서열 3 및 4), 및 인간  $V_L$  및  $V_H$  컨센서스 프레임워크(consensus framework) (hum  $\kappa$ 1, 경쇄 카파 하위군 I; humIII, 중쇄 하위군 III) (각각 서열 5 및 6)의 정렬을 나타낸다. 별표는 인간화 2C4 형태 574와 뮤린 모노클로날 항체 2C4 사이 또는 인간화 2C4 형태 574와 인간 프레임워크 사이의 차이를 확인한다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 괄호 안에 있다.

도 3a 및 3b는 페르투주마브 경쇄 (서열 15) 및 중쇄 (서열 16)의 아미노산 서열을 나타낸다. CDR은 굵은 글씨로 표시된다. 탄수화물 부분은 중쇄의 Asn 299에 부착된다.

도 4a 및 4b는 페르투주마브 경쇄 (서열 17) 및 각각 비손상(intact) 아미노 말단 신호 펩티드 서열 (서열 18)을 포함하는 중쇄의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 5는 HER2의 이종이량체 결합 부위에서의 2C4의 결합, 및 그로 인한 활성화된 EGFR 또는 HER3와의 이종이량체화의 방지를 개략적으로 나타낸다.

도 6은 MAPK 및 Akt 경로에 대한 HER2/HER3의 커플링을 나타낸다.

도 7은 트라스투주마브와 페르투주마브의 활성을 비교한다.

도 8a 및 8b는 환원된 페르투주마브 경쇄 (도 8a) 및 중쇄 (도 8b)의 재구성된 질량 스펙트럼을 나타낸다.

도 9a 및 9b는 천연 페르투주마브 (도 9a) 및 CPB-소화된 페르투주마브 (도 9b)의 양이온 교환 크로마토그래피 분석을 나타낸다.

도 10은 페르투주마브의 크기 배제 크로마토그래피 분석을 나타낸다.

도 11a 및 11b는 환원된 페르투주마브 (도 11a) 및 비손상 페르투주마브 (도 11b)의 CE-SDS-LIF 분석을 나타낸다.

도 12a 및 12b는 페르투주마브의 트립신 펩티드 지도 (도 12a), 및 페르투주마브의 LYS-C 펩티드 지도 (도 12b)를 나타낸다.

도 13은 페르투주마브로부터 방출된 N-연결된 올리고당류의 CE 분석을 나타낸다.

도 14a 및 14b는 IgG 항체에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조를 나타낸다.

도 15는 페르투주마브로부터 방출된 중성 올리고당류의 양성 모드 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸다.

도 16a 및 16b는 트라스투주마브 경쇄 (서열 13) 및 중쇄 (서열 14)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 17a 및 17b는 변이체 페르투주마브 경쇄 서열 (서열 23) 및 변이체 페르투주마브 중쇄 서열 (서열 24)을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] I. 정의
- [0028] 본원에서 "주요종 항체"라는 용어는 조성물 중에 양적으로 우세한 항체 분자인, 조성물 중의 항체 아미노산 서열 구조를 지칭한다. 바람직하게는, 주요종 항체는 HER2의 도메인 II에 결합하는 항체, HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는 항체, 및/또는 HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 항체와 같은 HER2 항체이다. 주요종 항체의 본원에서 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것(페르투주마브)이다.
- [0029] 본원에서 "아미노산 서열 변이체" 항체는 주요종 항체와 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 주요종 항체와 약 70% 이상의 상동성을 가질 것이며, 바람직하게는 이는 주요종 항체와 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상 상동성일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 주요종 항체의 아미노산 서열 내에 또는 그에 인접한 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 첨가를 갖는다. 본원에서 아미노산 서열 변이체의 예로는 산성 변이체(예를 들어 탈아미드화된 항체 변이체), 염기성 변이체, 그의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 선포자 연장물(예를 들어 VHS-)를 갖는 항체, 그의 1개 또는 2개의 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 갖는 항체, 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 갖는 항체 등을 들 수 있으며, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 대한 변이의 조합을 포함한다. 본원에서 특정 관심의 항체 변이체는 그의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 선포자 연장물을 포함하며, 임의로 주요종 항체에 대해 다른 아미노산 서열 및/또는 글리코실화 차이를 추가로 포함하는 항체이다.
- [0030] 본원에서 "글리코실화 변이체" 항체는 주요종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 부분과 상이한 그에 부착된 하나 이상의 탄수화물 부분을 갖는 항체이다. 본원에서 글리코실화 변이체의 예로는 G0 올리고당류 구조 대신 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 갖는 항체, 그의 1개 또는 2개의 경쇄에 부착된 1개 또는 2개의 탄수화물 부분을 갖는 항체, 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 없는 항체 등, 뿐만 아니라 이러한 글리코실화 변경의 조합을 들 수 있다.
- [0031] 항체가 Fc 영역을 가질 경우, 본원에서 도 14a 및 14b에 나타난 것과 같은 올리고당류 구조는 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에, 예를 들어 잔기 299에 부착될 수 있다. 페르투주마브에 대해, G0이 우세한 올리고당류 구조였으며, G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 및 G2와 같은 다른 올리고당류 구조는 페르투주마브 조성물에 보다 적은 양으로 발견되었다.
- [0032] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 "G1 올리고당류 구조"는 G1(1-6) 및 G1(1-3) 구조를 포함한다.
- [0033] 본원에서 "아미노-말단 선포자 연장물"은 항체의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에 존재하는 아미노-말단 선포자 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 예시적인 아미노-말단 선포자 연장물은 항체 변이체의 경쇄 하나 또는 둘다 상에 존재하는 3개의 아미노산 잔기, VHS를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0034] "탈아미드화된" 항체는 그의 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 예를 들어 아스파르트산, 숙신이미드 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.
- [0035] "상동성"은 필요할 경우 최대 퍼센트의 상동성을 달성하기 위해 서열 및 도입 틈(introducing gap)을 정렬한 후에 동일한 아미노산 서열 변이체 중의 잔기의 퍼센트로 정의된다. 정렬 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 하나는 1991년 12월 10일자로 미국 DC 20559 워싱턴에 소재하는 유나이티드 스테이츠 카피라이트 오피스(United States Copyright Office)에 유저 문서로 제출된 제네텍, 인크(Genentech, Inc.)에 의해 저술된 "얼라인 2(Align 2)"이다.
- [0036] 본원의 목적을 위해, "양이온 교환 분석"은 2개 이상의 화합물을 포함하는 조성물이 양이온 교환제를 사용하여 전하 차이에 기초하여 분리되는 임의의 방법을 지칭한다. 양이온 교환제는 일반적으로 공유 결합된 음으로 하전된 기를 포함한다. 바람직하게는, 본원에서 양이온 교환제는 약 양이온 교환제이며/거나 디오넥스(Dionex)에서 판매하는 프로파크(PROPAC) WCX-10(상표명) 양이온 교환 컬럼과 같은 카르복실화 관능기를 포함한다.
- [0037] "HER 수용체"는 HER 수용체 족에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이며, EGFR, HER2, HER3 및 HER4 수용체 및 장래에 확인될 상기 족의 다른 구성원을 포함한다. HER 수용체는 일반적으로 HER 리간드에 결합할 수 있는 세포외 도메인, 친지질성 막관통 도메인, 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인, 및 인산화될 수 있는 몇몇 티로신 잔기를 갖는 카르복실-말단 신호전달 도메인을 포함할 것이다. 바람직하게는 HER 수용체는 천연 서열 인간 HER 수용체이다.

- [0038] HER2의 세포외 도메인은 4개의 도메인, 즉 도메인 I (약 1 내지 195의 아미노산 잔기), 도메인 II (약 196 내지 319의 아미노산 잔기), 도메인 III (약 320 내지 488의 아미노산 잔기), 및 도메인 IV (약 489 내지 630의 아미노산 잔기) (신호 펩티드가 없는 잔기 수치)를 포함한다. 문헌 [Garrett et al. *Mol. Cell.* 11:495-505 (2003)], [Cho et al. *Nature* 421:756-760 (2003)], [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)], 또는 [Plowman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993)]을 참조한다. 또한 본원의 도 1을 참조한다.
- [0039] "ErbB1," "HER1", "내피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"이라는 용어는 본원에서 호환적으로 사용되며, 예를 들어 그의 천연 발생 돌연변이체 (예를 들어 문헌 [Humphrey et al. *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)]에서와 같은 결실 돌연변이체 EGFR)를 비롯한 문헌 [Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987)]에 개시된 바와 같은 EGFR을 지칭한다. *erbB1*은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 지칭한다.
- [0040] "ErbB2" 및 "HER2"라는 표현은 본원에서 호환적으로 사용되며, 예를 들어 문헌 [Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985)] 및 [Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986)]에 기재된 인간 HER2 단백질 (Genebank 수탁 번호 X03363)을 지칭한다. "*erbB2*"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 지칭하며, "*neu*"는 p185<sup>neu</sup>를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 바람직한 HER2는 천연 서열 인간 HER2이다.
- [0041] "ErbB3" 및 "HER3"은 예를 들어 미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호, 및 문헌 [Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0042] 본원에서 "ErbB4" 및 "HER4"라는 용어는 예를 들어 유럽 특허 출원 제599,274호, 문헌 [Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)] 및 [Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드, 및 예를 들어 1999년 4월 22일자로 공개된 WO 99/19488에 개시된 바와 같은 그의 이소형(isoform)을 지칭한다.
- [0043] "HER 리간드"는 HER 수용체에 결합하고/거나 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 의미한다. 본원에서 특정 관심의 HER 리간드는 표피 성장 인자 (EGF) (문헌 [Savage et al., *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)]); 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ ) ([Marquardt et al., *Science* 223:1079-1082 (1984)]); 신경조종 또는 각질세포 자가분비 성장 인자로도 알려진 암피레굴린 ([Shoyab et al. *Science* 243:1074-1076 (1989)]; [Kimura et al. *Nature* 348:257-260 (1990)]; 및 [Cook et al. *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)]); 베타셀룰린 ([Shing et al., *Science* 259:1604-1607 (1993)]; 및 [Sasada et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)]); 헤파린-결합 표피 성장 인자 (HB-EGF) ([Higashiyama et al., *Science* 251:936-939 (1991)]); 에피레굴린 ([Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995)]; 및 [Komurasaki et al. *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)]); 헤레굴린 (하기 참조); 뉴레굴린-2 (NRG-2) ([Carraway et al., *Nature* 387:512-516 (1997)]); 뉴레굴린-3 (NRG-3) ([Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)]); 뉴레굴린-4 (NRG-4) ([Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)] 또는 크립토 (CR-1) ([Kannan et al. *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)])와 같은 천연 서열 인간 HER 리간드이다. EGFR에 결합하는 HER 리간드로는 EGF, TGF- $\alpha$ , 암피레굴린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에피레굴린을 들 수 있다. HER3에 결합하는 HER 리간드로는 헤레굴린을 들 수 있다. HER4에 결합할 수 있는 HER 리간드로는 베타셀룰린, 에피레굴린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 및 헤레굴린을 들 수 있다.
- [0044] 본원에서 사용될 경우 "헤레굴린" (HRG)은 미국 특허 제5,641,869호 또는 문헌 [Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]에 개시된 바와 같은 헤레굴린 유전자 생성물에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 헤레굴린의 예로는 헤레굴린- $\alpha$ , 헤레굴린- $\beta$ 1, 헤레굴린- $\beta$ 2 및 헤레굴린- $\beta$ 3 (문헌 [Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)]; 및 미국 특허 제5,641,869호); neu 분화 인자 (NDF) ([Peles et al. *Cell* 69:205-216 (1992)]); 아세틸콜린 수용체-유도 활성화 (ARIA) ([Falls et al. *Cell* 72:801-815 (1993)]); 아교 성장 인자 (GGF) ([Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]); 감각 및 운동 뉴런 유래된 인자 (SMDF) ([Ho et al. *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)]);  $\gamma$ -헤레굴린 ([Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)])을 들 수 있다. 상기 용어는 그의 EGF-유사 도메인 단편 (예를 들어 HRG  $\beta$ 1<sub>177-244</sub>)과 같은 천연 서열 HRG 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편 및/또는 아미노산 서열 변이체를 포함한다.
- [0045] 본원에서 "HER 이량체"는 2개 이상의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유 회합된 이량체이다. 이러한 복합체는 예를 들어 문헌 [Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]에 기재된 바와 같이 2개 이상의 HER 수용체를 발현하는 세포를 HER 리간드에 노출시키고, 면역침전법에 의해 분리하고, SDS-PAGE에 의해 분석할 경우 형성될 수 있다. 이러한 HER 이량체의 예로는 EGFR-HER2, HER2-HER3 및 HER3-HER4 이중이

량체를 들 수 있다. 더욱이, HER 이량체는 HER3, HER4 또는 EGFR과 같은 상이한 HER 수용체와 조합된 2개 이상의 HER2 수용체를 포함할 수 있다. 사이토킨 수용체 서브유닛 (예를 들어 gp130)과 같은 다른 단백질은 이량체와 회합될 수 있다.

[0046] HER2 상의 "이종이량체 결합 부위"는 그와 함께 이량체를 형성할 때 EGFR, HER3 또는 HER4의 세포의 도메인 내의 영역과 접촉하거나 그와 경계하는 HER2의 세포의 도메인 내의 영역을 지칭한다. 상기 영역은 HER2의 도메인 II에서 발견된다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).

[0047] "HER 활성화" 또는 "HER2 활성화"는 임의의 하나 이상의 HER 수용체 또는 HER2 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, HER 활성화는 신호 전달 (예를 들어 HER 수용체 또는 기질 폴리펩티드 내의 티로신 잔기를 인산화하는 HER 수용체의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발됨)을 초래한다. HER 활성화는 관심의 HER 수용체를 포함하는 HER 이량체에 결합하는 HER 리간드에 의해 매개될 수 있다. HER 이량체에 결합하는 HER 리간드는 이량체 내의 하나 이상의 HER 수용체의 키나제 도메인을 활성화시켜 하나 이상의 HER 수용체 내의 티로신 잔기의 인산화 및/또는 Akt 또는 MAPK 세포내 키나제와 같은 추가의 기질 폴리펩티드(들) 내의 티로신 잔기의 인산화를 초래할 수 있다.

[0048] 본원에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 비손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 비손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포괄한다.

[0049] 본원에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단을 포함하는 개별 항체는 본원에 기재된 변이체와 같은 모노클로날 항체의 생성 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고, 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지정된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제조물에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다. 그의 특이성 이외에, 모노클로날 항체는 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 변형어 "모노클로날"은 항체의 특징이 항체의 실질적으로 동종 집단으로부터 수득되는 것을 지칭하며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 처음으로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0050] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 그에 상동성인 반면, 쇠(들)의 나머지는 또다른 종으로부터 유래되거나 또다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 그에 상동성인, "키메라" 항체, 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 관심의 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다.

[0051] "항체 단편"은 바람직하게는 그의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함하는 비손상 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>; 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

[0052] "비손상 항체"는 항원-결합 가변 영역, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (C<sub>L</sub>) 및 중쇄 불변 도메인 (C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3)을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 비손상 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가지며, 그의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 올리고당류 구조를 포함한다.

[0053] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기여가능한 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예로는 C1q 결합; 상보적 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 들 수 있다.

- [0054] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 비손상 항체는 상이한 "부류"로 지정될 수 있다. 비손상 항체에는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 5가지 주요 부류가 있으며, 이들의 몇몇은 "하위부류" (이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 항체에 반응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있다.
- [0055] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (FcR) (예를 들어 자연 킬러 (NK) 세포, 중성구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하기 위한 주요 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R II 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심의 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 관심의 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가될 수 있다.
- [0056] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 들 수 있으며; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 그의 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 분리될 수 있다.
- [0057] "Fc 수용체" 또는 "FcR"라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재하는데 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이며, 대립유전자 변이체 및 별법으로 상기 수용체의 스플라이싱된 형태를 비롯한, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R II 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체, 및 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 별법으로 스플라이싱된 형태를 들 수 있다. Fc $\gamma$ R II 수용체로는 유사한 아미노산 서열을 갖지만 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한, Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 들 수 있다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (검토를 위해 문헌 [M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]을 참조한다). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)]에서 검토되었다. 장래에 확인될 것들을 비롯해서 다른 FcR은 본원에서 "FcR"이라는 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 모체 IgG를 태아에 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).
- [0058] "상보적 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 상보체의 존재하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 상보적 활성화 경로는 상보체 시스템 (C1q)의 제1 성분의 동족체 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어 항체)에의 결합에 의해 개시된다. 상보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.
- [0059] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이중 사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설피드 결합의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 많은 불변 도메인 에 이어지는 가변 도메인 ( $V_H$ )을 하나의 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 ( $V_L$ ) 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 믿어진다.
- [0060] "가변"이라는 용어는 가변 도메인의 특정 부분이 항체 사이의 서열 내에서 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭하며, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘다에 초가변 영역이라 불리는 3개의 절편에 집약되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은  $\beta$ -쉬트 구조를 연결하고, 일부의 경우 그의 일부를 형성하는 루프를 형성

하는 3개의 추가변 영역에 의해 연결된  $\beta$ -스위트 형태를 크게 채택하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각각의 쇠의 추가변 영역은 다른 쇠로부터의 추가변 영역과 함께 FR에 의해 가까이 근접하여 함께 수용되어 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여하지는 않지만, 항체가 항체 의존성 세포독성 (ADCC)에 참여하는 것과 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

[0061] 본원에서 사용될 경우 "추가변 영역"이라는 용어는 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 추가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24 내지 34 (L1), 50 내지 56 (L2) 및 89 내지 97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 31 내지 35 (H1), 50 내지 65 (H2) 및 95 내지 102 (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"로부터의 상기 잔기 (예를 들어 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26 내지 32 (L1), 50 내지 52 (L2) 및 91 내지 96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 26 내지 32 (H1), 53 내지 55 (H2) 및 96 내지 101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같은 추가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0062] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 잔여 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교시킬 수 있는  $F(ab')_2$  단편을 생성한다.

[0063] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 영역은 단단한 비-공유 회합의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 이는 각각의 가변 도메인의 3개의 추가변 영역이 상호작용하여  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정하는 상기 형태이다. 집합적으로, 6개의 추가변 영역은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 낮은 친화도이기는 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 추가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.

[0064] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 소수의 잔기가 첨가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 본원의 지칭이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.

[0065] 임의의 척추동물 중으로부터의 항체의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기재하여, 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )라 불리는 2가지 명백히 구별되는 형태 중 하나로 할당될 수 있다.

[0066] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 상기 도메인이 단일 폴리펩티드 쇠에 존재하는 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는  $V_H$ 과  $V_L$  도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해서는 문헌 [Plueckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. HER2 항체 scFv 단편은 WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다.

[0067] "디아바디"라는 용어는 동일한 폴리펩티드 쇠 ( $V_H$  -  $V_L$ ) 내의 가변 경쇄 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 가변 중쇄 도메인 ( $V_H$ )을 포함하는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 지을 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 지으며, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 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 충분히 기재되어 있다.

[0068] 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는 수여자의 추가변 영역으로부터의 잔기가, 목적하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 추가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수여자 항체)이다. 일부의 예에서, 인간 이뮤노글로불린의

프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형이 이루어져 항체 성능을 추가로 개량한다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프가 비-인간 이뮤노글로불린의 그것과 상응하는, 실질적으로 모든 하나 이상의, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부분의 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것들을 포함할 것이다. 추가의 상세한 사항에 대해서는 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0069] 인간화 HER2 항체로는 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8, 본원에 특별히 참고로 도입된 미국 특허 제5,821,337호의 표 3에 기재된 바와 같은 트라스투주마브 (헤르셉틴(등록상표)); 본원에 기재된 바와 같은 인간화 520C9 (WO 93/21319) 및 인간화 2C4 항체를 들 수 있다.

[0070] 본원의 목적을 위해, "트라스투주마브," "헤르셉틴(등록상표)" 및 "huMAb4D5-8"은 각각 서열 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0071] 본원에서, "페르투주마브," "옵니타르그(OMNITARG)(상표명)" 및 "rhuMAb 2C4"는 각각 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다. 페르투주마브가 비손상 항체일 경우, 이는 바람직하게는 각각 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0072] "네이키드(naked) 항체"는 세포독성 부분 또는 방사성표지와 같은 이중 분자와 컨쥬게이션되지 않은 항체 (본원에서 정의된 바와 같음)이다.

[0073] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고/거나 분리되고/거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비 단백질성 용질을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바로 항체 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 15 잔기 이상의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 수득하는데 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시(Coomassie) 블루, 또는 바람직하게는 실버 염료를 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 동질성으로 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 계내에서 재조합 세포 내의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0074] "HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는" HER2 항체는 HER 이량체를 트라스투주마브보다 효과적으로 (예를 들어 약 2배 이상 더 효과적으로) 감소시키거나 제거하는 것이다. 바람직하게는 이러한 항체는 비손상 무린 모노클로날 항체 2C4, 무린 모노클로날 항체 2C4의 Fab 단편, 비손상 페르투주마브 및 페르투주마브의 Fab 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체만큼 적어도 거의 효과적으로 HER2 이량체화를 억제한다. HER 이량체화 억제는 HER 이량체를 직접 연구함으로써, 또는 HER 활성화, 또는 HER 이량체화로부터 초래되는 하류 신호전달을 평가함으로써, 및/또는 항체-HER2 결합 부위를 평가함으로써 등에 의해 평가될 수 있다. HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는 능력을 갖는 항체를 스크리닝하기 위한 분석법은 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 (Adams et al.)에 기재되어 있다. 단지 예로써, HER 이량체화의 억제에 대한 분석은 예를 들어 HER 이량체 형성의 억제 (예를 들어 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 1A 내지 B; 및 WO 01/00245 참조); HER 이량체를 발현하는 세포의 HER 리간드 활성화의 감소 (예를 들어 WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2A 내지 B); HER 이량체를 발현하는 세포에 결합하는 HER 리간드의 차단 (예를 들어 WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2E); HER 리간드의 존재 (또는 부재) 하에서 HER 이량체를 발현하는 암 세포 (예를 들어 MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D 세포)의 세포 성장 억제 (예를 들어 WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 3A 내지 D); 하류 신호전달의 억제 (예를 들어, HRG-의 존성 AKT 인산화의 억제 또는 HRG- 또는 TGF  $\alpha$ -의존성 MAPK 인산화의 억제) (예를 들어 WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2C 내지 D)를 평가함으로써 분석할 수 있다. 또한, 항체가 HER 이량체화를 억제하는지 여부는 항체-HER2 결합 부위를 연구함으로써, 예를 들어 HER2에 결합된 항체의 결정 구조와 같은 구조 또는 모델을 평가함으로써 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)] 참조).

[0075] HER2 항체는 트라스투주마브보다 효과적으로 "HRG-의존성 AKT 인산화를 억제"할 수 있고/거나 "HRG- 또는 TGF  $\alpha$ -

의존성 MAPK 인산화"를 억제할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 참조).

- [0076] HER2 항체는 "HER2 엑토도메인(ectodomain) 절단을 억제하지 않는" 것일 수 있다 (문헌 [Molina et al. *Cancer Res.* 61:4744-4749 (2001)]).
- [0077] HER2의 "이중이량체 결합 부위에 결합하는" HER2 항체는 도메인 II 내의 잔기에 결합하며 (또한 임의로 도메인 I 및 III과 같은 HER2 세포의 도메인의 다른 도메인 내의 잔기에 결합함), HER2-EGFR, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이중이량체의 형성을 일정 정도 이상으로 입체 장애할 수 있다. 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]은 RCSB 단백질 데이터뱅크 (ID 코드 IS78)에 기탁된 HER2-페르투주마브 결정 구조를 특성화하면서, HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 설명한다.
- [0078] HER2의 "도메인 II에 결합하는" 항체는 도메인 II 내의 잔기에 결합하며, 임의로 도메인 I 및 III과 같은 HER2의 다른 도메인(들) 내의 잔기에 결합한다. 바람직하게는, 도메인 II에 결합하는 항체는 HER2의 도메인 I, II 및 III 사이의 연결부에 결합한다.
- [0079] 본원에서 사용될 경우 "성장 억제제"는 세포의 성장, 특히 시험관내 또는 생체내에서 HER 발현 암 세포를 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기의 HER 발현 세포의 퍼센트를 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예로는 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 제제와 같은 세포 주기 진행 (S기 이외의 장소에서)을 차단하는 제제를 들 수 있다. 전통적인 M-기 차단제로는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산, 및 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신과 같은 토포 II 억제제를 들 수 있다. 정지 G1이 또한 S-기 정지 내로 넘어가는 제제는 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제이다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)], 특히 제13면에서 발견할 수 있다.
- [0080] "성장 억제성" 항체의 예는 HER2에 결합하며 HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 것들이다. 바람직한 성장 억제성 HER2 항체는 세포 배양물 내의 SK-BR-3 유방 종양 세포의 성장을, 성장 억제를 SK-BR-3 세포의 항체에 노출 후 6일에 측정했을 때 약 0.5 내지 30  $\mu\text{g/mL}$ 의 항체 농도에서 20% 초과, 바람직하게는 50% 초과 (예를 들어 약 50% 내지 약 100%)로 억제한다 (1997년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 제5,677,171호 참조). SK-BR-3 세포 성장 억제 분석법은 상기 특허 및 하기에 보다 상세히 기재되어 있다. 바람직한 성장 억제성 항체는 뮤린 모노클로날 항체 4D5의 인간화 변이체, 예를 들어 트라스투주마브이다.
- [0081] "아포토시스"를 유도하는 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 베지클 (아포토시스 바디라고 불림)의 형성에 의해 측정되는 바와 같은 프로그램된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 통상적으로 HER2 수용체를 과발현하는 것이다. 바람직하게는 세포는 종양 세포, 예를 들어 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관내에서, 세포는 SK-BR-3, BT474, Calu 3 세포, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 아포토시스와 관련된 세포의 이벤트를 평가하는 다양한 방법이 가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고, DNA 단편화는 DNA 래더링(laddering)을 통해 평가될 수 있으며, DNA 단편화와 함께 핵/염색질 응축은 저이배체 세포의 임의의 증가에 의해 평가될 수 있다. 바람직하게는, 아포토시스를 유도하는 항체는 BT474 세포 (하기 참조)를 이용한 아넥신 결합 분석에서 비처리된 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 유도하는 것이다. 아포토시스를 유도하는 HER2 항체의 예는 7C2 및 7F3이다.
- [0082] "에피토프 2C4"는 항체 2C4가 결합하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석법을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 당업계에 공지된 방법을 이용하여 HER2의 2C4 에피토프에 결합하는지 여부를 평가할 수 있고/거나, HER2의 도메인(들)이 항체에 의해 결합되는지를 확인하기 위해 항체-HER2 구조를 연구할 수 있다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]). 에피토프 2C4는 HER2의 세포외 도메인 내에 도메인 II로부터의 잔기를 포함한다. 2C4 및 페르투주마브는 도메인 I, II 및 III의 연결부에서 HER2의 세포외 도메인에 결합한다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).

- [0083] "에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463) 및 트라스투주마브가 결합하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 상기 에피토프는 HER2의 막관통 도메인에 근접하며, HER2의 도메인 IV 내에 있다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석법을 수행할 수 있다. 별법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 HER2의 4D5 에피토프 (예를 들어 도 1에서 약 잔기 529 내지 약 잔기 625의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기를 포함함)에 결합하는지 여부를 평가할 수 있다.
- [0084] "에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및/또는 7F3 항체 (각각 ATCC에 기탁됨)가 결합하는 HER2의 세포외 도메인의 도메인 I 내의 N 말단의 영역이다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석법이 수행될 수 있다. 별법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 HER2 상의 7C2/7F3 에피토프 (예를 들어 도 1의 HER2의 약 잔기 22 내지 약 잔기 53의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기)에 결합하는지 여부를 확립할 수 있다.
- [0085] "치료"는 치료적 치료 및 방지적 또는 예방적 수단 둘다를 지칭한다. 치료가 필요한 것들은 이미 질환을 갖는 것들 뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 것들을 포함한다. 따라서, 본원에서 치료되어야 할 환자는 질환을 갖는 것으로 진단되었을 수 있거나, 질환에 걸리기 쉽거나 감수성일 수 있다.
- [0086] "암" 및 "암성"이라는 용어는 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 이를 묘사한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종 (수모세포종 및 망막모세포종 포함), 육종 (지방육종 및 윤활 세포 육종 포함), 신경내분비세포 종양 (카르시노이드 종양, 가스트린종 및 섬세포 암 포함), 증피종, 신경집종 (청신경종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평 세포 암 (예를 들어 상피 편평 세포 암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암을 비롯한 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장관암을 비롯한 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담관의 종양, 뿐만 아니라 두경부암을 들 수 있다.
- [0087] "유효량"이라는 용어는 환자에서 질환을 치료하는데 유효한 약물의 양을 지칭한다. 질환이 암일 경우, 약물의 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고/거나; 종양 크기를 감소시키고/거나; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제하고/거나 (즉, 일정 정도로 감속시킴, 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 일정 정도로 감속시킴, 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 일정 정도로 억제하고/거나 암과 관련된 하나 이상의 증상을 일정 정도로 완화시킬 것이다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 예방하고/거나 이를 사멸시킬 수 있는 정도까지는, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 유효량은 진행이 없는 생존을 연장시키고/거나, 객관적인 반응 (부분적 반응, PR 또는 완전한 반응, CR 포함)을 초래하고/거나, 전체 생존 시간을 증가시키고/거나, 암의 하나 이상의 증상을 개선시킬 수 있다.
- [0088] "HER2-발현 암"은 그의 세포 표면에 존재하는 HER2 단백질을 갖는 세포를 포함하는 것이다.
- [0089] HER 수용체를 "과발현"하는 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해, 그의 세포 표면에서 상당히 보다 높은 수준의 HER2와 같은 HER 수용체를 갖는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 유발될 수 있다. HER 수용체 과발현은 세포의 표면 상에 존재하는 HER 단백질의 증가된 수준을 평가함으로써 (예를 들어 면역조직화학 분석법: IHC를 통해) 진단 또는 예후 분석법으로 측정될 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 세포 내의 HER-코딩 핵산의 수준은 예를 들어 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월에 공개된 WO 98/45479 참조), 서던 블롯팅, 또는 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)과 같은 증합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술을 통해 측정될 수 있다. 또한, HER 수용체 과발현은 혈청과 같은 생물학적 유체에서 흘러진 항원 (예를 들어, HER 세포외 도메인)을 측정함으로써 연구될 수 있다 (예를 들어 1990년 6월 12일자로 허여된 미국 특허 제 4,933,294호; 1991년 4월 18일자로 공개된 WO 91/05264; 1995년 3월 28일자로 허여된 미국 특허 제 5,401,638호; 및 문헌 [Sias et al. *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)] 참조). 상기 분석법 이외에, 다양한 생체내 분석법이 당업자에게 이용가능하다. 예를 들어, 환자의 체내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시키고, 환자에서 항체의 세포외 결합을, 예를 들어 방사성활성에 대해 외부 스크리닝함으로써 또는 항체에 이전에 노출된 환자로부터 취해진 생검을 분석함으로써 평가할 수 있다.
- [0090] 반대로, "HER2 수용체를 과발현하지 않는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 정상적인 수준의 HER2

수용체보다 높게 발현하지 않는 것이다.

[0091] HER 리간드를 "과발현하는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 상당히 높은 수준의 상기 리간드를 생성하는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 유발될 수 있다. HER 리간드의 과발현은 환자에서의 리간드 (또는 이를 코딩하는 핵산)의 수준을 예를 들어 중앙 생검에서 평가함으로써, 또는 상기 기재된 IHC, FISH, 서던 블롯팅, PCR 또는 생체내 분석법과 같은 다양한 진단 분석법에 의해 진단적으로 측정할 수 있다.

[0092] 본원에서 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$  및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소와 같은 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0093] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)(등록상표)); 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 볼라타신 및 볼라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)(등록상표)); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히신; 베톨린산; 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCANTIN)(등록상표)) 포함), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)(등록상표), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류트레로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노베티친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네딘 항생제 (예를 들어 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 II 및 칼리케아미신 오메가 II (예를 들어 문헌 [Agnew, *Chem Int'l. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994)] 참조); 디네미신 A를 비롯한 디네미신; 에스페라미신; 및 네오키노스타틴 크로모포르 및 관련 크로모프로테인 에네딘 항생제 크로모포르), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오토라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)(등록상표), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL)(등록상표)), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)(등록상표)), 페글릴화 리포솜 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX)(등록상표)) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예를 들어 메토평렉세이트, 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)(등록상표)), 테가푸르 (우프트랄(UFTORAL)(등록상표)), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)(등록상표)), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플루수리딘, 항-아드레날린제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 테오판; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티놀 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 루니다인; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (미국 오레곤주 유진에 소재하는 JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리테아민; 트리코테센 (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘; 우레탄; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)(등록상표)), 파클리탁셀의 알부민-유전자조작된 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)(상표

명)), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)(등록상표)); 클로란부실; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 플라티늄 제제, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 튜블린 중합이 미소관 형성을 방지하는 빈카, 예를 들어 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)(등록상표)), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)(등록상표)), 빈데신 (엘디신(ELDISINE)(등록상표), 필데신(FILDESIN)(등록상표)), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)(등록상표)); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보민; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산, 예를 들어 백사로텐 (타르그레틴(TARGRETIN)(등록상표)); 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)(등록상표) 또는 오스타크(OSTAC)(등록상표)), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)(등록상표)), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)(등록상표)), 알렌드로네이트 (포사막스(FOSAMAX)(등록상표)), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)(등록상표)), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)(등록상표)), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)(등록상표)); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 비정상적 세포 증식과 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 테라토프(THERATOPE)(등록상표) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로벡틴(ALLOVECTIN)(등록상표) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)(등록상표) 백신, 및 백신(VAXID)(등록상표) 백신; 토포이소메라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)(등록상표)); rnrH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)(등록상표)); BAY439006 (소라페니브; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어 셀레룩시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어 PS341); 보르테조미브 (벨카드(VELCADE)(등록상표)); CCI-779; 티피파르니브 (R11577); 오라페니브, ABT510; Bcl-2 억제제, 예를 들어 오블리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)(등록상표)); 퍽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참조); 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 것들의 2종 이상의 조합, 예를 들어 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보민과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)(상표명))을 사용한 치료 처방의 약어 폴폭스(FOLFOX)를 들 수 있다.

[0094] 또한, 상기 정의에는 혼합된 아고니스트/길항제 프로파일을 갖는 항-에스트로겐과 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)(등록상표)), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)(등록상표)), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)(등록상표)), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 SERM3; 아고니스트 특성이 없는 순수한 항-에스트로겐, 예를 들어 풀베스트란트 (파슬로텍스(FASLODEX)(등록상표)), 및 EM800 (에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 전도(turnover)를 증가시키고/거나 ER 수준을 억제할 수 있는 제제); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예를 들어 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)(등록상표)), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예를 들어 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)(등록상표)), 레트로졸 (페마라(FEMARA)(등록상표)) 및 아미노글루테티미드, 및 기타 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)(등록상표)), 메게스트롤 아세테이트 (메가스(MEGASE)(등록상표)), 파드로졸, 이미다졸; 황체형성 호르몬-방출 호르몬 아고니스트, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)(등록상표) 및 엘리가르드(ELIGARD)(등록상표)), 고세렐린, 부세렐린 및 트리프테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스테론, 예를 들어 메게스트롤 아세테이트 및 메드로시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예를 들어 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 및 안드로젠/레티노이드, 예를 들어 플루옥시메스테론, 모든 트랜스테티온산 및 펜테티니드; 오나프리스톤; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 항-안드로젠, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 테스톨락톤; 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체, 뿐만 아니라 상기 것들의 2종 이상의 조합이 포함된다.

[0095] 본원에서 사용된 "EGFR-표적화된 약물"이라는 용어는 EGFR에 결합하고, 임의로 EGFR 활성화를 억제하는 치료제를 지칭한다. 이러한 제제의 예로는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 들 수 있다. EGFR에 결합하는 항체의 예로는 Mab 579 (ATCC CRL HB 8506), Mab 455 (ATCC CRL HB8507), Mab 225 (ATCC CRL 8508), Mab 528 (ATCC CRL 8509) (멘델존(Mendelsohn) 등에게 허여된 미국 특허 제4,943,533호 참조) 및 그의 변이체, 예를 들어 키메라화된 225 (C225 또는 세툽시마브; 에르부티스(ERBUTIX)(등록상표)) 및 재형성된 인간 225 (H225) (WO 96/40210, 임클론 시스템스 인크.(Imclone Systems Inc.) 참조); IMC-11F8, 완전한 인간, EGFR-표적화된 항체 (임클론); 제II형 돌연변이체 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 제5,212,290호); 미국 특허 제5,891,996호에 기재된 바와 같은 EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예를 들어 ABX-EGF 또는 파니투무마브 (WO 98/50433, 아브게닉스(Abgenix)/암젠(Amgen)); EMD 55900 (문헌 [Stragliotto et al.

*Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)]); EMD7200 (마투주마브), EGFR 결합에 대해 EGF 및 TGF-알파 둘다와 경쟁하는 EGFR에 대해 지정된 인간화 EGFR 항체(EMD/머크(Merck)); 인간 EGFR 항체, HuMax-EGFR (젠맵(GenMab)); 미국 특허 제6,235,883호에 기재되고 E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 및 E7.6.3으로 공지된 완전한 인간 항체; MDX-447 (메다렉스 인크(Medarex Inc)); 및 mAb 806 또는 인간화 mAb 806 (문헌 [Johns et al., *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)])를 들 수 있다. 항-EGFR 항체는 세포독성체와 컨쥬게이션되어 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다 (예를 들어, EP 659,439 A2, 머크 패이턴트 게엠베하(Merck Patent GmbH) 참조). EGFR 길항제는 미국 특허 제5,616,582호, 제5,457,105호, 제5,475,001호, 제5,654,307호, 제5,679,683호, 제6,084,095호, 제6,265,410호, 제6,455,534호, 제6,521,620호, 제6,596,726호, 제6,713,484호, 제5,770,599호, 제6,140,332호, 제5,866,572호, 제6,399,602호, 제6,344,459호, 제6,602,863호, 제6,391,874호, 제6,344,455호, 제5,760,041호, 제6,002,008호 및 제5,747,498호, 뿐만 아니라 하기 PCT 출원: WO 98/14451, WO 98/50038, WO 99/09016 및 WO 99/24037에 기재된 화합물과 같은 소분자를 포함한다. 특정 소분자 EGFR 길항제로는 OSI-774 (CP-358774, 에를로티니브, 타르세바(TARCEVA)(등록상표), 제넨테크/OSI 파마슈티칼스(OSI Pharmaceuticals)); PD 183805 (CI 1033, 2-프로페나미드, N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[3-(4-모르폴리닐)프로폭시]-6-퀴나졸리닐]-디히드로클로라이드, 화이자 인크(Pfizer Inc.)); ZD1839, 게피티니브 (이레사(IRESSA)(상표명)), 4-(3'-클로로-4'-플루오로아닐리노)-7-메톡시-6-(3-모르폴리노프로폭시)퀴나졸린, 아스트라제네카(AstraZeneca)); ZM 105180 ((6-아미노-4-(3-메틸페닐-아미노)-퀴나졸린, 제네카(Zeneca)); BIBX-1382 (N8-(3-클로로-4-플루오로-페닐)-N2-(1-메틸-피페리딘-4-일)-피리미도[5,4-d]피리미딘-2,8-디아민, 비링거 잉겔하임(Boehringer Ingelheim)); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-페닐에틸)아미노]-1H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-일]-페놀); (R)-6-(4-히드록시페닐)-4-[(1-페닐에틸)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘; CL-387785 (N-[4-[(3-브로모페닐)아미노]-6-퀴나졸리닐]-2-부틴아미드); EKB-569 (N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-3-시아노-7-에톡시-6-퀴나졸리닐]-4-(디메틸아미노)-2-부틴아미드) (와이어스(Wyeth)); AG1478 (서젠(Sugen)); AG1571 (SU 5271; 서젠); 이중 EGFR/HER2 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 라파티니브 (GW 572016 또는 N-[3-클로로-4-[(3-플루오로페닐)메톡시]페닐]6[5[[[2메틸술포닐)에틸]아미노]메틸]-2-푸라닐]-4-퀴나졸린아민; 글락소-스미스클라인(Glaxo-SmithKline)) 또는 시아노구아니딘 퀴나졸린 및 시아노아미딘 퀴나졸아민 유도체를 들 수 있다.

[0096] "티로신 키나제 억제제"는 HER 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 억제하는 분자이다. 이러한 억제제의 예로는 선행 문단에서 언급된 EGFR-표적화된 약물; 다게다(Takeda)에서 시판되는 TAK165와 같은 소분자 HER2 티로신 키나제 억제제; CP-724,714, ErbB2 수용체 티로신 키나제의 경구 선택적 억제제 (화이자 및 OSI); EGFR에 선호적으로 결합하지만 HER2 및 EGFR-과발현 세포 둘다를 억제하는 EKB-569 (와이어스에서 시판)와 같은 이중-HER 억제제; 라파티니브 (GW572016; 글락소-스미스클라인에서 시판), 경구 HER2 및 EGFR 티로신 키나제 억제제; PKI-166 (노파르티스(Novartis)에서 시판); 카네르티니브 (CI-1033; 파마시아(Pharmacia))와 같은 pan-HER 억제제; ISIS 파마슈티칼스(ISIS Pharmaceuticals)에서 시판되는 Raf-1 신호전달을 억제하는 안티센스 제제 ISIS-5132와 같은 Raf-1 억제제; 글락소에서 시판되는 이마티니브 메실레이트 (글리백(GLEEVEC(상표명))과 같은 비-HER 표적화된 TK 억제제; MAPK 세포외 조절된 키나제 I 억제제 CI-1040 (파마시아에서 시판); PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노)퀴나졸린과 같은 퀴나졸린; 피리도피리미딘; 피리미도피리미딘; CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706과 같은 피롤로피리미딘; 피라졸로피리미딘, 4-(페닐아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘; 쿠르쿠민 (디페롤로일 메탄, 4,5-비스(4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 니트로티오펜 잔기를 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lambers)); 안티센스 분자 (예를 들어 HER-코딩 핵산에 결합하는 것들); 퀴녹살린 (미국 특허 제5,804,396호); 트리포스틴 (미국 특허 제5,804,396호); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게(Schering AG)); CI-1033 (화이자)와 같은 pan-HER 억제제; 아피니타크(Affinitac) (ISIS 3521; 이시스(Isis)/릴리(Lilly)); 이마티니브 메실레이트 (글리백; 노파르티스); PKI 166 (노파르티스); GW2016 (글락소스미스클라인); CI-1033 (화이자); EKB-569 (와이어스); 세막시니브 (서젠); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); INC-IC11 (임클론); 시아노구아니딘 퀴나졸린 및 시아노아미딘 퀴나졸아민 유도체; 또는 임의의 하기 특허 간행물에 기재된 것: 미국 특허 제5,804,396호; WO 99/09016 (아메리칸 시아나미드(American Cyanamid)); WO 98/43960 (아메리칸 시아나미드); WO 97/38983 (워너 램버트); WO 99/06378 (워너 램버트); WO 99/06396 (워너 램버트); WO 96/30347 (화이자, 인크); WO 96/33978 (제네카); WO 96/3397 (제네카); WO 96/33980 (제네카); 및 US 2005/0101617을 들 수 있다.

[0097] "항혈관신생제"는 혈관의 발달을 일정 정도로 차단하거나 방해하는 화합물을 지칭한다. 항혈관신생 인자는 예를 들어 혈관신생을 촉진하는데 관련된 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 본원에서 바람직한 항혈관신생 인자는 베바시주마브(Bevacizumab) (아바스틴(AVASTIN)(등록상표))와 같

은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 결합하는 항체이다.

[0098] "사이토킨"이라는 용어는 세포내 매개자로서 또다른 세포에 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토킨의 예로는 림포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬을 들 수 있다. 사이토킨 중에 포함되는 것은 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬, 파라갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 펠락신; 프로펠락신; 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토겐; 중앙 피사 인자- $\alpha$  및  $-\beta$ ; 물러리안-억제 물질; 마우스 생식선자극호르몬-관련 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF- $\beta$ 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ 와 같은 전환 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론- $\alpha$ ,  $-\beta$  및  $-\gamma$ 와 같은 인터페론; 대식세포-CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(CSF); 과립백혈구-대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립백혈구-CSF(G-CSF); 인터루킨(IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; TNF- $\alpha$  또는 TNF- $\beta$ 와 같은 중앙 피사 인자; 및 LIF 및 kit 리간드(KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자를 들 수 있다. 본원에서 사용된 사이토킨이라는 용어는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 증가물로부터의 단백질을 포함한다.

[0099] II. HER2 항체 변이체 조성물

[0100] 본 발명은 적어도 부분적으로 특정 HER2 항체 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, HER2 항체(주요종 HER2 항체 및 그의 항체 변이체 중 하나 또는 둘다)는 HER2의 도메인 II에 결합하고/거나, HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하고/거나, HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 것이다. 본원에서 주요종 항체의 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것(페르투주마브)이다.

[0101] 본원의 조성물은 주요종 HER2 항체, 및 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체 변이체의 경쇄 상에(예를 들어 항체 변이체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에) 있다. 주요종 HER2 항체 또는 항체 변이체는 비손상 항체 또는 항체 단편(예를 들어 Fab of F(ab')<sub>2</sub> 단편)일 수 있지만, 바람직하게는 둘다 비손상 항체이다.

[0102] 본원의 항체 변이체는 그의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 상에 아미노-말단 선도자 연장물을 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 있다. 아미노-말단 선도자 연장물은 바람직하게는 VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0103] 조성물 중의 아미노-말단 선도자 연장물의 존재는 N-말단 서열 분석, 전하 이질성에 대한 분석법(예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동법), 질량 분광법 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 분석 기술에 의해 검출될 수 있다. 조성물 중의 항체 변이체의 양은 일반적으로 변이체를 검출하는데 사용되는 임의의 분석법(바람직하게는 양이온 교환 분석)의 검출 하한을 구성하는 양 내지 주요종 항체의 양 미만의 양의 범위이다. 일반적으로, 조성물 중의 약 20% 이하(예를 들어 약 1% 내지 약 15%, 예를 들어 5% 내지 약 15%, 바람직하게는 약 8% 내지 약 12%)의 항체 분자가 아미노-말단 선도자 연장물을 포함한다. 이러한 퍼센트 양은 바람직하게는 양이온 교환 분석을 이용하여 측정된다.

[0104] 아미노-말단 선도자 연장물 변이체 이외에, 그의 중쇄 하나 또는 둘다 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체(이러한 항체 변이체는 약 1% 내지 약 20%의 양으로 존재할 수 있음), 탈아미드화된 항체 변이체(예를 들어, 페르투주마브의 1개 또는 2개의 중쇄 상의 Asn-386 및/또는 Asn-391은 탈아미드화된됨), 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 갖는 항체(예를 들어, 산화된 met-254를 포함하는 페르투주마브) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, 주요종 항체 및/또는 변이체의 추가의 아미노산 서열 변경이 고려된다.

[0105] 더욱이, 주요종 항체 또는 변이체는 글리코실화 변이를 추가로 포함할 수 있으며, 이의 비제한적 예로는 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 포함하는 항체, 그의 경쇄에 부착된 탄수화물 부분(예를 들어 항체의 1개 또는 2개의 경쇄에 부착된, 예를 들어 하나 이상의 리신 잔기에 부착된, 글루코스 또는 갈락토스와 같은 1개 또는 2개의 탄수화물 부분)을 포함하는 항체, 1개 또는 2개의 비-글리코실화된 중쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 시알리드화된(sialidated) 올리고당류를 포함하는 항체 등을 들 수 있다.

[0106] 본 발명은 또한 서열 23의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드 또는 그의 탈아미드화된 및/또는 산화된 변이체에

관한 것이다. 또한, 본 발명은 1개 또는 2개의 경쇄를 포함하며, 상기 경쇄 중 하나 또는 둘다는 서열 23에 아미노산 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 또한, 본 발명은 1개 또는 2개의 중쇄를 포함하며, 상기 중쇄 중 하나 또는 둘다는 서열 16 또는 서열 24의 아미노산 서열 (또는 그의 탈아미드화된 및/또는 산화된 변이체)를 포함한다.

[0107] 조성물은 유전자조작된 세포주, 예를 들어 HER2 항체를 발현하는 차이나이스 햄스터 난소 (CHO) 세포주로부터 회수될 수 있거나, 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0108] III. HER2 항체의 생산

[0109] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 생산을 위한 예시적인 기술에 대한 기재가 이어진다. 항체의 생산에 사용되는 HER2 항원은 예를 들어 목적하는 에피토프를 함유하는 HER2의 세포외 도메인 또는 그의 일부의 가용성 형태일 수 있다. 별법으로, HER2를 그의 세포 표면에서 발현하는 세포 (예를 들어 HER2를 과발현하도록 형질전환된 NIH-3T3 세포; 또는 SK-BR-3 세포와 같은 암종 세포주, 문헌 [Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)] 참조)는 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 항체를 생성하는데 유용한 HER2의 다른 형태는 당업자에게 명백할 것이다.

[0110] (i) 폴리클로날 항체

[0111] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복막내 (ip) 주사에 의해 동물에서 발생된다. 이는 면역화되어야 할 중, 예를 들어 키희 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 이관능성 또는 유도체화제를 이용한 대두 트립신 억제제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 컨쥬게이션), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물,  $\text{SOCl}_2$ , 또는  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$  (여기서, R 및  $\text{R}^1$ 은 상이한 알킬기임)에서 관련 항원을 면역원성인 단백질에 컨쥬게이션하는데 유용할 수 있다.

[0112] 동물을 예를 들어 프로인트 완전 아주반트 3 부피를 갖는 단백질 또는 컨쥬게이트 (토끼 또는 마우스에 대해 각각) 100  $\mu\text{g}$  또는 5  $\mu\text{g}$  를 배합하고, 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써 항원, 면역원성 컨쥬게이트 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후, 동물을 다중 부위에 피하 주사에 의해 프로인트 완전 아주반트 중 펩티드 또는 컨쥬게이트의 원래 양을 1/5 내지 1/10으로 추가주사한다. 7내지 14일 후, 동물을 채혈하고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 동물을 역가가 안정수준에 달할 때까지 추가주사한다. 바람직하게는, 동물을 동일한 항원의 컨쥬게이트로 추가주사하지만, 상이한 단백질 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 컨쥬게이션하기도 한다. 컨쥬게이트는 또한 단백질 융합물로서 재조합 세포 배양물로 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제가 면역 반응을 증진시키는데 적합하게 사용된다.

[0113] (ii) 모노클로날 항체

[0114] 모노클로날 항체는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 취득되며, 즉 개별 항체 포함 집단은 본원에 기재된 변이체와 같은 모노클로날 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 따라서, 변형어 "모노클로날"은 개별 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특징을 지시한다.

[0115] 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조될 수 있다.

[0116] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 생물을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 별법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 림프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합화제를 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0117] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 시딩하고, 바람직하게는 비융합된 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없을 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이며, 이들의 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0118] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고-수준 생산을 지

지하고, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 미국 캘리포니아 주 샌 디에고에 소재하는 살크 인스티튜트 세포 분화 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들, 및 미국 메릴랜드주 로크빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)에서 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포와 같은 무린 골수종 세포주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 기재되었다 (문헌 [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)]; 및 [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

- [0119] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 항원에 대해 지정된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법에 의해, 또는 방사성면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석법에 의해 측정된다.
- [0120] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0121] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킨다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 상기 목적에 적합한 배양 배지로는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 들 수 있다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서의 복수 종양으로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.
- [0122] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 적합하게는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 항체 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 분리한다.
- [0123] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고, 시퀀싱된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 단리하면, DNA를 발현 벡터 내에 놓은 후, 이. 콜라이(*E. Coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 다르게는 항체 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포 내의 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문으로는 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)]을 들 수 있다.
- [0124] 추가의 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여, 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에는 각각 파지 라이브러리를 이용한 무린 및 인간 항체의 단리가 기재되어 있다. 후속 간행물에는 사슬 셔플링(shuffling)에 의한 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합적 감염 및 생체내 재조합이 기재되어 있다 (문헌 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)]). 따라서, 상기 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- [0125] DNA는 또한 예를 들어 동종 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다.
- [0126] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 이들로 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.
- [0127] (iii) 인간화 항체
- [0128] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되었다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원로부터 그의 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입

(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라, 초가변 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행된다 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 비손상인 인간 가변 도메인이 비-인간 중으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 제 4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0129] 인간화 항체의 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘다의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "최적(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 그 후, 설치류의 것과 가장 가까운 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로서 수용한다 (문헌 [Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]). 또다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 이용한다. 동일한 프레임워크는 몇몇 여러가지 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)]).

[0130] 항체가 항원에 대한 고 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것은 또한 중요하다. 상기 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체를 모 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적인 인간화 생성물의 분석의 방법에 의해 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 예시 및 제시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 디스플레이의 점검은 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린의 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선택하고, 수여자 및 도입 서열로부터 결합하여 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 목적하는 항체 특징이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는 것에 관여한다.

[0131] WO 01/00245에는 HER2에 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 예시적인 인간화 HER2 항체의 생산이 기재되어 있다. 본원에서 특정 관심의 인간화 항체는 EGF, TGF- $\alpha$  및/또는 MAPK의 HRG 매개된 활성화를 본질적으로 비손상 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 차단하고/거나 HER2에 본질적으로 비손상 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 결합한다. 본원에서 인간화 항체는 예를 들어 인간 가변 중쇄 도메인 내로 도입된 비인간 초가변 영역 잔기를 포함할 수 있으며, 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 설명된 가변 도메인 넘버링 시스템을 이용한 69H, 71H 및 73H으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 프레임워크 영역 (FR) 치환을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 인간화 항체는 위치 69H, 71H 및 73H의 2개 또는 전부에 FR 치환을 포함한다.

[0132] 본원에서 관심의 예시적인 인간화 항체는 가변 중쇄 상보성 결정 잔기 GFTFTDYTMX (여기서, X는 바람직하게는 D 또는 S임) (서열 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (서열 8); 및/또는 NLGPSFYFDY (서열 9)를 포함하며, 임의로 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 포함하고, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 관심의 항체 변이체는 상기 가변 중쇄 CDR 서열에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 4의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0133] 인간화 항체는 예를 들어 선행 문단의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에 가변 경쇄 상보성 결정 잔기 KASQDVSIGVA (서열 10); SASYX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup> (여기서, X<sup>1</sup>은 바람직하게는 R 또는 L이고, X<sup>2</sup>는 바람직하게는 Y 또는 E이고, X<sup>3</sup>은 바람직하게는 T 또는 S임) (서열 11); 및/또는 QQYYIYPYT (서열 12)를 포함할 수 있다. 이러한 인간화 항체는 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 임의로 포함하며, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 관심의 항체 변이체는 상기 가변 경쇄 CDR 서열에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 3의 가변 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0134] 본 출원은 또한 HER2에 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 친화도 성숙된 항체를 고려한다. 모 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체, 예를 들어 각각 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및/또는 가변 중쇄 서열을 포함

하는 것 (즉, 변이체 574)일 수 있다. 친화도 성숙된 항체는 바람직하게는 비손상 무린 2C4 또는 비손상 변이체 574의 것보다 우수한 친화도 (예를 들어 HER2-세포외 도메인 (ECD) ELISA를 이용하여 평가된 바로, 예를 들어 약 2배 또는 4배 내지 약 100배 또는 약 1000배 개선된 친화도)로 HER2 수용체에 결합한다. 치환을 위한 예시적인 가변 중쇄 CDR 잔기로는 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 또는 2종 이상 (상기 잔기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 조합을 들 수 있다. 변형을 위한 가변 경쇄 CDR 잔기의 예로는 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97, 또는 2종 이상 (상기 잔기 2 내지 3, 4, 5개 또는 약 10개 이하)의 조합을 들 수 있다.

[0135] 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체의 다양한 형태가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 이뮤노콘쥬게이트를 생성하기 위한 1종 이상의 세포독성제(들)과 임의로 켄쥬게이션된 Fab와 같은 항체 단편일 수 있다. 별법으로, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 비손상 IgG1 항체와 같은 비손상 항체일 수 있다.

[0136] (iv) 인간 항체

[0137] 인간화에 대한 별법으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화시 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식 계열 돌연변이체 내의 항체 중쇄 결합 영역 ( $J_H$ )의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다고 기재되었다. 이러한 생식 계열 돌연변이체 마우스 내의 인간 생식 계열 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제5,591,669호, 제5,589,369호 및 제5,545,807호를 참조한다.

[0138] 별법으로, 파지 제시 기술 (문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)])을 이용하여 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자로부터 시험관내에서 생산할 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 프레임 내에서 M13 또는 fd와 같은 필라멘트성 박테리오파지의 주요 또는 부 코팅 단백질 유전자 내로 클로닝하고, 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 제시한다. 필라멘트성 입자가 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기재로 하는 선별은 또한 상기 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자의 선별을 초래한다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 제시는 다양한 형태로 수행될 수 있으며, 그의 검토를 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 절편의 몇몇 공급원은 파지 제시에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있으며, 항원의 다양한 어레이에 대한 항체 (자가-항원 포함)은 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호를 참조한다.

[0139] 인간 항체는 또한 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

[0140] 인간 HER2 항체는 1998년 6월 30일자로 허여된 미국 특허 제5,772,997호 및 1997년 1월 3일자로 공개된 WO 97/00271에 기재되어 있다.

[0141] (v) 항체 단편

[0142] 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비손상 항체의 단백질분해성 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어 문헌 [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 상기 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]). 또다른 접근법에 따르면, F(ab')<sub>2</sub> 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택의 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미

국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0143] (vi) 이중특이적 항체

[0144] 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 HER2 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 이러한 항체는 HER2 결합 부위를 EGFR, HER3 및/또는 HER4에 대한 결합 부위(들)과 결합시킬 수 있다. 별법으로, HER2 팔(arm)은 T-세포 수용체 분자 (예를 들어 CD2 또는 CD3)와 같은 백혈구, 또는 Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) 및 Fc $\gamma$ RIII (CD16)와 같은 Fc 수용체 상의 촉발 분자에 결합하는 팔과 결합되어 HER2-발현 세포에 대한 세포 방어 메커니즘에 집중할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 HER2를 발현하는 세포에 위치화시키는데 사용될 수 있다. 상기 항체는 HER2-결합팔, 및 세포독성제 (예를 들어 사포린, 항-인터페론- $\alpha$ , 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토크세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)을 결합시키는 팔을 갖는다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0145] WO 96/16673에는 이중특이적 HER2/Fc $\gamma$ RIII 항체가 기재되어 있으며, 미국 특허 제5,837,234호에는 이중특이적 HER2/Fc $\gamma$ RI 항체 IDM1 (오시렘(Osirem))이 기재되어 있다. 이중특이적 HER2/Fc $\alpha$  항체는 WO 98/02463에 나타나 있다. 미국 특허 제5,821,337호는 이중특이적 HER2/CD3 항체를 교시한다. MDX-210은 이중특이적 HER2-Fc $\gamma$ RIII Ab이다.

[0146] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 쇄가 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현에 기재한다 (문헌 [Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위적 구분 때문에, 상기 하이브리도마 (과드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거로우며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차는 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0147] 상이한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)는 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 이는 하나 이상의 융합물에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합물, 및 필요할 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터 내로 삽입되며, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염된다. 이는 구축에 사용되는 3개의 폴리펩티드 쇄의 비동일한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시예에서, 3개의 폴리펩티드의 상호 비율을 조정하는 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드 쇄의 동일한 비율의 발현이 높은 수율을 초래할 경우 또는 비율이 특정 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터 내의 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0148] 상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 팔에 혼성 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 단지 절반 내의 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 목적하는 이중특이적 화합물의 원하지 않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터의 분리를 용이하게 한다. 상기 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 보다 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0149] 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또다른 접근법에 따르면, 항체 분자의 쌍 사이의 계면을 유전자조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이중이량체의 퍼센트를 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 적어도 일부의 C $\beta$ 3 도메인을 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)으로 대체된다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보충적 "공동"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

[0150] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "헤테로컨쥬게이트" 항체를 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨쥬게이트 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포

를 원하지 않는 세포에 표적화시키고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위한 것으로 제안된다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로컨주게이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0151] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 또한 문헌에 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]에는 비손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여  $F(ab')_2$  단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 상기 단편을 티올 착물화제 나트륨 아르세나이트의 존재하에서 환원시켜 근접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸아민을 사용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 다른 Fab'-TNB 유도체의 동몰량과 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.

[0152] 최근의 진보는 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접적 회수를 용이하게 했다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중특이적 항체  $F(ab')_2$  분자의 제조가 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분리하고, 지정 시험관내 화학적 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체 및 정상 인간 T 세포를 과발현하는 세포에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 중앙 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0153] 제조할 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 제조될 수 있다 (문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)]). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 후, 재산화시켜 항체 이중이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 제조에 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하는 별법의 메카니즘을 제공하였다. 단편은, 너무 짧아서 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 지을 수 없는 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 또다른 단편의 상보적  $V_L$  및  $V_H$  도메인과 쌍을 지어 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하는 또다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0154] 2 이상의 가(valence)를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]).

[0155] (vii) 다른 아미노산 서열 변형

[0156] 본원에 기재된 HER2 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. HER2 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 HER2 항체 핵산 내로 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 HER2 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구조물이 목적하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구조물에 도달한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 HER2 항체의 번역후 과정을 변화시킬 수 있다.

[0157] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 HER2 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발법"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기의 기를 확인하고 (예를 들어 arg, asp, his, lys 및 glu와 같은 하전된 잔기), 이를 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여 HER2 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 준다. 그 후, 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 상기 아미노산 위치를 치환 부위에서, 또는 그에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 예정되는 반면, 돌연변이의 성질 그 자체는 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 돌연변이의 성능을 주어진 부위에서 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서

수행하고, 발현된 HER2 항체 변이체를 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0158] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 HER2 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 들 수 있다. HER 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 HER2 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어 ADEPT) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에의 융합을 포함한다.

[0159] 또다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 상기 변이체는 상이한 잔기로 대체된 HER2 항체 분자 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이유발법에 가장 큰 관심 부위로는 초가변 영역 또는 CDR을 들 수 있지만, FR 또는 Fc 영역 변경도 고려된다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"이라는 표제하에 나타나 있다. 이러한 치환이 생물학적 활성에 변화를 초래할 경우, 표 1의 "예시적인 치환"으로 명명된, 또는 아미노산 부류에 대해 하기에 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물이 스크리닝될 수 있다.

[0160] [표 1]

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0161]

[0162] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 스위트 또는 나선 형태로서의 치환의 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기를 유지하는 그의 효과에 있어서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 아미노산은 그의 측쇄의 특성에 있어서의 유사성에 따라 분류된다 (문헌 [A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

[0163] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0164] (2) 비하전된 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0165] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0166] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0167] 별법으로, 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기재한 기로 나누어질 수 있다.

[0168] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- [0169] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0170] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0171] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0172] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0173] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0174] 비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원으로 또다른 구성원을 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0175] 또한, 일반적으로 HER2 항체의 완전한 형태를 유지하는데 관련되지 않는 임의의 시스테인 잔기를 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결함(들)을 항체에 첨가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편일 경우).
- [0176] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어 인간화 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 체제를 사용한 친화도 성숙을 포함한다. 간략히, 몇몇 추가변 영역 부위 (예를 들어 6 내지 7 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성할 수 있다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물과의 융합으로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 일가 형태로 제시된다. 그 후, 파지-제시된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발법을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 huma HER2 사이의 접촉 지점을 확인하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에 설명된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.
- [0177] 항체의 또다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 원래 글리코실화 패턴을 변경한다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분을 결실시키고/거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다.
- [0178] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 상기 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당, 즉 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록실리신도 사용될 수 있다.
- [0179] 글리코실화 부위의 항체에의 첨가는 편리하게는 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대해). 변경은 또한 원래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 그것으로의 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해).
- [0180] 항체가 Fc 영역을 포함할 경우, 그에 부착된 임의의 올리고당류 구조는 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체는 프레스타, 엘.(Presta, L.)의 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 A1 (교와 하코 고교 가부시끼가이샤(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))를 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 구조 내에 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 진-마리에트(Jean-Mairet) 등의 WO 03/011878 및 우마나(Umana) 등의 미국 특허 제 6,602,684호에 기재되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 구조 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 파텔(Patel) 등의 WO 97/30087에 보고되어 있다. 또한, 그의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관한 WO 98/58964 (라주, 에스.(Raju, S.) 및 WO 99/22764 (라주, 에스.))를 참조한다. Fc 영역의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 이러한 탄수화물 구조를 갖는 주요종 항체를 포함하는 항체 조성물은 본원에서 고려된다.

- [0181] HER2 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 상기 방법으로는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개된 (또는 부위-지정된) 돌연변이유발법, PCR 돌연변이유발법, 및 HER2 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이유발법에 의한 제조를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0182] (viii) 목적하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝
- [0183] 항체를 생성하는 기술은 상기에 기재되었다. 목적에 따라 특정 생물학적 특징을 갖는 항체를 선별할 수 있다.
- [0184] HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체를 확인하기 위해, HER 수용체를 발현하는 세포에의 HER 리간드 결합을 차단하는 (예를 들어 관심의 HER 수용체가 HER 헤테로-올리고머를 형성하는 또다른 HER 수용체와의 컨주게이션으로) 항체의 능력을 측정할 수 있다. 예를 들어, 천연 발현하거나 HER 헤테로-올리고머의 HER 수용체를 발현하도록 형질감염된 세포를 항체와 함께 인큐베이션한 후, 표지된 HER 리간드에 노출시킨다. 그 후, HER2 항체가 HER 헤테로-올리고머 내의 HER 수용체에의 리간드 결합을 차단하는 능력을 평가할 수 있다.
- [0185] 예를 들어, HER2 항체에 의한 MCF7 유방 종양 세포주에의 HER 결합의 억제제는 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 24-웰-플레이트 포맷으로 얼음 상에서 단층 MCF7 배양물을 사용하여 수행될 수 있다. HER2 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 그 후, <sup>125</sup>I-표지된 rHRGβ 1<sub>177-224</sub> (25 pm)을 첨가하고, 인큐베이션을 4 내지 16시간 동안 계속할 수 있다. 투여량 반응 곡선을 작성할 수 있고, IC<sub>50</sub> 값을 관심의 항체에 대해 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, MCF7 세포에의 HRG 결합 억제에 대한 IC<sub>50</sub>을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석법에서 MCF7 세포에의 HRG 결합의 억제에 대한 IC<sub>50</sub>은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.
- [0186] 별법으로, 또는 부가적으로, HER2 항체가 HER 헤테로-올리고머에 존재하는 HER 수용체의 HER 리간드-자극된 티로신 인산화를 차단하는 능력을 평가할 수 있다. 예를 들어, HER 수용체를 내인성으로 발현하거나 이를 발현하도록 형질감염된 세포를 항체와 함께 인큐베이션한 후, 항-포스포티로신 모노클로날 (검출가능한 표지와 임의로 컨주게이션됨)을 사용하여 HER 리간드-의존성 티로신 인산화 활성에 대해 분석할 수 있다. 미국 특허 제 5,766,863호에 기재된 키나제 수용체 활성화 분석법은 또한 HER 수용체 활성화 및 항체에 의한 활성의 차단을 측정하는데 이용가능하다.
- [0187] 일 실시양태에서, 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같이 MCF7 세포 내의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, MCF7 세포를 24-웰 플레이트에 플레이팅하고, HER2에 대한 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, rHRGβ 1<sub>177-244</sub>를 각각의 웰에 최종 농도 0.2 nM로 첨가하고, 인큐베이션을 8분 동안 계속할 수 있다. 배지를 각각의 웰로부터 흡인하고, SDS 샘플 완충액 (5% SDS, 25 mM DTT 및 25 mM 트리스(Tris)-HCl, pH 6.8) 100 μl의 첨가에 의해 반응을 중단시킬 수 있다. 각각의 샘플 (25 μl)을 4 내지 12% 구배 겔 (노벡스(Novex)) 상에서 전기영동한 후, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전기영동적으로 옮길 수 있다. 항포스포티로신 (1 μg/mL) 이뮤노블롯을 전개시키고, M<sub>r</sub> ~ 180,000에서 우세한 반응 밴드의 강도를 반사도 음영계측기에 의해 정량할 수 있다. 선별된 항체는 바람직하게는 상기 분석법에서 대조군의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 약 0 내지 35%까지 유의하게 억제할 것이다. 반사도 음영계측기에 의해 측정된 바로 p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 억제에 대한 투여량-반응 곡선을 작성하고, 관심의 항체에 대한 IC<sub>50</sub>을 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석법에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 억제에 대한 IC<sub>50</sub>을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석법에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하기 위한 IC<sub>50</sub>은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.
- [0188] 또한, MDA-MB-175 세포에 대한 항체의 성장 억제 효과를 예를 들어 본질적으로 문헌 [Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]에 기재된 바와 같이 평가할 수 있다. 상기 분석법에 따르면, MDA-MB-175 세포를 HER2 모노클로날 항체 (10 μg/mL)로 4일 동안 처리하고, 크리스탈 바이올렛으로 염색할 수 있다. HER2 항체와 함께 인큐베이션하는 것은 모노클로날 항체 2C4에 의해 제시된 것과 유사한 상기 세포주에 대한 성장 억제 효과를 나타낼 수 있다. 추가의 실시양태에서, 외인성 HRG는 상기 억제를 상당히 반전시킬 것이다. 바람직하

게는, 항체는 MDA-MB-175 세포의 세포 증식을 외인성 HRG의 존재 및 부재 둘다 하에서 모노클로날 항체 4D5보다 더 큰 정도로 (및 임의로 모노클로날 항체 7F3보다 큰 정도로)를 억제할 수 있다.

[0189] 일 실시양태에서, 관심의 HER2 항체는 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 공동-면역침전 실험에서 측정된 바와 같이 모노클로날 항체 4D5보다 실질적으로 더 효과적으로, 바람직하게는 모노클로날 항체 7F3보다 실질적으로 더 효과적으로 MCF7 및 SK-BR-3 세포 둘다에서 HER2와 HER3의 헤레글린 의존성 회합을 차단할 수 있다.

[0190] 성장 억제성 HER2 항체를 확인하기 위해, HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 일 실시양태에서, 선택의 성장 억제성 항체는 세포 배양물에서의 SK-BR-3 세포의 성장을 약 0.5 내지 30  $\mu\text{g/mL}$ 의 항체 농도에서 약 20 내지 100%, 바람직하게는 약 50 내지 100%로 억제할 수 있다. 이러한 항체를 확인하기 위해, 미국 특허 제5,677,171호에 기재된 SK-BR-3 분석법을 수행할 수 있다. 상기 분석법에 따르면, SK-BR-3 세포를 10% 소 태아 혈청, 글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신이 보충된 F12 및 DMEM의 1:1 혼합물에서 성장시킨다. SK-BR-3 세포를 35 mm 세포 배양 디쉬에서 20,000 세포 (2 mls/35 mm 디쉬)로 플레이트한다. 디쉬당 HER2 항체 0.5 내지 30  $\mu\text{g/mL}$ 을 첨가한다. 6일 후, 비처리된 세포에 비한 세포의 수를 전기 코울터(COULTER)(상표명) 세포 계수기를 사용하여 계수한다. SK-BR-3 세포의 성장을 약 20 내지 100% 또는 약 50 내지 100%로 억제하는 항체를 성장 억제성 항체로서 선별할 수 있다. 4D5 및 3E8과 같은 성장 억제성 항체에 대해 스크리닝하는 분석법에 대해서는 미국 특허 제5,677,171호를 참조한다.

[0191] 아포토시스를 유도하는 항체를 선별하기 위해, BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석법이 이용가능하다. 선행 문단에서 논의된 바와 같이 BT474 세포를 배양하고, 디쉬에 시딩한다. 그 후, 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독 또는 모노클로날 항체 10  $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 배지로 대체한다. 3일 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 떼어낸다. 그 후, 세포 사멸 분석법에 대해 상기 논의된 바와 같이 세포를 원심분리하고,  $\text{Ca}^{2+}$  결합 완충액에 재현탁시키고, 튜브 내로 분취한다. 그 후, 튜브를 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FTIC) (1  $\mu\text{g/mL}$ )을 넣는다. 샘플을 팩스칸(FACSCAN)(상표명) 유동 세포측정기 및 팩스컨버트(FACSCONVERT)(상표명) 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (백톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석할 수 있다. 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 아포토시스-유도 항체로서 선별한다. 아넥신 결합 분석법 이외에, BT474 세포를 사용한 DNA 염색 분석법이 이용가능하다. 상기 분석법을 수행하기 위해, 선행의 2개 문단에서 기재된 바와 같이 관심의 항체로 처리된 BT474 세포를 9  $\mu\text{g/mL}$  회흐스트(HOECHST) 33342(상표명)와 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 에픽스 엘리트(EPICS ELITE)(상표명) 유동 세포측정기 (코울터 코포레이션(Coulter Corporation)) 상에서 모드피트(MODFIT) LT(상표명) 소프트웨어 (베리티 소프트웨어 하우스(Verity Software House))를 사용하여 분석한다. 상기 분석법을 사용하여, 비처리된 세포보다 2 배 이상 (바람직하게는 3 배 이상)인 아포토시스 세포의 퍼센트 변화를 유도하는 항체를 프로-아포토시스 항체로서 선별할 수 있다. 7C2 및 7F3과 같은 아포토시스를 유도하는 항체에 대한 스크리닝을 위한 분석법에 대해서는 WO 98/17797을 참조한다.

[0192] 관심의 항체에 의해 결합된 HER2 상의 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석법을 수행하여 항체가, 2C4 또는 페르투주마브와 같은 항체의 HER2에의 결합을 교차-차단하는지 여부를 평가할 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 에피토프 지도화를 당업계에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있고/거나, 항체-HER2 구조를 연구하여 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]) HER2의 도메인(들)이 항체에 의해 결합되는지를 관찰할 수 있다.

[0193] (ix) 이뮤노컨쥬게이트

[0194] 본 발명은 또한 화학요법제와 같은 세포독성제, 독소 (예를 들어 소분자 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 컨쥬게이트)에 컨쥬게이션된 항체를 포함하는 이뮤노컨쥬게이트에 관한 것이다.

[0195] 이러한 이뮤노컨쥬게이트의 생성에 유용한 화학요법제는 상기에 기재되었다. 항체, 및 칼리케아미신, 마이탄신 (미국 특허 제5,208,020호), 트리코텐 및 CC1065와 같은 1종 이상의 소분자 독소의 컨쥬게이트는 또한 본원에서 고려된다.

[0196] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 마이탄신 분자 (예를 들어 항체 분자당 약 1 내지 약 10개의 마이탄신 분자)에 컨쥬게이션된다. 마이탄신을 예를 들어 May-SS-Me로 전환시키고, 이를 May-SH3로 환원시키고, 변형된 항체와 반응시켜 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]) 마이탄신노이드

-항체 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다.

- [0197] 관심의 또다른 이뮤노컨쥬게이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 컨쥬게이션된 HER2 항체를 포함한다. 항생제의 칼리케아미신 측은 서브-피코몰 농도에서 이중-가닥 DNA 파쇄를 생성할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체로는  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-아세틸- $\gamma_1^I$ , PSAG 및  $\Theta_1^I$  (문헌 [Hinman et al. *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993)] 및 [Lode et al. *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)])을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본원에 특별히 참고로 도입된 미국 특허 제5,714,586호; 제5,712,374호; 제5,264,586호; 및 제5,773,001호를 참조한다.
- [0198] 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A쇄 (슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디아(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테신을 들 수 있다. 예를 들어 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다.
- [0199] 본 발명은 또한 항체와 핵분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제, 또는 데옥시리보뉴클레아제와 같은 DNA 엔도뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 이뮤노컨쥬게이트를 고려한다.
- [0200] 다양한 방사성 동위원소는 방사성컨쥬게이션된 HER2 항체를 제조하는데 이용가능하다. 예로는  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$  및 Lu의 방사성 동위원소를 들 수 있다.
- [0201] 항체와 세포독성제의 컨쥬게이트는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (글루타렐 데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨릴렌 2,6-디아소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)와 같은 다양한 이관능성 단백질 커플링제를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. *Science* 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오타이드의 항체에의 컨쥬게이션을 위한 예시적인 킬레이트제화이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다제-감수성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)])를 사용할 수 있다.
- [0202] 별법으로, HER2 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 제조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [0203] 또다른 실시양태에서, 항체를 "수용체" (예를 들어 스트렙타비딘)에 컨쥬게이션시켜, 항체-수용체 컨쥬게이트를 환자에 투여한 후, 비결합된 컨쥬게이트를 세척제를 사용한 순환으로부터 제거한 다음, 세포독성제 (예를 들어 방사성뉴클레오타이드)에 컨쥬게이션된 "리간드" (예를 들어 아비딘)를 투여하여 중앙 예비표적화에 이용할 수 있다.
- [0204] (x) 다른 항체 변형
- [0205] 항체의 다른 변형은 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다.
- [0206] 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 상보적 의존성 세포독성 (CDC)을 증진시키기 위해, 본 발명의 항체를 효과기 기능에 대해 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역 내에

하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입하여 상기 영역에서 쇠간 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동중이량체성 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 상보적-매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 증진된 항-종양 활성을 갖는 동중이량체성 항체는 또한 문헌 [Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이중이관능성 가교제를 사용하여 제조될 수 있다. 별법으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖고 그에 의해 증진된 상보적 용해 및 ADCC 능력을 가지도록 유전자조작될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0207] WO 00/42072 (프레스타, 엘.)에는 그의 Fc 영역 내에 아미노산 치환을 포함하는, 인간 효과기 세포의 존재하에서 개선된 ADCC 기능을 갖는 항체가 기재되어 있다. 바람직하게는, 개선된 ADCC를 갖는 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에 치환을 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 상기 위치의 1개, 2개 또는 3개에 치환을 포함하거나 이로 이루어지는 인간 IgG1 Fc 영역이다.

[0208] 변경된 C1q 결합 및/또는 상보적 의존성 세포독성 (CDC)을 갖는 항체는 WO 99/51642, 미국 특허 제6,194,551 B1호, 미국 특허 제6,242,195 B1호, 미국 특허 제6,528,624 B1호 및 미국 특허 제6,538,124호 (이두소지 (Idusogie) 등)에 기재되어 있다. 항체는 그의 Fc 영역의 하나 이상의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334에 아미노산 치환을 포함한다.

[0209] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 구조 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편) 내로 혼입할 수 있다. 본원에서 사용된 "구조 수용체 결합 에피토프"라는 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다. 그의 Fc 영역 내에 치환을 갖는 항체 및 증가된 혈청 반감기는 WO 00/42072 (프레스타, 엘.)에 기재되어 있다.

[0210] 3개 이상의 (바람직하게는 4개) 관능성 항원 결합 부위를 갖는 유전자조작된 항체가 또한 고려된다 (미국 특허 출원 제US 2002/0004587 A1호, 밀러(Miller) 등).

[0211] 본원에 개시된 HER2 항체는 또한 이뮤노리포좀으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은 문헌 [Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980)]; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 1997년 10월 23일자로 공개된 WO 97/38731에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포좀은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

[0212] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포좀을 한정된 공극 크기의 필터를 통해 압출하여 목적하는 직경을 갖는 리포좀을 수득한다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 문헌 [Martin et al. *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 디설피드 상호교환 반응을 통해 리포좀에 친유제이션될 수 있다. 화학요법제는 임의로 리포좀 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al. *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)]를 참조한다.

[0213] IV. 제약 제제

[0214] 본 발명의 조성물의 치료 제제는 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 조성물을 혼합함으로써 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]) 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로펜 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터-이온; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성

제를 들 수 있다. 동결건조된 HER2 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있다.

[0215] 본원의 제제는 또한 치료될 특정 증상에 필요한 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 보충적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. 예를 들어, 하나의 제제 내에 EGFR, HER2 (예를 들어 HER2 상의 상이한 에피토프에 결합하는 항체), HER3, HER4 또는 혈관 내피 인자 (VEGF)에 결합하는 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 방법으로, 또는 부가적으로, 조성물은 화학요법제, 세포독성제, 사이토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, EGFR-표적화된 약물, 항-혈관신생제, 티로신 키나제 억제제, 및/또는 심장보호제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 분자는 접합하게는 의도되는 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 존재한다.

[0216] 활성 성분은 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0217] 서방형 제제는 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 매트릭스가 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태인 항체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)(상표명) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 들 수 있다.

[0218] 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성된다.

[0219] V. 치료요법을 위한 환자의 스크리닝

[0220] 본원에서 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 치료요법을 위해 선택된 환자는 종양, 또는 HER (바람직하게는 HER2) 활성화를 나타내는 기타 세포 또는 조직을 갖는다. 일 실시양태에서, 시험될 암 세포 또는 기타 세포의 HER (또는 HER2) 활성화의 정도는 동일한 조직 유형의 비-암성 또는 정상 세포의 수용체 활성화의 수준을 상당히 초과한다. 이러한 초과된 활성화는 HER 수용체의 과발현 및/또는 암 세포 내의 HER 수용체를 활성화하는 데 이용되는 HER 리간드의 정상적인 수준보다 높은 수준으로부터 기인할 수 있다. 이러한 초과된 활성화는 암 세포의 악성 상태를 유발하고/거나 그에 의해 유발될 수 있다. 일부 실시양태에서, HER 수용체의 증폭 및/또는 과발현이 일어나서 HER 수용체의 이러한 초과된 활성화를 초래하는지 여부를 측정하는 진단 또는 예후 분석법에 암을 적용할 수 있다. 방법으로, 또는 부가적으로, HER 수용체의 이러한 초과된 활성화를 초래하는 HER 수용체의 증폭 및/또는 과발현이 암에서 일어나서 수용체의 초과된 과발현에 기여하는지 여부를 측정하는 진단 또는 예후 분석법에 암을 적용할 수 있다. 이러한 암의 하위집합에서, 수용체의 초과된 활성화는 자가분비 자극 경로로부터 기인할 수 있다. HER 활성화를 측정하는 다양한 예시적인 분석법은 하기에 보다 상세히 기재될 것이다.

[0221] (i) HER 이량체

[0222] 샘플을 HER 또는 HER2 활성화를 지시하는 바와 같은 HER 이량체의 존재에 대해 평가할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 EGFR-HER2, HER2-HER3과 같은 HER2 이량체를 검출할 수 있다. 몇몇 바람직한 방법은 하기에 기재되어 있다. 상기 방법은 비공유 단백질-단백질 상호작용을 검출하거나, 다르게는 관심의 단백질 사이의 근접성을 지시한다.

[0223] 면역침전법 또는 ELISA와 같은 면역친화도-기재 방법은 HER 이량체를 검출하는데 이용될 수 있다. 일 실시양태에서, HER2 항체를 사용하여 HER2를 포함하는 복합체를 종양 세포로부터 면역침전시킨 후, 생성된 면역침전물을 이뮤노블롯팅에 의해 EGFR 또는 HER3에 대해 프로브한다. 또다른 실시양태에서, EGFR 또는 HER3 항체를 면역침전 단계를 위해 사용한 후, 면역침전물을 HER2 항체로 프로브할 수 있다. 추가의 실시양태에서, EGFR, HER3, EGFR-HER2 복합체 또는 HER2-HER3 복합체에 특이적인 HER 리간드를 사용하여 복합체를 침전시킨 후, 이를 HER2에 대해 프로브할 수 있다. 예를 들어, 리간드를 아비딘에 컨쥬게이션시키고, 복합체를 비오틴 컬럼 상에서 정제할 수 있다.

[0224] 다른 실시양태에서, ELISA 또는 항체 "샌드위치"-형 분석법과 같이, HER2에 대한 항체를 고체 지지체 상에 고정화시키고, 종양 세포 또는 종양 세포 용해물과 접촉시키고, 세척한 후, 항체를 EGFR 또는 HER3에 노출시킨다.

직접적으로 또는 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된 이차 항체에 의해 검출될 수 있는 후자의 항체의 결합은 이중 이량체의 존재를 지시한다. 특정 실시양태에서, EGFR 또는 HER3 항체를 고정화시키고, HER2 항체를 검출 단계에 사용한다. 다른 실시양태에서, HER 리간드를 HER 항체 대신에 또는 그와 조합하여 사용할 수 있다.

[0225] 또한, 화학적 또는 UV 가교를 이용하여 살아있는 세포의 표면 상에 이량체를 공유 결합시킬 수 있다 (문헌 [Hunter et al., *Biochem. J.*, 320:847-53]). 화학적 가교제의 예로는 디티오비스(숙신이미딜) 프로피오네이트 (DSP) 및 3,3'-디티오비스(술포숙신이미딜) 프로피오네이트 (DTSSP)를 들 수 있다. 일 실시양태에서, 화학적으로 가교된 종양 세포로부터의 세포 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, EGFR 및/또는 HER3에 대한 항체로 이뮤노블롯팅한다. 적절한 분자량의 슈퍼쉬프트(supershifted) 밴드는 가장 가능성있게 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체를 지시하며, 이는 HER2가 EGFR 및 HER3에 대한 바람직한 이량체화 상대이기 때문이다. 상기 결과는 HER2 항체의 후속 면역블롯팅에 의해 확인될 수 있다.

[0226] 형광 공명 에너지 전달법 (FRET)은 또한 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체를 검출하는데 이용될 수 있다. FRET는 공여자 형광발색단으로부터 수용자 형광발색단으로의 에너지 전달에 기재하여 생체내 및 시험관내에서 단백질 형태 변화 및 단백질-단백질 상호작용을 검출한다 (문헌 [Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7:730-34 (2000)]). 에너지 전달은 공여자 형광발색단이 수용자 형광발색단에 충분히 근접할 때만 일어난다. 전형적인 FRET 실험에서, 2개의 단백질 또는 단일 단백질 상의 2개의 부위를 상이한 형광 프로브로 표지한다. 프로브의 하나인 공여자 프로브를 특정 파장의 입사광에 의해 보다 높은 에너지 상태에 노출시킨다. 그러면, 공여자 프로브는 그의 에너지를 제2 프로브인 수용자 프로브에 투과하여 공여자의 형광 강도의 감소 및 수용자의 형광 방출의 증가를 초래한다. 에너지 전달 정도를 측정하기 위해, 공여자 및 수용자 프로브로 표지된 샘플에서의 공여자의 강도를 공여자 프로브만으로 표지된 샘플에서의 강도와 비교한다. 임의로, 수용자 강도를 공여자/수용자 및 수용자만의 샘플에서 비교한다. 적합한 프로브는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 폴로오로세인 및 로다민과 같은 막 투과성 염료, 시아닌 염료와 같은 유기 염료, 및 란탄 원자를 들 수 있다 (셀빈(Selvin)의 상기 문헌). 에너지 전달의 검출 및 측정 방법 및 기기는 당업계에 공지되어 있다 (셀빈의 상기 문헌).

[0227] 개별 세포에서 단백질-단백질 상호작용을 검출하고 측정하는데 적합한 FRET-기재 기술은 또한 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 공여자 광표백 형광 공명 에너지 전달 (pbFRET) 현미경법 및 형광 수명 영상 현미경법 (FLIM)을 사용하여 세포 표면 수용체의 이량체화를 검출할 수 있다 (셀빈의 상기 문헌; 문헌 [Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995)]). 일 실시양태에서, 문헌 [Nagy et al., *Cytometry*, 32:120-131 (1998)]에 기재된 바와 같이, pbFRET를 "현탁액 중에서" 또는 "세포내에서" 세포 상에 사용하여 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체의 형성을 검출하고 측정한다. 상기 기술은 에너지 전달에 기인한 공여자의 형광 수명의 감소를 측정한다. 특정 실시양태에서, 네이키(Nagy) 등의 상기 문헌 및 문헌 [Brockhoff et al., *Cytometry*, 44:338-48 (2001)]에 기재된 바와 같이 유동 세포측정 퍼르스터(Foerster)-형 FRET 기술 (FCET)을 이용하여 EGFR-HER2 및 HER2-HER3 이량체화를 검사할 수 있다.

[0228] FRET는 바람직하게는 표준 번역조직화학 표지 기술과 함께 사용된다 (문헌 [Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001)]). 예를 들어, 적합한 형광 염료에 컨쥬게이션된 항체를 2개의 상이한 단백질을 표지하기 위한 프로브로서 사용할 수 있다. 단백질이 서로의 근접성 내에 있을 경우, 형광 염료는 FRET에 대한 공여자 및 수용자로서 작용한다. 에너지 전달은 표준 수단에 의해 검출된다. 에너지 전달은 유동 세포측정 수단에 의해, 또는 전하-결합 소자 (CCD) 카메라에 결합된 공초점 현미경법 또는 광시야 형광 현미경법과 같은 디지털 현미경 시스템에 의해 검출될 수 있다.

[0229] 본 발명의 일 실시양태에서, HER2 항체 및 EGFR 또는 HER3 중 하나를 예를 들어 네이키 등의 상기 문헌에 기재된 바와 같이 2개의 상이한 형광발색단으로 직접적으로 표지한다. 종양 세포 또는 종양 세포 용해물을 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체의 존재하에서 FRET에 대한 공여자 또는 수용자로서 작용하는 상이하게 표지된 항체와 접촉시킨다. 별법으로, HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나에 대해 비표지된 항체를 공여자 및 수용자로서 기능하는 상이하게 표지된 제2 항체와 함께 사용한다. 예를 들어 브로크호프(Brockhoff) 등의 상기 문헌을 참조한다. 에너지 전달을 검출하고, 표지가 가까이 근접한 것으로 발견될 경우 이량체의 존재를 측정한다.

[0230] 다른 실시양태에서, HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나에 특이적인 HER 수용체 리간드를 형광 표지하고, FRET 연구에 사용한다.

[0231] 본 발명의 다른 실시양태에서, 종양 세포의 표면 상의 이량체의 존재는 표준 직접 또는 간접 면역형광 기술 및 공초점 레이저 주사 현미경법을 이용하여 HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나의 공동-위치화에 의해 입증된다. 별법으로, 문헌 [Zuck et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11122-27 (1999)]에 기재된 바와 같이 레이저 주

사 영상화 (LSI)를 이용하여 항체 결합, 및 HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나의 공동-위치화를 마이크로웰 플레이트와 같은 고-처리량 포맷으로 검출한다.

[0232] 추가의 실시양태에서, EGFR-HER2 및/또는 HER2-HER3 이량체의 존재는 이량체 성분의 근접성에 의존하는 효소 활성을 확인함으로써 측정된다. HER2 항체는 하나의 효소와 컨주게이션되며, EGFR 또는 HER3 항체는 제2 효소와 컨주게이션된다. 제1 효소에 대한 제1 기질을 첨가하고, 반응은 제2 효소에 대한 제2 기질을 생성한다. 이는 또다른 분자와의 반응을 초래하여 염료와 같은 검출가능한 화합물을 생성한다. 또다른 화합물의 존재는 제2 기질을 파쇄하여, 제1 및 제2 효소 및 따라서 2개의 항체가 가까이 근접하지 않는다면 제2 효소와의 반응이 방지되도록 한다. 특정 실시양태에서, 종양 세포 또는 세포 용해물을 글루코스 옥시다제와 컨주게이션된 HER2 항체 및 양고추냉이 퍼옥시다제와 컨주게이션된 HER3 또는 HER1 항체와 접촉시킨다. 글루코스를 DAB 및 카탈라제와 같은 염료 전구체와 함께 반응물에 첨가한다. 이량체의 존재를 DAB에 대한 염색시 색의 전개에 의해 측정한다.

[0233] 또한, 이량체는 예를 들어 본원에 그 전문이 특별히 참고로 도입된 2001년 12월 6일자로 공개된 미국 특허 출원 제2001/0049105호에 기재된 바와 같이, eTag(상표명) 분석 시스템 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재하는 아클라라 바이오 사이언시즈(Aclara Bio Sciences))에 기재한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. eTag(상표명), 또는 "전기영동 태그"는 형광기와 같은 검출가능한 리포터 부분을 포함한다. 이는 또한 고유한 전기영동 이동성을 갖는 부분으로 본질적으로 이루어진 "이동성 변형체"를 포함할 수 있다. 상기 부분은 모세관 전기 영동법 (CE)과 같은 한정된 전기영동 조건하에서 복합 혼합물로부터 eTag(상표명)의 분리 및 검출을 허용한다. 리포터 부분 및 임의로 이동성 변형체를 함유하는 eTag(상표명)의 일부는 절단가능한 연결기에 의해 제1 표적 결합 부분에 연결되어 제1 결합 화합물을 생성한다. 제1 표적 결합 부분은 핵산 또는 단백질과 같은 특정 제1 표적을 특이적으로 인식한다. 제1 표적 결합 부분은 임의의 방식으로 제한되지 않으며, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 제1 표적 결합 부분은 항체 또는 항체 단편이다. 별법으로, 제1 표적 결합 부분은 HER 수용체 리간드 또는 그의 항체-경쟁 단편일 수 있다.

[0234] 연결기는 바람직하게는 효소 기질과 같은 절단가능한 부분, 또는 한정된 조건하에서 절단될 수 있는 임의의 화학 결합을 포함한다. 제1 표적 결합 부분이 그의 표적에 결합할 경우, 절단제를 도입하고/거나 활성화시키고, 연결기를 절단하여, 리포터 부분 및 이동성 변형체를 함유하는 eTag(상표명)의 일부를 방출한다. 따라서, "유리" eTag(상표명)의 존재는 표적 결합 부분의 그의 표적에의 결합을 지시한다.

[0235] 바람직하게는, 제2 결합 화합물은 절단제 및 제2 표적을 특이적으로 인식하는 제2 표적 결합 부분을 포함한다. 제2 표적 결합 부분은 또한 임의의 방식으로 제한되지 않으며, 예를 들어 항체 또는 항체 단편 또는 HER 수용체 리간드 또는 결합 경쟁 리간드 단편일 수 있다. 절단제는 제1 결합 화합물 및 제2 결합 화합물이 가까이 근접할 경우, 제1 결합 화합물 내의 연결기를 절단하기만 하는 것이다.

[0236] 본 발명의 실시양태에서, 제1 결합 화합물은 HER2에 대한 항체가 제1 표적 결합 부분으로서 기능하는 eTag(상표명)을 포함한다. 제2 결합 화합물은 eTag(상표명)의 연결기를 절단할 수 있는 절단제에 결합된 EGFR 또는 HER3에 대한 항체를 포함한다. 바람직하게는, 절단제는 연결기를 절단할 수 있기 위해 활성화되어야 한다. 종양 세포 또는 종양 세포 용해물을 HER2에 결합하는 eTag(상표명), 및 세포 표면 상에서 EGFR 또는 HER3에 결합하는 변형된 EGFR 또는 HER3 항체와 접촉시킨다. 결합되지 않은 결합 화합물은 바람직하게는 제거되며, 절단제는 필요할 경우 활성화된다. EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체가 존재할 경우, 절단제는 연결기를 절단하고, 연결기에 대한 절단제의 근접성에 기인하여 eTag(상표명)을 방출할 것이다. 그 후, 유리 eTag(상표명)은 모세관 전기 영동법과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0237] 일 실시양태에서, 절단제는 연결기에 작용하는 활성화가능한 화학 종이다. 예를 들어, 절단제는 샘플을 광에 노출시킴으로써 활성화될 수 있다.

[0238] 또다른 실시양태에서, eTag(상표명)은 제1 표적 결합 부분으로서 EGFR 또는 HER3에 대한 항체를 사용하여 구축되며, 제2 결합 화합물은 HER2에 대한 항체로부터 구축된다.

[0239] 또다른 실시양태에서, HER 이량체는 이량체 내의 HER 수용체에 대한 그의 결합에 비교한 바와 같은 이량체에 특이적으로 또는 선호적으로 결합하는 항체 또는 다른 시약을 사용하여 검출된다.

[0240] (H) HER2 인산화

[0241] 선행 섹션에서 논의된 EGFR, HER2 또는 HER3 항체를 사용한 면역침전법은 임의로 이뮤노블롯팅에 대한 별법 또는 보충으로서, 이량체에 대한 기능적 분석 후에 이루어질 수 있다. 일 실시양태에서, HER3 항체를 사용한 면역침전법은 면역침전물 내의 수용체 티로신 키나제 활성화에 대한 분석 후에 이루어진다. HER3이 고유의 티로신

키나제 활성을 갖지 않기 때문에, 면역침전물 내의 티로신 키나제 활성은 HER3이 HER2와 가장 가능성있게 관련됨을 지시한다 (문헌 [Graus-Porta et al., *EMBO J.*, 16:1647-55 (1997)]; [Klapper et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4995-5000 (1999)]). 상기 결과는 HER2 항체를 사용한 면역노블롯팅에 의해 확인될 수 있다. 또다른 실시양태에서, HER2 항체를 사용한 면역침전법은 EGFR 수용체 티로신 키나제 활성에 대한 분석 후에 이루어진다. 상기 분석에서, 면역침전물을 방사성 ATP, 및 EGFR에 의한 HER2의 인산 전달의 생체내 부위를 모방하는 펩티드 기질과 접촉시킨다. 펩티드의 인산화는 공동-면역침전 및 따라서 HER2를 사용한 EGFR의 이량체화를 지시한다. 수용체 티로신 키나제 활성 분석법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 포스포티로신 항체에 의한 표적 기질의 인산화, 및 MAPK 경로와 같은 동족체 신호 전달 경로의 활성화를 검출하는 분석법을 포함한다.

- [0242] HER 수용체의 인산화는 HER2 (HER2) 수용체와 같은 하나 이상의 HER 수용체의 면역침전, 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 양성면역침전된 HER 수용체(들) 내의 인산화된 티로신 잔기(들)를 검출하는 항-포스포티로신 항체를 사용하여, 겔 상의 포스포-HER2 밴드의 존재에 의해 결정된다. 항-포스포티로신 항체는 판 베라(Pan Vera) (미국 위스콘신주 메디슨에 소재), 보조로서, 인비트로젠, 케미콘 인터내셔널 인크.(Invitrogen, Chemicon International Inc.) (미국 캘리포니아주 테메큘라에 소재) 또는 업스테이트 바이오 테크놀로지(Upstate Biotechnology) (미국 뉴욕주 레이크 플라시드에 소재)로부터 시판된다. 음성은 밴드의 부재에 의해 결정된다.
- [0243] 또다른 실시양태에서, HER2 (HER2) 수용체의 인산화는 포스포-특이적 HER2 항체 (클론 PN2A; 문헌 [Thor et al., *J. Clin. Oncol.*, 18(18):3230-3239 (2000)])를 사용한 면역조직화학법에 의해 평가된다.
- [0244] HER 수용체(들)의 인산화를 검출하는 다른 방법으로는 KIRA ELISA (미국 특허 제5,766,863호; 제5,891,650호; 제5,914,237호; 제6,025,145호; 및 제 6,287,784호), 질량 분광법 (인산화 및 비-인산화 HER2의 크기를 비교), 및 HER (예를 들어 HER2) 항체 및 포스포-특이적 또는 포스포-티로신 특이적 항체 (예를 들어, 아클라라 바이오 사이언시즈 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재)로부터 시판되는 eTag(상표명) 분석 키트를 사용) 둘다를 사용한 eTag 근접성 분석법을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. eTag 분석법의 상세사항은 하기에 기재된다.
- [0245] 또한, 신호 전달 단백질의 세포 샘플에서 인산화 상태를 검출하기 위해 세포 어레이에서 포스포-특이적 항체를 사용할 수 있다 (US 2003/0190689).
- [0246] (iii) HER2 리간드
- [0247] 종양 내의 또는 종양과 관련된 TGF- $\alpha$ 와 같은 HER2 리간드의 수준은 공지된 절차에 따라 측정될 수 있다. 이러한 분석법으로 이를 코딩하는 단백질 및/또는 핵산을 시험될 샘플에서 검출할 수 있다. 일 실시양태에서, 종양 내의 HER 리간드 수준은 면역조직화학법 (IHC)을 이용하여 측정될 수 있다; 예를 들어, 문헌 [Scher et al., *Clin. Cancer Research* 1:545-550 (1995)]을 참조한다. 별법으로, 또는 부가적으로, 시험될 샘플 내의 HER 리간드-코딩 핵산의 수준은 예를 들어 FISH, 서던 블롯팅 또는 PCR 기술을 통해 시험될 수 있다.
- [0248] (iv) 비-HER2 과발현 암
- [0249] 암이 HER2 수용체의 과발현을 특징으로 할 수 있지만, 본 출원은 또한 HER2-과발현으로 간주되지 않는 암의 치료 방법도 제공한다.
- [0250] 암에서 HER2 발현을 측정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석법이 이용가능하다. 일 실시양태에서, HER2 과발현은 IHC에 의해, 예를 들어 허셉트테스트(HERCEPTEST)(등록상표) (다코(Dako))를 이용하여 분석될 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀을 넣은 조직 섹션을 IHC 분석하고, HER2 단백질 염색 강도 범주를 하기와 같이 부여한다.
- [0251] 스코어 0 염색이 관찰되지 않거나, 막 염색이 종양 세포의 10% 미만으로 관찰된다.
- [0252] 스코어 1+ 희미한/빈약하게 인식가능한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과로 검출된다. 세포는 그의 막의 일부에서만 염색된다.
- [0253] 스코어 2+ 약한 내지 중간의 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.
- [0254] 스코어 3+ 중간 내지 강한 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.
- [0255] HER2 과발현 평가에 대한 0 또는 1+ 스코어를 갖는 종양은 HER2를 과발현하지 않는 것으로서 특성화될 수 있는

반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 갖는 종양은 HER2를 과발현하는 것으로서 특성화될 수 있다.

- [0256] HER2를 과발현하는 종양은 세포당 발현된 HER2 분자의 카피의 수에 상응하는 면역조직화학 스코어에 의해 등급화될 수 있으며, 생화학적으로 측정될 수 있다.
- [0257] 0 = 0 내지 10,000 카피/세포,
- [0258] 1+ = 약 200,000 카피/세포 이상,
- [0259] 2+ = 약 500,000 카피/세포 이상,
- [0260] 3+ = 약 2,000,000 카피/세포 이상.
- [0261] 티로신 키나제의 리간드-비의존성 활성화를 초래하는 3+ 수준의 HER2의 과발현 (문헌 [Hudziak et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 (1987)])은 유방암의 대략 30%에서 일어나며, 상기 환자에서, 재발 없는 생존 및 총 생존은 감소한다 (문헌 [Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989)]; [Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)]). 별법으로, 또는 부가적으로, 인폼(INFORM)(상표명) (미국 아리조나주에 소재하는 벤타나(Ventana)에서 판매) 또는 파트비전(PATHVISION)(상표명) (미국 일리노이주에 소재하는 바이시스(Vysis))과 같은 FISH 분석법을 포르말린-고정된 파라핀을 넣은 종양 조직 상에서 수행하여 종양 내의 HER2 과발현의 정도 (있다면)를 측정할 수 있다.
- [0262] 일 실시양태에서, 암은 EGFR을 발현하는 (및 과발현할 수 있는) 것일 것이며, 이러한 발현은 상기 설명된 바와 같이 HER2 발현을 평가하는 방법으로 평가될 수 있다.
- [0263] HER 수용체 또는 HER 리간드 과발현 또는 증폭은 또한 예를 들어 검출될 분자에 결합하는 분자 (예를 들어 항체)를 투여하고, 검출가능한 표지 (예를 들어 방사성 동위원소)로 태깅하고, 환자를 표지의 위치화에 대해 외부적으로 스캐닝함으로써 생체내 진단 분석법을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0264] V. HER2 항체 조성물을 사용한 치료
- [0265] 본 발명에 따르면, HER2 항체는 암을 치료하는데 사용할 수 있는 것으로 고려된다. 암은 일반적으로 HER2-발현 세포를 포함하며, 본원에서 HER2 항체는 암 세포에 결합할 수 있다. 조성물로 치료될 수 있는 다양한 암은 상기 정의 섹션에 열거되어 있다.
- [0266] 또한, HER2 항체를 사용하여 다양한 비-악성종양 질환 또는 장애, 예를 들어 자가면역 질환 (예를 들어 건선); 자궁내막증; 피부경화증; 재협착; 결장 폴립, 비폴립 또는 위장관 폴립과 같은 폴립; 섬유선종; 호흡기 질환; 담낭염; 신경섬유종증; 다낭성 신병; 염증성 질환; 건선 및 피부염을 비롯한 피부 장애; 혈관 질환; 혈관 상피 세포의 비정상적 증식과 관련된 상태; 위장관 궤양; 메네트리에병, 젯분비호르몬비 선종 또는 단백질 소실 증후군; 신장 장애; 혈관신생 장애; 연령 관련된 황반 퇴행, 안 히스토플라즈마 증후군, 증식성 당뇨병성 망막병증으로부터의 망막 혈관신생, 망막 혈관신생, 당뇨병성 망막병증, 또는 연령 관련된 황반 퇴행과 같은 안 장애; 골관절염, 구루병 및 골다공증과 같은 관련된 병리학; 뇌 허혈 이벤트 후 손상; 간 경화증, 폐 섬유증, 카르코이도시스(carcoidosis), 갑상선염, 과다점성 증후군, 전신 오슬러 웨버-렌두(Osler Weber-Rendu)병, 만성 폐쇄성 폐 질환, 또는 화상, 외상, 방사선, 뇌졸중, 저산소증 또는 허혈 후 부종과 같은 섬유성 또는 부종성 질환; 피부의 과민성 반응; 당뇨병성 망막병증 및 당뇨병성 신장병증; 길랑-바레 증후군; 이식편 대 숙주 질환 또는 이식 거부반응; 파제트병; 골 또는 관절염증; 광노화 (예를 들어 인간 피부의 UV 방사선에 의해 유발됨); 양성 전립선 비대증; 아데노바이러스, 한타바이러스, 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 예르시니아(*Yersinia*) 종 및 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*)로부터 선택된 미생물 병원균을 비롯한 특정 미생물 감염; 혈소판 응고에 의해 유발된 혈전; 자궁내막증, 난소 과다자극 증후군, 자간전증, 기능부전 자궁 출혈, 또는 불규칙과다월경과 같은 생식기 상태; 윤활막염; 죽종; 급성 및 만성 신장병증 (증식성 사구체신염 및 당뇨병-유도된 신장 질환 포함); 습진; 비대성 흉터 형성; 내독소성 쇼크 및 진균 감염; 가족성 선종증 폴립증; 신경퇴행성 질환 (예를 들어 알츠하이머병, AIDS-관련된 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 망막 색소변성, 척수 근육 위축증 및 소뇌 변성); 골수형이상 증후군; 재생불량성 빈혈; 허혈 손상; 폐, 신장 또는 간의 섬유증; T-세포 매개된 과민 질환; 영아 비후성 유문 협착증; 요로 폐쇄증; 건선성 관절염; 및 하지모토 갑상선염을 치료할 수 있는 것이 고려된다. 본원에서 치료요법을 위한 바람직한 비-악성종양 증상으로는 건선, 자궁내막증, 피부경화증, 혈관 질환 (예를 들어 재협착, 아테롬성동맥경화증, 심장 동맥 질환 또는 고혈압), 결장 폴립, 섬유선종 또는 호흡기 질환 (예를 들어 천식, 만성 기관지염, 기관지확장증 또는 낭성 섬유증)을 들 수 있다.

- [0267] HER2 항체를 사용한 치료는 질환의 징후 또는 증상의 개선을 초래할 것이다. 예를 들어, 치료될 질환이 암일 경우, 이러한 치료요법은 생존 (전체 생존 및/또는 진행이 없는 생존)의 개선을 초래할 수 있고/거나 객관적인 임상적 반응 (부분적 또는 완전한)을 초래할 것이다.
- [0268] 바람직하게는, 투여되는 조성물 중의 HER2 항체는 네이키드(naked) 항체이다. 그러나, 투여되는 HER2 항체는 세포독성제와 컨쥬게이션될 수 있다. 바람직하게는, 결합된 이뮤노컨쥬게이트 및/또는 HER2 단백질은 세포에 의해 내재화되어 이것이 결합하는 암 세포를 사멸시키는 이뮤노컨쥬게이트의 증가된 치료 효능을 초래한다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포 내의 핵산을 표적화하거나 간섭한다. 이러한 세포독성제의 예로는 마이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 들 수 있다.
- [0269] HER2 항체는 예를 들어 식피로서 정맥내 투여, 또는 시간의 경과에 따른 연속 주입, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 동맥내, 윤활막내, 수막강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해서와 같은 공지된 방법에 따라 인간 환자에게 투여된다. 항체 조성물의 정맥내 투여가 바람직하다.
- [0270] 질환의 예방 또는 치료를 위해, HER2 항체의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 질환의 종류, 질환의 중증도 및 과정, HER2 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료요법, 환자의 임상적 병력 및 HER2 항체에 대한 반응, 및 참여하는 의사의 판단에 의존할 것이다. HER2 항체는 적합하게는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 종류 및 중증도에 따라, HER2 항체 약 1  $\mu\text{g/kg}$  내지 50 mg/kg (예를 들어 0.1 내지 20 mg/kg)이 예를 들어 하나 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 일 실시양태에서, HER2 항체에 대한 초기 주입 시간은 후속 주입 시간보다 길 것이며, 예를 들어 초기 주입 시간은 대략 90분, 및 후속 주입은 대략 30분 (초기 주입에 내성이 잘 될 경우)일 수 있다. HER2 항체의 바람직한 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 하나 이상의 투여량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 투여량은 간헐적으로, 예를 들어 매주마다 또는 매 3주마다 (예를 들어 환자가 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 투여량의 HER2 항체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 초기의 보다 높은 부하 투여량 후 하나 이상의 보다 낮은 투여량이 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, HER2 항체는 대략 매 3주마다 대략 840 mg 후 대략 420 mg의 부하 투여량으로서 투여된다. 또다른 실시양태에서, HER2 항체는 대략 매 3주마다 대략 1050 mg의 투여량으로서 투여된다.
- [0271] 다른 치료제는 HER2 항체와 조합될 수 있다. 이러한 조합된 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 조성물을 사용한 공동투여 또는 동시 투여, 및 바람직하게는 활성제 둘다 (또는 전부)가 그의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 있도록 어느 순서로든 연속적인 투여를 포함한다. 따라서, 다른 치료제는 HER2 항체의 투여 전에, 또는 후에 투여될 수 있다. 상기 실시양태에서, 다른 치료제의 하나 이상의 투여와 HER2 항체의 하나 이상의 투여 사이의 시간은 바람직하게는 대략 1개월 이하, 가장 바람직하게는 대략 2주 이하이다. 별법으로, 다른 치료제 및 HER2 항체는 단일 제제 또는 별개 제제로 환자에게 동시에 투여된다.
- [0272] HER2 항체와 조합될 수 있는 다른 치료제의 예로는 항-대사물과 같은 화학요법제, 예를 들어 겐시타빈; 제2의 상이한 HER2 항체 (예를 들어, 성장 억제성 HER2 항체, 예를 들어 트라스투주마브, 또는 HER2-과발현 세포의 아포토시스를 유도하는 HER2 항체, 예를 들어 7C2, 7F3 또는 그의 인간화 변이체); 또다른 종량 관련된 항원에 대해 지정된 제2 항체, 예를 들어 EGFR, HER3, HER4; 항-호르몬성 화합물, 예를 들어, 항에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜, 또는 아로마타제 억제제; 심장보호제 (치료요법과 관련된 임의의 심근 기능부전을 예방하거나 감소시킴); 사이토킨; EGFR-표적화된 약물 (예를 들어 타르세바(TARCEVA)(등록상표), 이레사(IRESSA)(등록상표) 또는 세툽시마브); 항-혈관신생제 (특히 제넨테크에서 상표명 아바스틴(AVASTIN)(상표명)으로 판매하는 베바시주마브); 티로신 키나제 억제제; COX 억제제 (예를 들어 COX-1 또는 COX-2 억제제); 비-스테로이드성 항염증 약물, 셀레코시브 (셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (예를 들어, 존슨 앤드 존슨 (Johnson and Johnson)에서 시판되는 티피파르니브/자르네스트라(ZARNESTRA)(등록상표) R115777 또는 셰링-플루(Schering-Plough)에서 시판되는 로나파르니브 SCH66336); 종양태아성 단백질 CA125에 결합하는 항체, 예를 들어 오레고보마브 (MoAb B43.13); HER2 백신 (예를 들어 파르멕시아(Pharmexia)의 HER2 오토 백신(Auto Vac) 백신, 또는 덴드레온(Dendreon)의 APC8024 단백질 백신, 또는 GSK/코릭사(Corixa)의 HER2 펩티드 백신); 또다른 HER 표적화 요법 (예를 들어 트라스투주마브, 세툽시마브, 게피티니브, 에를로티니브, CI1033, GW2016 등); Raf 및/또는 ras 억제제 (예를 들어, WO 2003/86467 참조); 독실; 토페테칸; 탁산; GW572016; TLK286; EMD-7200; 구역을 치료하는 의약, 예를 들어 세로토닌 길항제, 스테로이드 또는 벤조디아제핀; 국소 또는 경구 항생제를 비롯한 피부 발진을 예방 또는 치료하는 의약 또는 표준 여드름 요법; 체온-감소 의약, 예를 들어 아세트아미노

펜, 디펜히드라민 또는 메페리딘; 조혈 성장 인자 등 중 임의의 1종 이상을 들 수 있다.

- [0273] 임의의 상기 공동투여되는 제제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 것이며, 제제 및 HER2 항체의 조합된 작용(상승작용)에 기인하여 보다 낮아질 수 있다. HER2 항체 조성물과 다른 치료제의 조합물을 사용한 치료는 상승적인, 또는 상가적인 것 초과라 치료 효과를 환자에게 초래할 수 있다.
- [0274] 화학요법제가 투여될 경우, 이는 통상적으로 이를 위한 공지된 투여량으로 투여되거나, 또는 화학요법제의 투여에 기여하는 약물의 조합된 작용 또는 음성 부작용에 기인하여 임의로 저하된다. 이러한 화학요법제에 대한 제제 및 투여 스케줄은 제조업자의 지시에 따라, 또는 당업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 이러한 화학요법에 대한 제제 및 투여량 스케줄은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다.
- [0275] 상기 치료 처방 이외에, 환자에게 암 세포의 외과적 제거 및/또는 방사선 요법을 가할 수 있다.
- [0276] VII. 재료의 기탁
- [0277] 하기 하이브리도마 세포주를 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불바드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁하였다.
- [0278] 항체 지칭 ATCC 번호 기탁일
- [0279] 7C2 ATCC HB-12215 1996년 10월 17일
- [0280] 7F3 ATCC HB-12216 1996년 10월 17일
- [0281] 4D5 ATCC CRL 10463 1990년 5월 24일
- [0282] 2C4 ATCC HB-12697 1999년 4월 8일
- [0283] 본 발명의 보다 상세한 사항은 하기 비-제한적 실시예에 의해 설명된다. 본 명세서의 모든 인용문에 대한 개시는 특별히 본원에 참고로 도입된다.
- [0285] 실시예
- [0286] 페르투주마브 조성물의 특성화
- [0287] 페르투주마브는 인간 IgG1(□) 프레임워크에 기재하여 생성된 재조합 인간화 모노클로날 항체이다. 이는 2개의 중쇄 (448 잔기) 및 2개의 경쇄 (214 잔기)를 포함한다. 2개의 중쇄는 2개의 쇠간 디설피드에 의해 연결되며, 각각의 경쇄는 하나의 쇠간 디설피드를 통해 중쇄에 부착된다. 2개의 중쇄의 Asn-299에는 페르투주마브의 Fc 영역 내에 N-연결된 글리코실화 부위가 있다. 페르투주마브는 경쇄 (12 아미노산 차이) 및 중쇄 (30 아미노산 차이)의 에피토프 결합 영역에서 헤르셉틴(등록상표) (트라스투주마브)와 상이하다. 상기 차이의 결과로서, 페르투주마브는 HER2 수용체 상의 완전히 상이한 에피토프에 결합한다. 페르투주마브의 인간 상피 세포 상의 HER2 수용체와의 결합은, 이것의 HER 수용체 족의 다른 구성원과의 복합체 형성을 방지한다 (문헌 [Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]). 복합체 형성을 차단함으로써, 페르투주마브는 복합체 (예를 들어 EGF 및 헤레글린)에 대한 리간드의 성장-자극 효과를 방지한다. 시험관내 실험은 페르투주마브 및 페르투주마브-Fab 둘다가 헤레글린 (HRG)의 MCF7 세포와의 결합을 억제함과, HER2-HER3 복합체의 HRG-자극된 인산화가 페르투주마브 및 페르투주마브-Fab 둘다에 의해 억제될 수 있음을 입증하였다 (문헌 [Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]). 또한, 페르투주마브 및 페르투주마브의 폴리에틸렌 글리콜 유도체화된 Fab에 의한 종양 성장의 생체내 억제는 무린 전립선암 이종이식 모델에서 필적할 만한 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]). 상기 데이터는 항체의 Fc 영역이 종양 성장의 억제에 필수적이지는 않으며, 더욱이 이가성(bivalency) 및 Fc-매개된 효과기 기능이 생체내 또는 시험관내 생물학적 활성에 요구되지 않는 것을 암시한다.
- [0288] 재조합적으로 유전자조작된 차이나이스 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 발현된 하기 샘플을 분석하였다.
- [0289] 샘플 제조 과정 스케일
- [0290] 참조 물질 I 상 400 L
- [0291] Lot S9802A II 상 2000 L

- [0292] 공정 전개 물질 (구동 III 상을 비롯한 400 L
- [0293] 1, 2, 3, 5, 및 6) 임상적 전개 프로그램
- [0294] 주: 400 L 구동 4는 2일에서의 접종물 배양물 100 L에서의 오염 때문에 이용가능하지 않음.
- [0295] N-말단 서열 분석
- [0296] N-말단 서열 분석을 표준 에드만(Edman) 분해법을 이용하여 수행하였고, 결과를 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에 대해 각각 표 2a, 표 2b 및 표 2c에 나타낸다. 경쇄 및 중쇄의 예상된 N-말단 서열 (도 3a 및 도 3b)을 모든 샘플에서 관찰하였다. 예상된 N-말단 서열에 선행하는 3개의 추가 아미노산 Val-His-Ser (VHS)을 갖는 경쇄에 상응하는 추가의 부차 서열을 또한 5개의 샘플에서 검출하였다. VHS 서열은 단백질이 분비될 때 이로부터 제거되는 신호 펩티드의 일부이다. 신호 펩티드의 교대의 절단은 페르투주마브의 N-말단에서 VHS 연장물을 초래한다. I/II 상 임상 연구에 대해 이전에 제조된 물질에서, 약 2% 내지 4%의 페르투주마브 분자는 N-말단 VHS 서열을 함유하는 2개의 경쇄 중 하나를 갖는다. 그러나, 상기 물질에서 N-말단 VHS 서열을 갖는 경쇄의 수준 (각각의 경쇄의 1% 내지 2%)은 너무 낮아서 N-말단 서열 분석에서 검출될 수 없었다. 5개의 공정 전개 샘플에서, 상기 경쇄 중의 수준은 약 4% 내지 5%로 N-말단 분석의 검출 한계를 약간 상회한다. 5개의 공정 전개 샘플에 대한 N-말단 시퀀싱 데이터는 양이온 교환 크로마토그래피 결과와 일치하고, 이는 5개의 공정 전개 샘플이 VHS 연장물을 함유하는 하나의 경쇄를 갖는 대략 9%의 페르투주마브 분자를 가짐을 나타낸다 (하기 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC) 참조).
- [0297] 다른 서열은 검출되지 않았으며 (3%에서 예측된 검출 한계), 이는 내부 절단 부위의 부재를 지시한다.
- [0298] 질량 분광 분석
- [0299] 페르투주마브 샘플을 디티오트레이톨로 환원시키고, PE SCIEX API 3000(상표명) 질량 분광계를 사용하여 전기분사-이온화 질량 분광법 (ESI-MS)에 의해 분석하여 중쇄 및 경쇄의 질량이 예상된 서열과 일치하는지를 확인하였다. 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에 대한 재구성된 질량 스펙트럼을 도 8a 및 도 8b에서 비교한다. 관찰된 경쇄 질량 (23,524 Da)은 모든 3개의 물질에 대해 그의 서열로부터 예측된 값과 일치한다. 23,685 Da 및 23,847 Da에서의 2개의 추가의 부차 피크 (경쇄 질량보다 각각 161 및 323 Da 더 높음)를 관찰하였다. 제1 피크 (23,685 Da)는 경쇄에서의 글리케이션으로부터 발생될 가능성이 있다. 제2 피크 (23,847 Da)는 400 L 스케일 공정 전개 물질에서 보다 명확하게 관찰된다. 상기 피크는 Val-His-Ser 연장물을 갖는 경쇄 (상기 N-말단 서열 분석 및 양이온 교환 크로마토그래피 분석 참조) 또는 2개의 글리케이션 부위를 갖는 경쇄로부터의 것일 것이다.
- [0300] 중쇄의 상이한 형태에 상응하는 몇몇 질량을 관찰하였다. 중쇄의 우세한 종은 G0 올리고당류 구조를 갖는 잔기 1 내지 448로 이루어진 중쇄로부터 발생되는 50,532 Da의 질량을 갖는다. 다른 관찰된 형태는 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 갖는 잔기 1 내지 448을 함유하는 중쇄를 포함한다 (도 8b).
- [0301] 양이온 교환 크로마토그래피 및 모세관 구역 전기영동법에 의한 전하 이질성
- [0302] 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)를 이용하여 페르투주마브에서의 전하 이질성을 평가하였다. 카르복시펩티다제 B (CPB)를 사용한 처리 전후의 샘플을 디오넥스(DIONEX)(상표명) 양이온 교환 컬럼 (프로파크(PROPAC) WCX-10(상표명), 4 mm x 250 mm)으로 pH 6.0, 20 mM MES 완충액 및 열은 NaCl 구배를 사용하여 분석하였다. 크로마토그램의 비교를 도 9a (CPB 처리 전) 및 도 9b (CPB 처리 후)에 나타낸다. 다중 피크는 모든 3개의 로트(lot)에서 관찰되었다. 특성화 목적을 위해, 크로마토그램을 6개의 영역 (도 9a 내지 9b에서 A 내지 F로 표지됨)로 나누었다. 6개의 영역에 대한 상대적 피크 면적을 표 3a 및 표 3b에 열거한다. 산성 변이체의 양 (영역 A 내)은 참조 물질에서보다 Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질에서 더 높았다. 중쇄의 하나 (영역 C) 또는 둘다 (영역 D) 상에 C-말단 리신 잔기를 갖는 페르투주마브를 함유하는 것을 나타내는 영역 C 및 D 내의 염기성 변이체는 참조 물질과 비교할 경우 Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질에서 감소하였다. CPB 처리 후, 1개 또는 2개의 중쇄 C-말단 리신을 갖는 페르투주마브 분자는 영역 B 내의 주요종으로 전환되었고, 영역 C 및 D에서 더 이상 검출되지 않았다. 동일성이 아직 측정되지 않은 작은 피크만이 CPB 처리 후에 영역 C에 남아있었다. VHS 연장물을 함유하는 하나의 경쇄를 갖는 페르투주마브 분자로부터 발생된 것으로 나타난 영역 E 내의 염기성 변이체는 참조 물질 및 Lot S9802A (4%)에서보다 400 L 스케일 공정 전개 물질 (9% 내지 10%)에서 더 높다. 영역 F 내의 염기성 변이체는 하나의 경쇄 상에 N-말단 VHS 연장물 및 하나의 중쇄 상에 C-말단 리신을 함유하는 페르투주마브인 것으로 나타났다. 보다 높은 수준의 산성 및 염기성 변이체의 결과로서,

영역 B 내의 주요종은 참조 물질 또는 Lot S9802A에서보다 400 L 스케일 공정 전개 물질에서 더 낮다.

[0303] 양이온 교환 크로마토그래피 이외에, 모세관 구역 전기영동법 (CZE)을 이용하여 페르투주마브의 전하 이질성을 검사하였다. CZE 피크를 확인하고 개별적으로 수집된 CEC 분획을 CZE로 분석함으로써 CEC 분석에서 관찰된 상기 피크를 상관시켰다. CZE 및 CEC에 의해 측정된 전하 변이체의 상대적 양은 분석된 모든 물질에 대해 필적할 만하다.

[0304] 상이한 CEC 분획에서의 페르투주마브 전하 변이체의 생물학적 활성은 세포-기재 항-중식 분석을 기준으로 동일한 것으로 보인다. 따라서, 페르투주마브에서의 전하 이질성은 그의 효능에 영향을 주지 않는 것으로 예상된다. 400 L 공정 전개 물질의 생물학적 활성은 참조 물질 및 Lot S9802A의 것과 필적할 만하다 (생물학적 활성 및 표 4 참조).

[0305] 크기-배제 크로마토그래피

[0306] 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 페르투주마브에서의 응집 정도를 측정하였다. 샘플을 토소하스 (TOSHAAS) TSK G3000SWXL(상표명) 컬럼 (7.8 mm x 300 mm) 상에서 분석하였다. 이소크레틱 용리를 이용하여 자외선 (UV) 흡광도를 280 nm에서 모니터링하였다 (100 mM 인산칼륨, pH 6.8, 0.5 mL/분). 참조 물질, Lot S9802A, 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에 대한 SEC 데이터를 도 10에 나타낸다. 단량체는 99.6 피크 면적% 초과로 일치하고, 응집은 분석된 모든 물질에서 0.3% 미만이다.

[0307] CE-SDS-LIF 분석

[0308] 또한, 레이저-유도된 형광을 사용한 모세관 전기영동-나트륨 도데실 분석 (CE-SDS-LIF)을 이용하여 페르투주마브 샘플의 순도를 평가하였다. 유사한 일렉트로페로그램을 참조 물질, Lot S9802A, 및 환원을 실시하거나 실시하지 않은 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에 대해 관찰하였다 (도 11a 및 11b). 유도된 물질의 일렉트로페로그램으로부터 측정된 비-글리코실화된 중쇄의 수준은 (총 중쇄에 대해) 2.6% 내지 4.3%였다. CE-SDS-LIF 분석에 의해 측정된 상기 샘플 (비-환원된)에서의 응집체의 양은 SEC 결과와 일치한다. 유의한 생성물 단편 또는 다른 불순물의 증거는 상기 샘플의 CE-SDS-LIF 분석에서 발견되지 않았다. CE-SDS-LIF 데이터는 400 L 스케일 공정 전개 물질의 프로파일이 참조 물질 및 Lot S9802A의 것과 유사함을 암시한다.

[0309] SDS-PAGE 분석

[0310] SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 분석 (시프로러비(SYPRORUBY)(상표명) 염색된 4% 내지 20% T 겔 (일본 도쿄에 소재하는 다이이찌 퓨어 케미칼스 캄파니.(Daichi Pure Chemicals Co.))을 수행하여 참조 물질, Lot S9802A, 및 400 L 스케일 공정 전개 물질의 환원 및 비손상 샘플을 비교하였다. 새로운 밴드는 400 L 스케일 공정 전개 물질에서 관찰되지 않았으며, 이는 다시금 400 L 스케일 공정 전개 물질의 전체 불순물 프로파일이 참조 물질 및 Lot S9802A와 유사함을 지시한다.

[0311] 트립신 및 Lys-C 펩티드 지도 분석

[0312] 트립신 및 Lys-C 펩티드 지도 분석을 수행하여 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질에서의 페르투주마브의 일차 구조를 검사하고 비교하였다. 환원된 및 S-카르복시메틸화된 페르투주마브의 분취액을 트립신으로 소화시키고, 환원된 및 술포톨화된 페르투주마브의 분취액을 엔도프로테아제 Lys-C로 소화시켰다. 트립신 소화물을 0% 내지 60% 아세트오니트릴 구배를 갖는 VYDAC C-18(상표명) 컬럼 (4.6 mm x 250 mm)을 사용하여 역상 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 흡광도를 214 nm에서 모니터링하고, 펩티드 질량을 써모 핀니간 (THERMO FINNIGAN) LCQ(상표명)을 사용하여 ESI-MS에 의해 측정하였다. Lys-C 소화물을 0% 내지 100% 이소프로필 알코올 (IPA) 구배를 갖는 조르박스(ZORBAX) C-8(상표명) 컬럼 (4.6 mm x 150 mm)을 사용하여 역상 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 흡광도를 214 nm에서 모니터링하고, 펩티드 질량을 써모 핀니간 LCQ(상표명)을 사용하여 ESI-MS에 의해 측정하였다.

[0313] 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에 대한 트립신 및 Lys-C 펩티드 지도를 각각 도 12a 및 도 12b에 비교한다. 모든 3개의 물질에 대한 트립신 및 Lys-C 지도 둘다는 본질적으로 동일하다. 대부분의 펩티드는 LC-MS에 의해 확인되었고, 예상된 펩티드 질량과 일치하였다. 관찰된 트립신 펩티드는 중쇄 잔기의 97.1% (436/449) 및 경쇄 잔기의 95.8% (205/214)를 확인시켰다. Lys-C 지도에서 서열 범위는 중쇄 및 경쇄에 대해 각각 98.4% (442/449) 및 70.6% (151/214)이다. LC-MS에 의한 트립신 펩티드 지도에서 VHS 연장물을 함유하는 N-말단 펩티드는 VHS 연장물이 없는 N-말단 펩티드와 공동-용출되는 것으로 밝혀졌다. 펩티드 지도에서 탈아미드화된 또는 산화된 펩티드의 유의한 양은 검출되지 않았다.

- [0314] 생물학적 활성
- [0315] 페르투주마브의 생물학적 활성을 인간 유방암 세포주 MDA-MB- 175-VII의 증식을 억제하는 그의 능력을 측정함으로써 측정하였다. 5개의 400 L 스케일 공정 전개 샘플에 대해 수득된 퍼센트 비활성 (표 4)은 참조 물질 (100%로 정의) 및 Lot S9802A (분석의 증명에서 98%로 보고됨)에 대한 활성과 유사한 90% 내지 96% 범위이다. 예상된 바와 같이, 전하 이질성은 페르투주마브의 효능에 영향을 주지 않는다. 모든 물질은 필적할 만한 항-증식 활성을 갖는다.
- [0316] N-연결된 올리고당류 분석
- [0317] 중쇄의 질량 이질성의 일부는 Asn-299에서의 글리코실화로부터 발생된다. 올리고당류의 이질성을 평가하기 위해, 페르투주마브 샘플을 PNGase F로 밤새 소화시켜 N-연결된 글리칸을 방출하였다. 그 후, 방출된 올리고당류를 형광발색단 9-아미노-1,4,6-트리술포네이트 (APTS)로 유도체화하였다. 개별 글리칸 형태를 모세관 전기영동법 (CE) (베크만(Beckman) 코팅된 모세관이 구비된 베크만 P/ACE 5500 CE)에 의해 분리하고, 형광 검출로 정량하였다.
- [0318] 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질로부터 방출된 중성 올리고당류의 CE 분석으로부터의 일렉트로페로그램을 도 13에 나타낸다. 참고를 위해, 인간 IgG1 항체에서 통상적으로 발견되는 올리고당류 구조, 및 사용된 명명법의 요약이 도 14a 및 14b에 포함되어 있다. 모든 물질에서의 올리고당류의 상대적인 양을 표 5에 요약한다.
- [0319] G0 및 G1 구조를 갖는 올리고당류는 우세한 글리칸이다. 또한, 다른 올리고당류 구조로부터 발생된 피크를 일렉트로페로그램에서 관찰하였다. 상기 구조는 G2, G0-F, G-I, Man5 및 G1-1 (또는 Man6) 글리코형(glycoform)을 포함한다. 또한, 이소형을 분석하였다. 관찰된 글리칸의 분포는 모든 물질에서 유사하다 (표 5). 그러나, 참조 물질 및 400 L 스케일 공정 전개 물질에 비해, II 상 물질 (Lot S9802A)은 G0 구조를 갖는 보다 적은 양의 글리칸 및 G1 구조를 갖는 보다 많은 글리칸을 갖는다. 글리칸 분포의 차이에도 불구하고, 모든 물질은 유사한 생물학적 활성을 갖는다. 또한, 글리칸 이질성의 변화는 FcRn (표 6) 또는 Fc 감마 수용체에 대한 페르투주마브의 결합 친화도에 유의한 영향을 갖지 않는다 (FcRn 수용체 및 Fc 감마 수용체 결합 분석 참조) (표 7).
- [0320] 방출된 중성 올리고당류를 또한 MALDI-TOF 질량 분광법 (MALDI-TOF/MS)에 의해 분석하였다. 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질로부터 방출된 중성 올리고당류에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼을 도 15에 비교한다. MALDI-TOF/MS 분석으로부터 수득된 글리칸 구조 및 분포는 CE 결과와 일치한다.
- [0321] 모세관 등전 집중 분석
- [0322] 모세관 등전 집중 (cIEF)을 이용하여 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 구동 1 공정 전개 물질에서의 페르투주마브의 pI를 측정하였다. 상기 물질에서의 상이한 하전된 종의 상대적 양이 CEC 분석에서 관찰된 바와 다소 상이하였지만, 주요종의 pI는 모든 샘플에서 8.7인 것으로 밝혀졌다.
- [0323] 유리 술포히드릴 분석
- [0324] 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질을 엘만(Elman) 분석을 이용하여 유리 티올 (짜짓지 않은 시스테인 잔기)에 대해 시험하였다. 유리 티올 수준은 시험된 모든 물질에서 검출 한계 미만이었다 (단백질 1 몰당 유리 티올 대략 0.05 몰).
- [0325] FcRn 수용체 결합 분석
- [0326] 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질로부터의 페르투주마브의 FcRn 수용체 결합 친화도를 문헌 [Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)]에 기재된 것과 유사한 ELISA 분석법을 이용하여 비교하였다. 참조 물질을 상기 분석에서 표준물질로 사용하였다.
- [0327] 맥시소르프(MAXISORP)(상표명) 96-웰 마이크로웰 플레이트 (덴마크 로스킬드에 소재하는 닌크(Nunc))를 먼저 뉴트라바딘(NEUTRAVADIN)(상표명) (미국 일리노이주 록포드에 소재하는 피어스(Pierce))를 사용하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 후, 비오틴화된 인간 FcRn을 플레이트에 2  $\mu$ g/mL로 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 페르투주마브 샘플의 2배 일련 희석액 (3.1 내지 3200 ng/mL) 11개를 플레이트에 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 페르투주마브를 염소 F(ab')<sub>2</sub> 항-인간 IgG F(ab')<sub>2</sub> (미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브에 소재하는 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))로 표지된 퍼옥시다제를 첨가하고, 3,3',5,5'-테트라메틸

벤지딘 (TMB) (미국 메릴랜드주 케티스버그에 소재하는 커크가드 앤드 페리 래버리토리즈(Kirkegaard & Perry Laboratories))을 기질로서 사용하여 검출하였다. 흡광도를 티테르텍스 멀티스캔(TITERTEK MULTISKAN)(상표명) (MCC/340) 판독기 (미국 캘리포니아주 코스타 메사에 소재하는 ICN) 상에서 450 nm에서 판독하였다. 페르투주마브의 FcRn 결합 친화도를 또한 HER2-ECD가 플레이트 상에 코팅된 제2 ELISA 포맷에서 평가하였다. 일련 희석된 페르투주마브 샘플을 플레이트에 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 비오티닐화된 인간 FcRn 2 mg/mL을 첨가하였다. 결합된 FcRn을 기질로서 TMB를 사용해 스트렙타비딘-HRP를 이용하여 검출하였다.

[0328] 표준물 (즉, 참조 물질)의 역가 곡선의 중간점 (mid-OD)에서의 흡광도 및 상기 mid-OD에서의 표준물 및 샘플의 상응하는 농도를 측정하였다. 상대적 결합 친화도를 표준물의 mid-OD 농도를 샘플의 농도로 나눔으로써 계산하였다.

[0329] ELISA 포맷 둘다로부터 수득된 상대적 FcRn 결합 친화도를 표 6에 열거한다. 2가지 상이한 ELISA 포맷으로부터의 데이터는 필적할 만하다. 상이한 페르투주마브 물질에서의 글리칸 분포가 동일하지 않지만, 상기 물질의 FcRn 결합 친화도는 필적할 만하며, 이는 페르투주마브에서의 글리칸 이질성이 그의 FcRn 결합 친화도에 명백한 영향을 갖지 않음을 지시한다.

[0330] Fc 감마 수용체 결합 분석

[0331] 페르투주마브의 인간 Fc 감마 수용체 (Fc $\gamma$ R)에의 결합을 문헌 [Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)]에 따라 변형시켜 ELISA 분석에 의해 평가하였다.

[0332] 단량체성 IgG는 고-친화도 Fc $\gamma$ RIa (CD64)에 결합할 수 있지만, 저-친화도 수용체 (Fc $\gamma$ RIIa (CD32A), Fc $\gamma$ RIIb (CD32B), 및 Fc $\gamma$ RIIIa (CD16)는 유의한 결합을 위해 다량체성 IgG를 요구한다. 따라서, 저-친화도 수용체 결합 분석을 위해, 페르투주마브의 다량체를 각각의 샘플 (200 mg/mL)을 염소 항-인간 카파 쇄 (400 mg/mL; 미국 캘리포니아주 이르빈에 소재하는 ICN 바이오메디칼(ICN Biomedical))와 혼합함으로써 분석 전에 형성하였다. 인간 Fc $\gamma$ R는 Gly/His6/GST (글리신/6 히스티딘/글루타티온-s-트랜스퍼라제)를 갖는 수용체 알파 쇄의 세포외 도메인의 재조합 융합 단백질로서 발현된다. 항-GST-코팅된 소 혈청 알부민 (BSA)-차단된 분석 플레이트를 사용하여 Fc $\gamma$ R을 포획하였다. 수용체 (100  $\mu$ L, 0.25 mg/mL)를 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 페르투주마브 샘플의 일련 희석액 (100  $\mu$ L)을 Fc $\gamma$ RIa에 대한 단량체로서 및 저-친화도 Fc $\gamma$ R에 대한 다량체로서 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 페르투주마브를, 양고추냉이 퍼옥시다제-컨쥬게이션된 염소 항-인간 F(ab')<sub>2</sub> (미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브에 소재하는 잭슨 이뮤노리서치 래버리토리즈)를 첨가하고 기질로서 TMB를 사용함으로써 검출하였다. 페르투주마브의 Fc $\gamma$ R에의 결합에 대한 EC<sub>50</sub> 값을 4-파라미터 모델을 사용한 비선형 회귀 분석 (미국 펜실베이니아주 리딩에 소재하는 시너지 소프트웨어 (Synergy Software)의 칼레이다그래프(KaleidaGraph))에 의해 측정하였다. 리툭산(RITUXAN)(등록상표) (Lot C2B81298-2)을 대조군 항체로서 사용하였다.

[0333] 페르투주마브의 Fc $\gamma$ R에의 결합에 대한 EC<sub>50</sub> 값을 표 7에 요약한다. 결과는 참조 물질, Lot S9802A 및 400 L 스케일 공정 전개 물질이 Fc $\gamma$ R에 대한 필적할 만한 결합 친화도를 가짐을 나타낸다. 상기 결과는 페르투주마브에서의 글리칸 이질성이 그의 Fc $\gamma$ R-결합 친화도에 유의한 영향을 갖지 않음을 암시한다.

[0334] [표 2a]

페르투주마브의 N-말단 서열 분석  
참조 물질 (각 사이클에서 관찰된 잔기의 nmol)

잔기	사이클											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.02	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07	0.09	0.09	0.10	0.11
ARG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06
ASN	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.06	0.07
ASP	<u>0.48</u>	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.07	0.07	0.08	0.09	0.10
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	<u>0.82</u>	0.13	0.04	<u>0.46</u>	0.13	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09
GLU	0.49	0.05	0.13	0.03	0.03	0.51	0.12	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08
GLY	0.01	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.30	0.35	0.36	0.13	0.09
HIS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
ILE	0.00	<u>0.48</u>	0.06	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
LEU	0.00	0.03	0.04	0.43	0.11	0.08	0.09	0.11	0.12	0.13	<u>0.62</u>	0.26
LYS	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.06	0.07	0.08	0.08	0.09	0.00	0.12
MET	0.00	0.00	0.00	<u>0.53</u>	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
PHE	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	<u>0.32</u>	0.13	0.09	0.09	0.10
SER	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.07	<u>0.56</u>	0.16	<u>0.30</u>	<u>0.33</u>	0.18	<u>0.28</u>
THR	0.00	0.01	0.00	0.04	<u>0.33</u>	0.12	0.07	0.07	0.08	0.09	0.10	0.10
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
TYR	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11	0.13
VAL	0.01	0.51	0.08	0.10	<u>0.53</u>	0.15	0.11	0.12	0.14	0.15	0.16	0.51
경쇄	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
중쇄	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

[0335]

[0336] 주: 각각의 사이클에서 관찰된 페닐티오히단토인 아미노산 잔기의 나노몰이 주어진다. 중쇄로부터의 잔기는 굵은 글씨로 주어지며, 경쇄로부터의 잔기는 밑줄친다. 각각의 경쇄 및 중쇄 1.0 nmol과 동등한 단백질 대략 0.5 nmol이 적하되었다. 시스테인 (CYS)은 서열 분석에서 관찰되지 않는다.

[0337] [표 2b]

페르투주마브의 N-말단 서열 분석  
Lot S9802A (각 사이클에서 관찰된 잔기의 nmol)

잔기	사이클											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.06	0.08	0.09	0.11	0.12	0.14	0.14
ARG	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
ASP	<u>0.61</u>	0.12	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07	0.09	0.09	0.10	0.11	0.13
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	<u>1.11</u>	0.22	0.06	<u>0.55</u>	0.19	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12
GLU	0.61	0.09	0.15	0.05	0.04	0.61	0.19	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11
GLY	0.01	0.01	0.04	0.04	0.06	0.06	0.07	<u>0.37</u>	0.44	0.46	0.19	0.13
HIS	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
ILE	0.00	<u>0.56</u>	0.10	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06
LEU	0.00	0.04	0.05	0.51	0.17	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	<u>0.76</u>	0.37
LYS	0.00	0.00	0.04	0.00	0.06	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.00	0.16
MET	0.00	0.00	0.01	<u>0.61</u>	0.12	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09	0.10
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.06	<u>0.37</u>	0.18	0.12	0.12	0.13
SER	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	<u>0.63</u>	0.24	<u>0.36</u>	<u>0.41</u>	0.24	<u>0.35</u>
THR	0.00	0.01	0.00	0.05	<u>0.39</u>	0.17	0.10	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
TYR	0.16	0.07	0.05	0.08	0.07	0.08	0.10	0.10	0.12	0.13	0.14	0.16
VAL	0.02	0.58	0.13	0.12	<u>0.62</u>	0.22	0.15	0.16	0.18	0.20	0.21	0.62
경쇄	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
중쇄	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

[0338]

[0339] 주: 각각의 사이클에서 관찰된 페닐티오히단토인 아미노산 잔기의 나노몰이 주어진다. 중쇄로부터의 잔기는 굵은 글씨로 주어지며, 경쇄로부터의 잔기는 밑줄친다. 각각의 경쇄 및 중쇄 1.0 nmol과 동등한 단백질 대략 0.5 nmol이 적하되었다. 시스테인 (CYS)은 서열 분석에서 관찰되지 않는다.

[0340] [표 2c]

페르투주마브의 N-말단 서열 분석  
400 L 스케일 구동 1 (각 사이클에서 관찰된 잔기의 nmol)

잔기	사이클											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.06	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.14
ARG	0.03	0.05	0.07	0.09	0.17	0.15	0.20	0.23	0.24	0.29	0.30	0.33
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09
ASP	<u>0.82</u>	0.08	0.05	0.11	0.08	0.09	0.11	0.15	0.14	0.16	0.18	0.19
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	<u>1.17</u>	0.11	0.05	<u>0.62</u>	0.12	0.09	0.14	0.12	0.11	0.12
GLU	0.68	0.05	0.19	0.04	0.04	<u>0.62</u>	0.15	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12
GLY	0.01	0.01	0.05	0.04	0.08	0.07	0.07	0.37	0.42	0.44	0.16	0.13
HIS	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03
ILE	0.00	<u>0.55</u>	0.03	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06
LEU	0.00	0.04	0.05	0.51	0.15	0.12	0.13	0.15	0.16	0.18	0.79	0.31
LYS	0.00	0.00	0.04	0.05	0.08	0.09	0.10	0.12	0.14	0.15	0.17	0.19
MET	0.00	0.00	0.01	<u>0.65</u>	0.04	0.02	<u>0.05</u>	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.07	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11
PRO	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	<u>0.41</u>	0.14	0.11	0.13	0.14
SER	0.01	0.02	<u>0.07</u>	0.06	0.08	0.10	0.76	0.21	<u>0.43</u>	<u>0.48</u>	0.23	<u>0.42</u>
THR	0.00	0.01	0.00	0.06	<u>0.57</u>	0.18	0.12	<u>0.16</u>	0.16	0.17	0.18	0.19
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
TYR	0.00	0.02	0.04	0.06	0.07	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.15	0.17
VAL	<u>0.04</u>	<u>0.56</u>	0.10	0.13	<u>0.62</u>	0.19	0.15	0.17	0.19	0.21	0.22	0.62
경쇄	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
중쇄	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL
VHS-경쇄	VAL	HIS	SER	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER

[0341]

[0342] 주: 각각의 사이클에서 관찰된 페닐티오히단토인 아미노산 잔기의 나노몰이 주어진다. 중쇄로부터의 잔기는 굵은 글씨로 주어지며, 경쇄로부터의 잔기는 밀줄친다. 추가의 VHS-경쇄 서열로부터의 잔기는 이탤릭체로 나타난다. 각각의 경쇄 및 중쇄 1.0 nmol과 동등한 단백질 대략 0.5 nmol이 적하되었다. 시스테인 (CYS)은 서열 분석에서 관찰되지 않는다.

[0343] [표 3a]

천연 페르투주마브의 양이온 교환 크로마토그래피 분석 (피크 면적%)

샘플	이온-교환 변이 피크					
	A	B	C	D	E	F
참조 물질	10	73	10	3	3	0.4
S9802A	20	68	5	2	4	0.2
400 L 스케일 구동 1	16	65	5	2	10	0.9
400 L 스케일 구동 2	15	67	5	2	9	0.6
400 L 스케일 구동 3	15	67	6	2	10	0.6
400 L 스케일 구동 5	15	67	5	2	9	0.5
400 L 스케일 구동 6	13	63	9	3	9	0.6

[0344]

[0345] 주: 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 점종물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않음.

[0346] [표 3b]

CPB-소화된 페르투주마브의 양이온 교환 크로마토그래피 분석 (피크 면적%)

샘플	이온-교환 변이 피크					
	A	B	C	D	E	F
참조 물질	11	78	4	ND	4	ND
S9802A	20	71	3	ND	4	ND
400 L 스케일 구동 1	17	66	3	ND	10	ND
400 L 스케일 구동 2	15	71	3	ND	9	ND
400 L 스케일 구동 3	15	71	3	ND	10	ND
400 L 스케일 구동 5	17	70	3	ND	9	ND
400 L 스케일 구동 6	16	71	3	ND	9	ND

[0347]

[0348] 주: 분획 A 내지 F는 도 9b에 정의되어 있다. 모든 값은 2개의 유의한 값으로 반올림한다. 임의의 열에서 총 수는 반올림 때문에 100%로 첨가되지 않을 수 있다.

[0349] 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 점종물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않음.

[0350] ND = 검출되지 않거나 적분할 수 없음.

[0351] [표 4]

세포-기재 항중식 분석에 의한 페르투주마브의 비활성

물질	비활성(%)	%CV
참조 물질	100 <sup>a</sup>	—
S9802A	98 <sup>b</sup>	10
400 L 스케일 구동 1	96 <sup>c</sup>	18
400 L 스케일 구동 2	90 <sup>c</sup>	11
400 L 스케일 구동 3	96 <sup>c</sup>	17
400 L 스케일 구동 5	96 <sup>c</sup>	3
400 L 스케일 구동 6	95 <sup>c</sup>	3

[0352]

[0353] 주: 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 점종물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않음.

[0354] <sup>a</sup> 정의에 의해, 참조 물질의 비활성은 100%이다.

[0355] <sup>b</sup> Lot S9802A에 대해 보고된 값.

[0356] <sup>c</sup> 값은 3개 분석의 평균을 나타낸다.

[0357] [표 5]

CE에 의해 측정된 페르투주마브에서의 올리고당류 구조의 분포

샘플	%G0-F	%G-1	%Man5	%G0	%Man6 + %G1-1	%G1 <sup>a</sup>	%G2
참조 물질	1	4	1	71	2	19	2
S9802A	1	4	1	62	2	27	3
400 L 스케일 구동 1	2	6	1	73	3	15	2
400 L 스케일 구동 2	1	6	1	77	2	13	1
400 L 스케일 구동 3	2	6	1	74	4	14	1
400 L 스케일 구동 5	1	5	1	71	2	18	1
400 L 스케일 구동 6	1	5	1	71	3	18	1

[0358]

[0359] 주: 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 집중물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않음.

[0360] <sup>a</sup> 2개의 G1 이성질체의 합계

[0361] [표 6]

FcRn에 대한 페르투주마브의 상대적 결합 친화도

샘플	상대적 결합 친화도 <sup>a</sup>	
	뉴트라비딘 코팅 포맷	Her2ECD 코팅 포맷
참조 물질(표준)	1.00	1.00
S9802A	1.34	1.30
400 L 스케일 구동 1	1.04	1.22
400 L 스케일 구동 2	1.09	1.31
400 L 스케일 구동 3	1.14	1.42
400 L 스케일 구동 5	1.22	1.36
400 L 스케일 구동 6	1.06	1.29

[0362]

[0363] 주: 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 집중물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않다.

[0364] <sup>a</sup> 표준물 (즉, 참조 물질)의 역가 곡선의 중간점 (mid-OD)에서의 흡광도 및 상기 mid-OD에서의 표준물 및 샘플의 상응하는 농도를 측정하였다. 상대적 결합 친화도를, 표준물의 mid-OD를 샘플의 그것으로 나눔으로써 수득하였다.

[0365] [표 7]

페르투주마브의 Fc 감마 수용체와의 결합에 대한 EC<sub>50</sub> 값

샘플	EC <sub>50</sub> (μg/mL)									
	FcγRIIa		FcγRIIa		FcγRIIb		FcγRIIIa (F158)		FcγRIIIa (V158)	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
참조 물질	0.0081	0.0014	5.8	1.8	57	17	14.0	1.4	1.8	0.1
S9802A	0.0078	0.0020	5.4	1.9	45	17	7.8	0.3	1.1	0.1
400 L 스케일 구동 1	0.0079	0.0019	5.4	1.5	70	25	8.4	0.9	1.2	0.1
400 L 스케일 구동 2	0.0074	0.0016	5.8	1.6	54	18	10.4	0.7	1.4	0.2
400 L 스케일 구동 3	0.0075	0.0015	5.5	1.1	54	10	8.2	0.9	1.2	0.1
400 L 스케일 구동 5	0.0076	0.0011	6.1	2.7	50	12	10.9	1.5	1.4	0.2
400 L 스케일 구동 6	0.0080	0.0005	6.2	1.9	44	1	10.3	0.9	1.4	0.2

[0366]

[0367] 주: 평균 및 표준 편차 (SD)를 분석의 다중 구동 (N=4)으로부터 수득하였다.

[0368] FcγRIIIa 수용체는 2가지 형태: F158 및 V158을 갖는다.

[0369] 400 L 구동 4는 2일에서의 100 L 집중물 배양물의 오염 때문에 이용가능하지 않음.

## 수탁번호

[0370]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션

수탁번호 : HB12215

수탁일자 : 19961017

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션

수탁번호 : HB12216

수탁일자 : 19961017

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션

수탁번호 : CRL10463

수탁일자 : 19900524

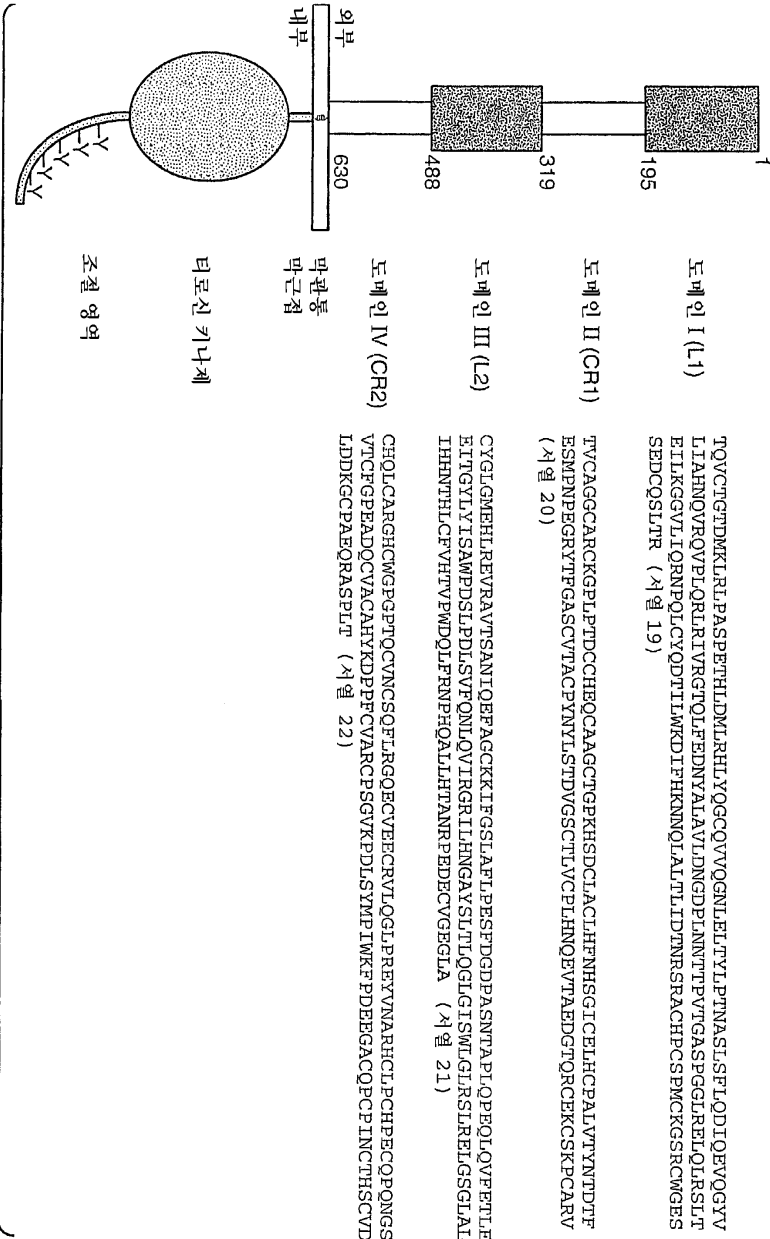
기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 콜렉션

수탁번호 : HB12697

수탁일자 : 19990408

도면

도면1



## 도면2a

가변 경쇄

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQRP	
	** * * *	*	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQKP	
		* ** *		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQIS NYLA]	WYQQKP	

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTTISSVQA		
	** * *	* *	* *	
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* ** *			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (서열 1)	
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (서열 3)	
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (서열 5)	

## 도면2b

가변 중쇄

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTQSVKISKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** * * *	* ** *	*	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** ** *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * *	*** *	*** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** ** *	* ** *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (서열 2)		
	*** **	**		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (서열 4)		
	*****			
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (서열 6)		

## 도면3a

페르투주마브 경쇄에 대한 아미노산 서열

1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQDV SIGVA	WYQQKPGKAPKLLIYS	ASRYTGVPS			
	70	80	90	100	110	120
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QYYIYPYT	FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP				
	130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTASVVCVLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS	STYLSSTLT				
	190	200	210			
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC						

도면3b

페르투주마브 중쇄에 대한 아미노산 서열

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTDTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY

70      80      90      100     110     120
|      |      |      |      |      |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSA

130     140     150     160     170     180
|      |      |      |      |      |
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

190     200     210     220     230     240
|      |      |      |      |      |
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

250     260     270     280     290     300
|      |      |      |      |      |
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
*

310     320     330     340     350     360
|      |      |      |      |      |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

370     380     390     400     410     420
|      |      |      |      |      |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

430     440     448
|      |      |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

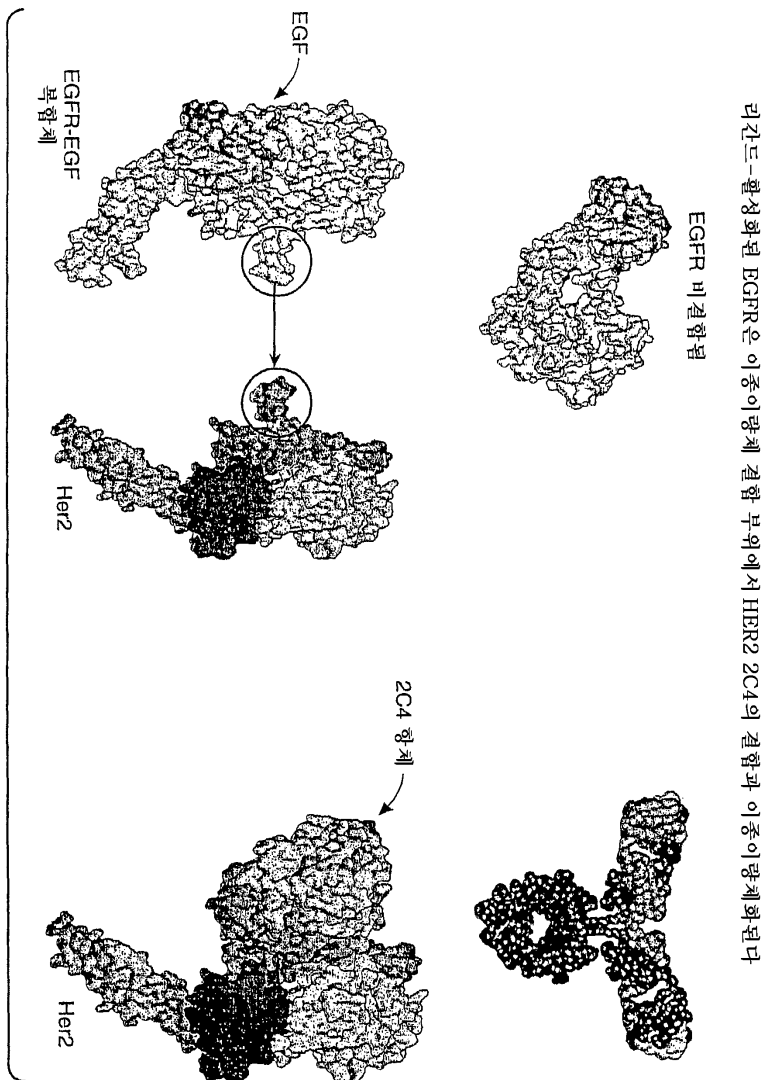
도면4a

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45  
 46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G T D F 90  
 91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135  
 136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180  
 181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225  
 226 K S F N R G E C 233 (서열 17)

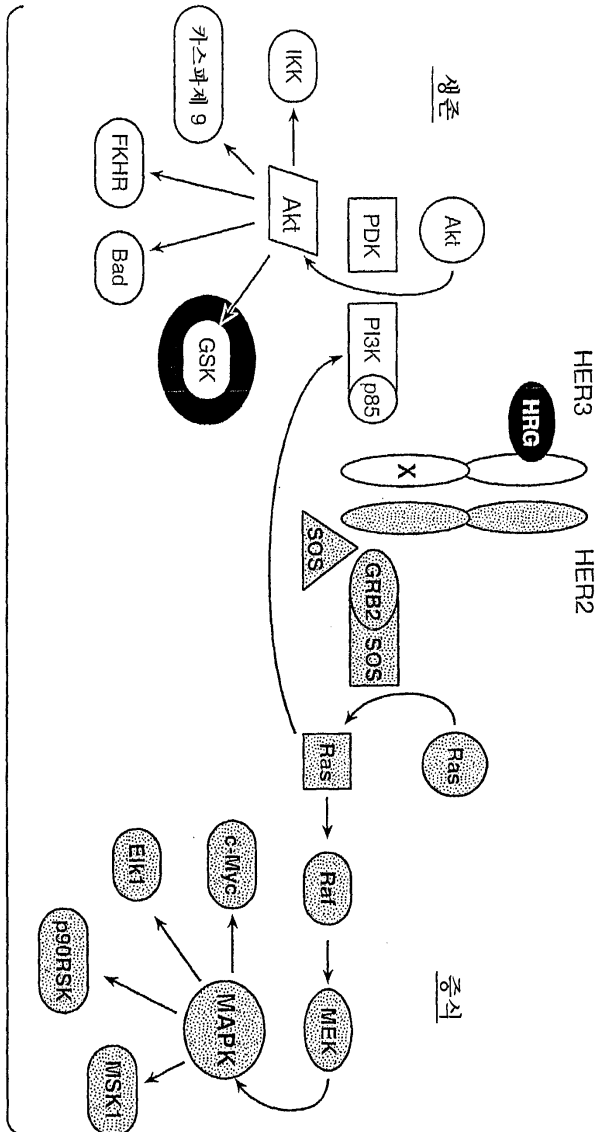
도면4b

1 15 30 45  
 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G  
 46 60 75 90  
 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S  
 91 105 120 135  
 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T  
 136 150 165 180  
 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N  
 181 195 210 225  
 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H  
 226 240 255 270  
 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D  
 271 285 300 315  
 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E  
 316 330 345 360  
 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A  
 361 375 390 405  
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N  
 406 420 435 450  
 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H  
 451 465  
 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (서열 18)

도면5



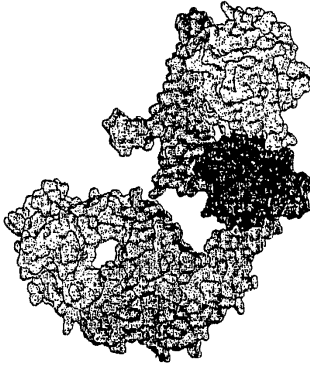
MAPK 및 Akt 경로에 대한 HER2/3의 커플링



도면6

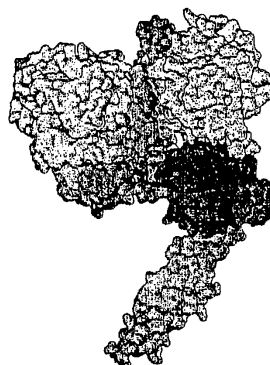
도면7

트라스투주마브  
헤르셉틴



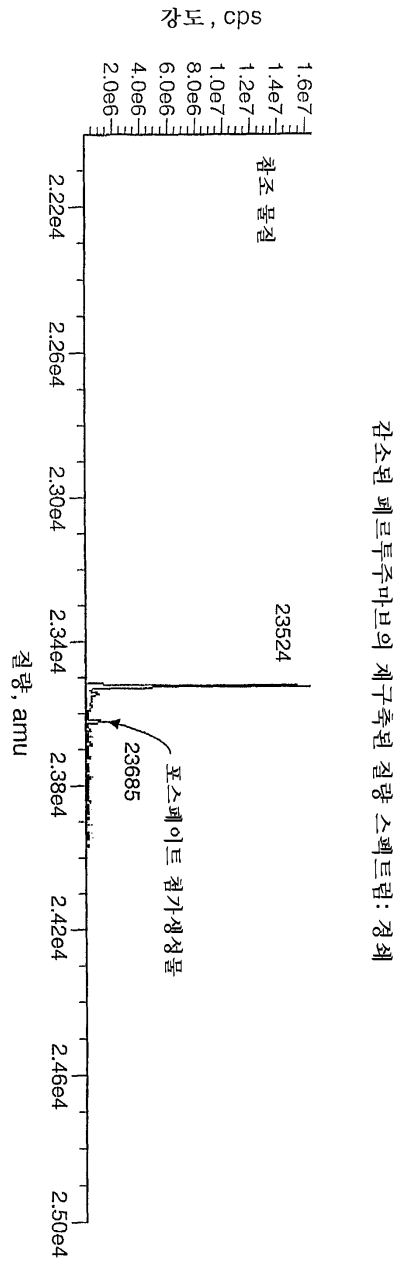
- JM 근처에서 IV에 결합
- 수용체 탈락에 대한 보호
- 수용체 하향조절을 적당히 조절
- 조수용체로서의 HER2의 역할에 대한 약간의 효과

페르투주마브  
옵넨타그

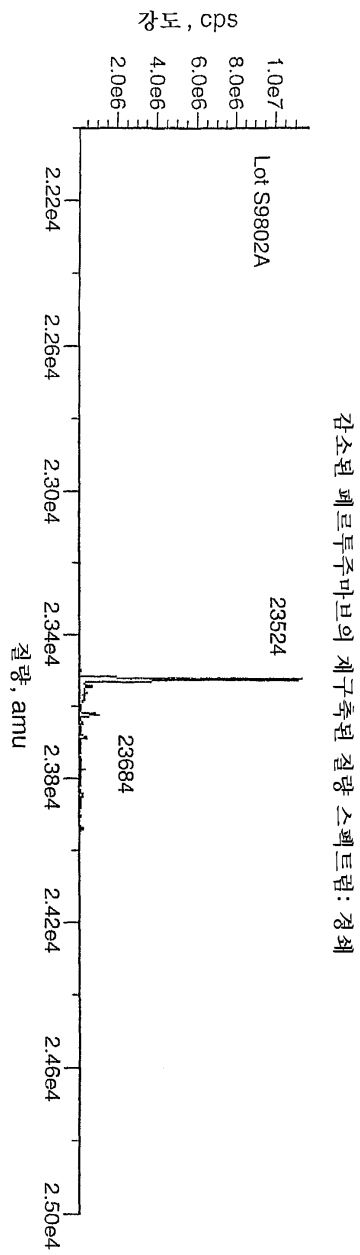


- 이량체화 계면에서 II에 결합
- 수용체 탈락을 방지하지 않음
- 수용체 하향조절을 적당히 조절
- 조수용체로서의 HER2의 역할에 대한 주요한 효과

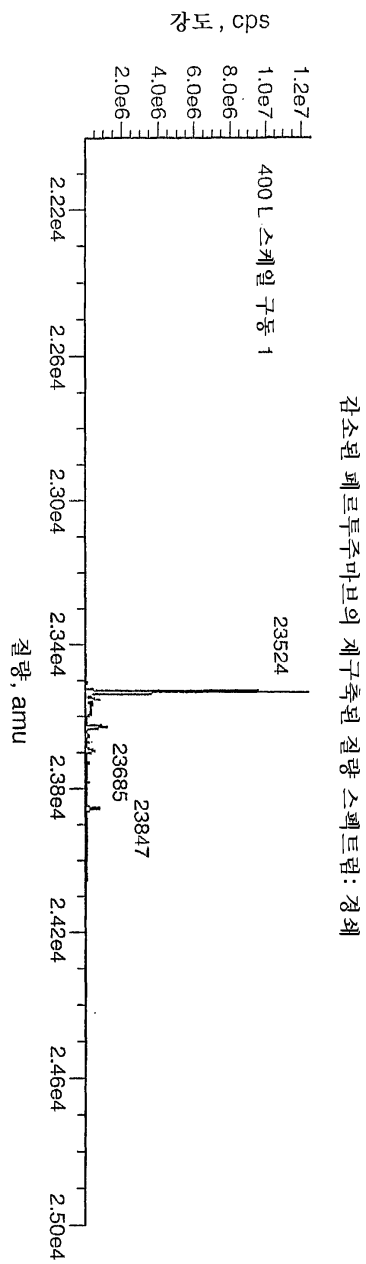
도면8aa



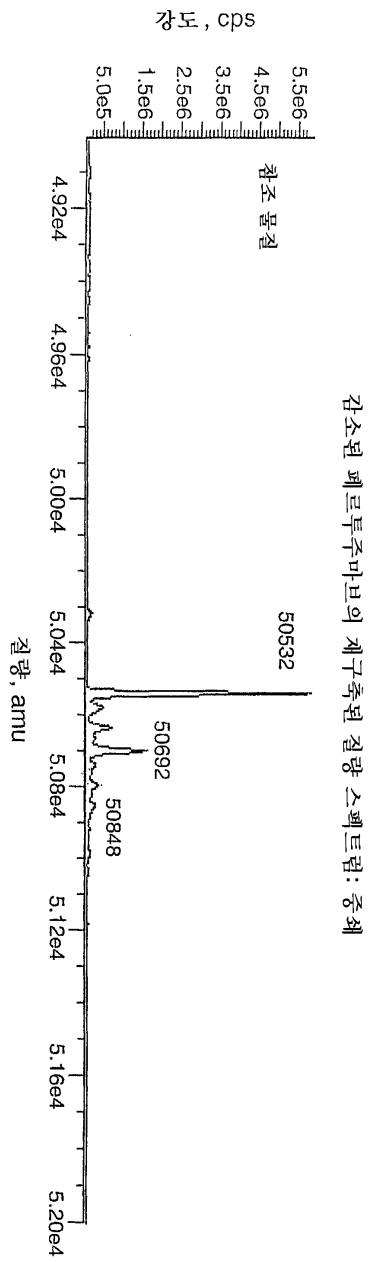
도면8ab



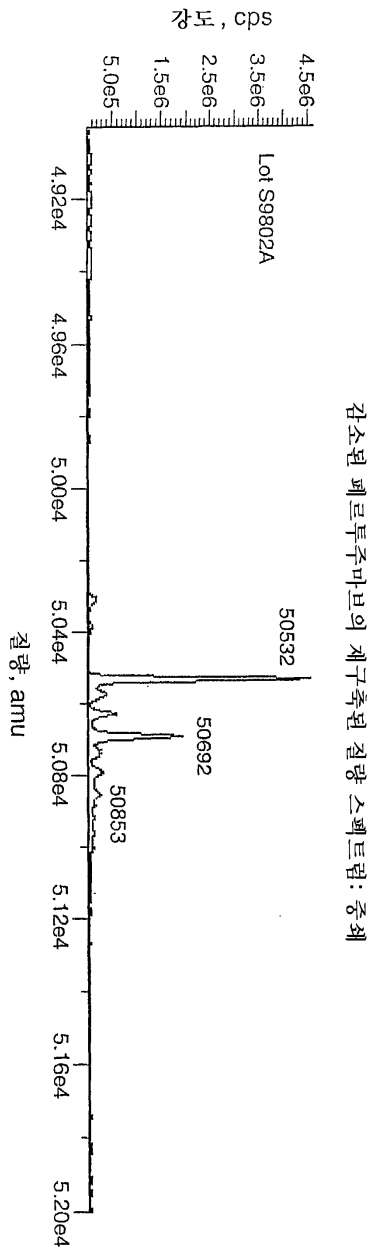
도면8ac



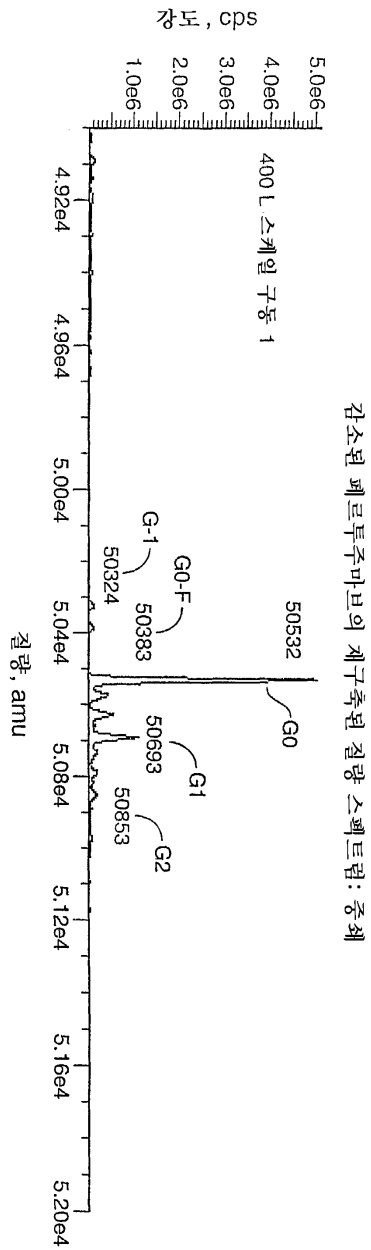
도면8ba



도면8bb

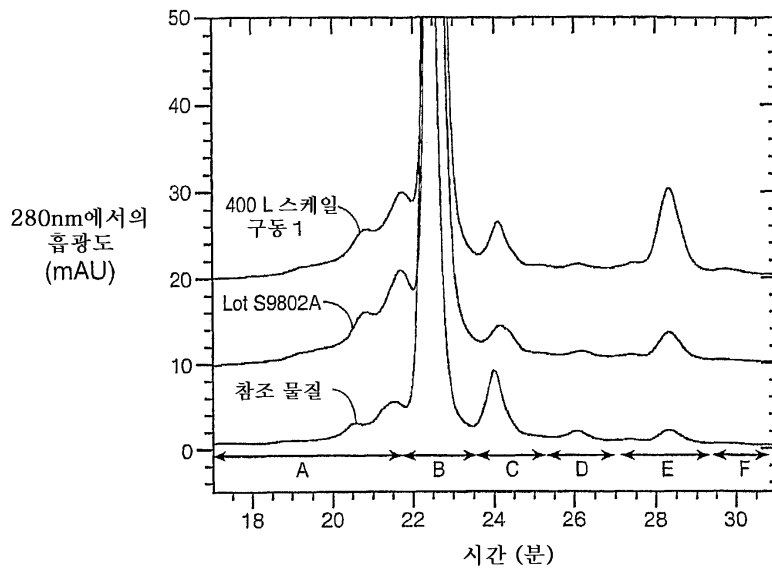


도면8bc



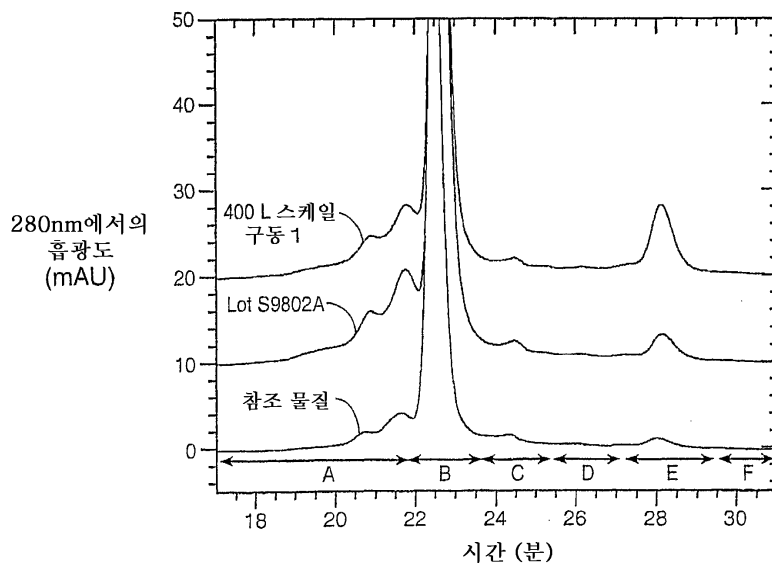
도면9a

천연 페르투주마브의 양이온 교환 크로마토그래피 분석

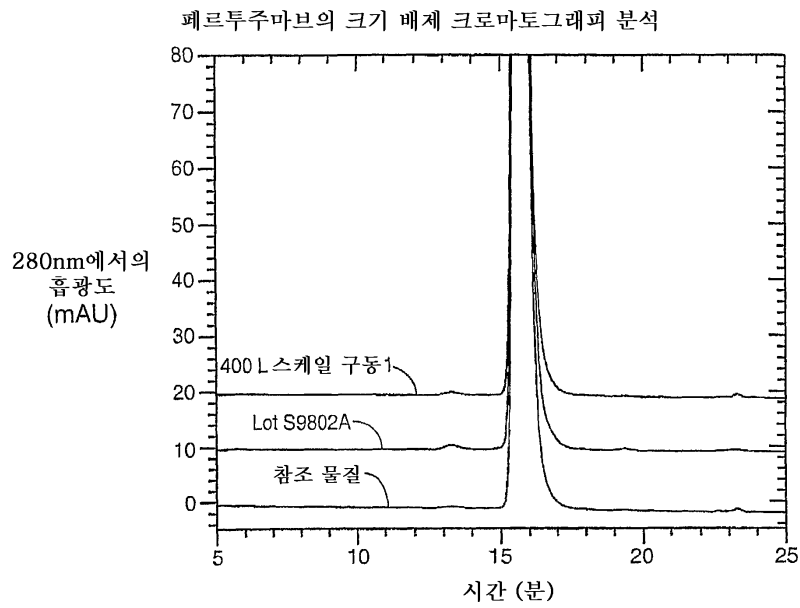


도면9b

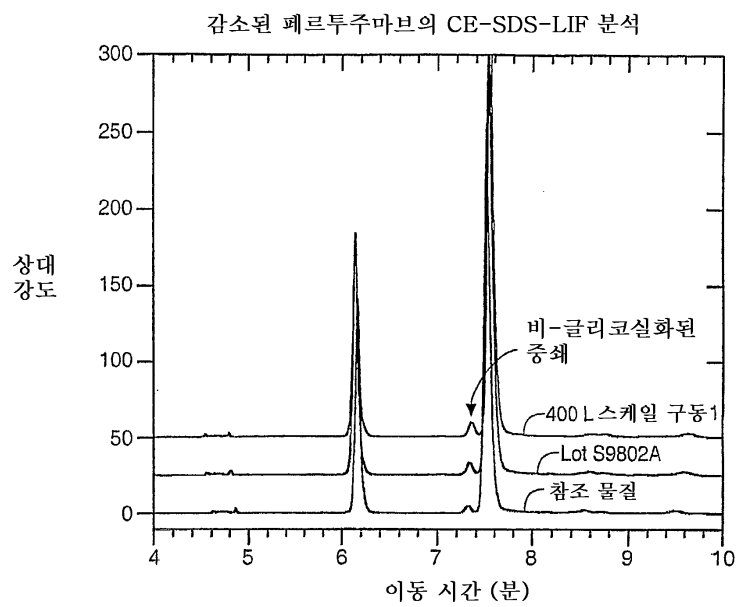
CPB-소화된 페르투주마브의 양이온 교환 크로마토그래피 분석



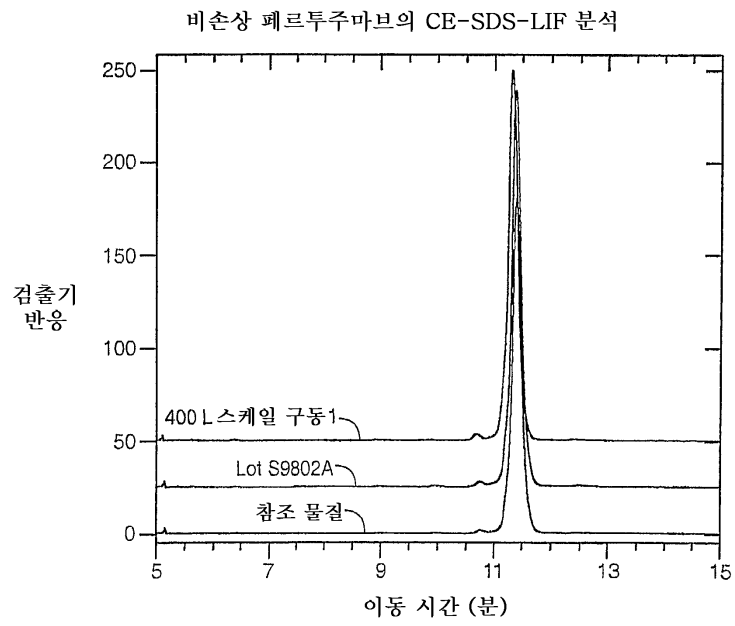
도면10



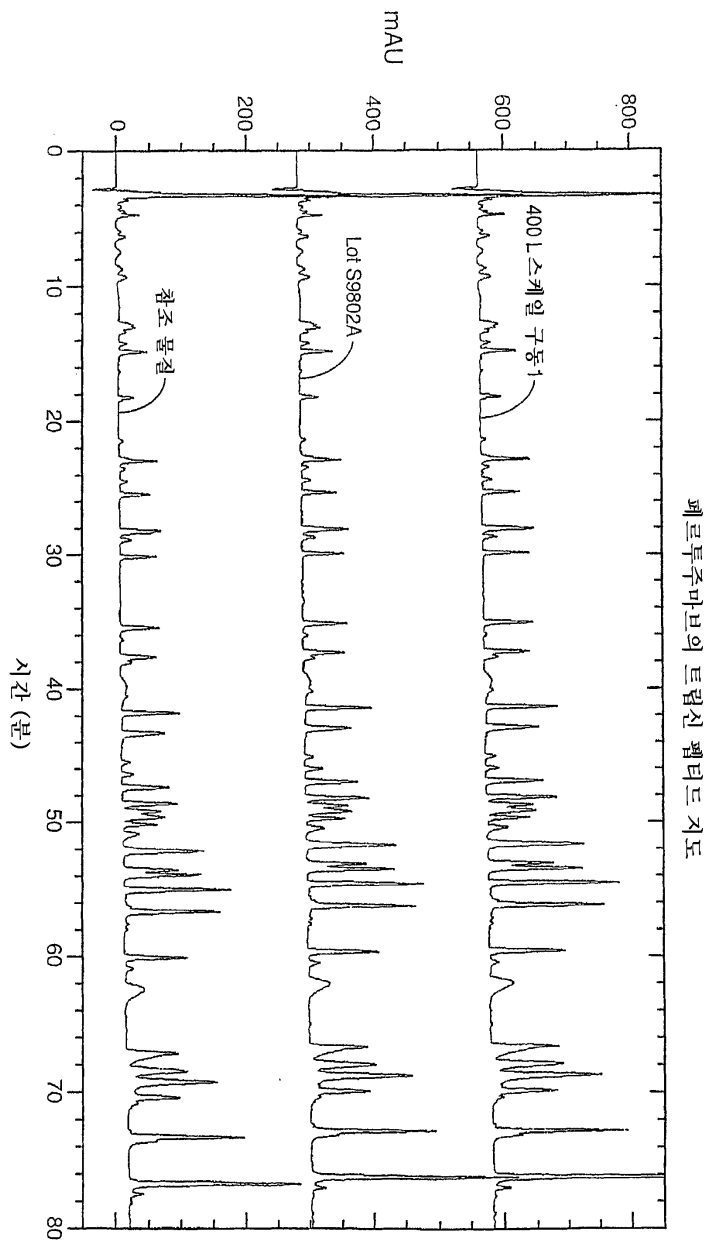
도면11a



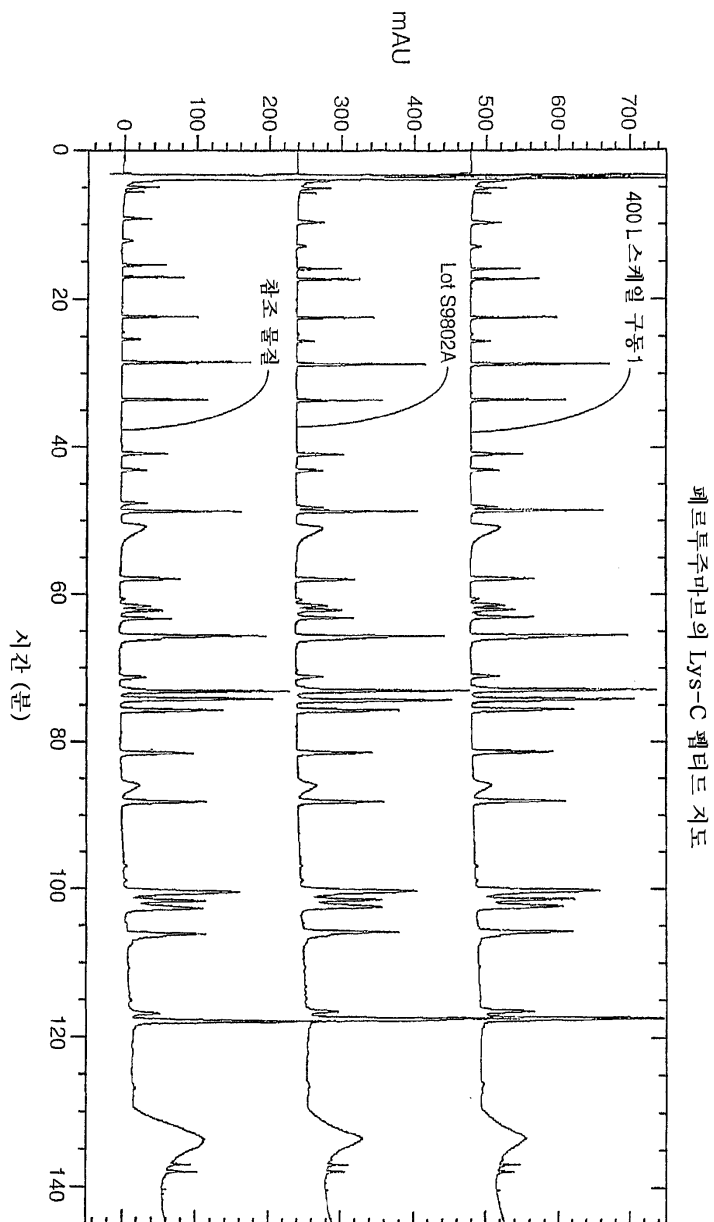
도면11b



도면12a

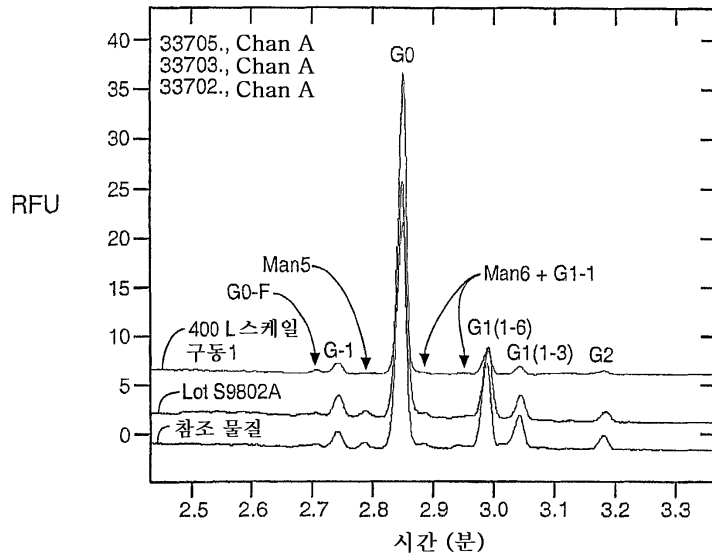


도면12b



도면13

페르투주마브로부터 방출된 N-연결된 올리고당류의 CE 분석  
오버레이 추적: 정렬됨



도면14a

IgG 항체에 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조		
<u>구조</u>	<u>약어</u>	<u>질량</u>
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \bigg\rangle \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right. \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ <div style="text-align: center;"><math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  </div>	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \bigg\rangle \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ <div style="text-align: center;"><math>\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)</math></div>	Man6	1398

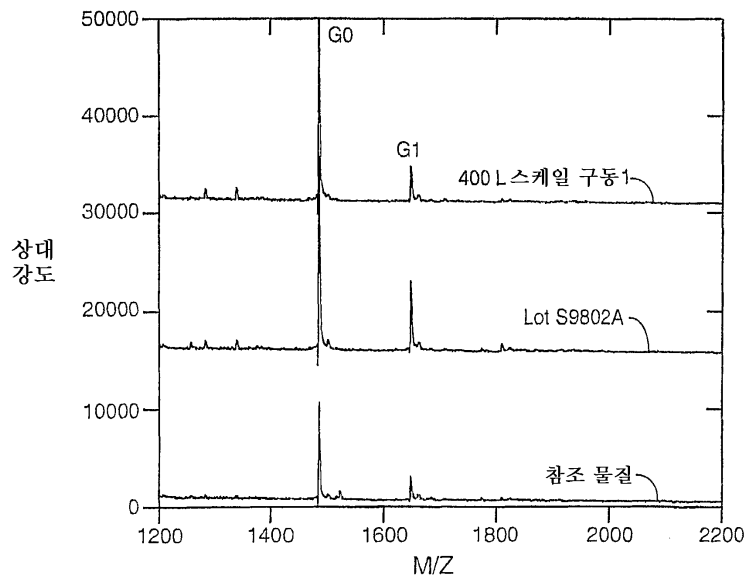
도면14b

IgG 항체에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조		
구조	약어	질량
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ <p style="text-align: center;"> <math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  <math>\downarrow</math> </p>	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ <p style="text-align: center;"> <math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  <math>\downarrow</math> </p>	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ <p style="text-align: center;"> <math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  <math>\downarrow</math> </p>	G1 (1-6)	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ <p style="text-align: center;"> <math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  <math>\downarrow</math> </p>	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ <p style="text-align: center;"> <math>\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)</math>  <math>\downarrow</math> </p>	G2	1788

상기 도면에 나타난 질량은 (M+Na)<sup>+</sup> 값에 상응함

도면15

페르투주마브로부터 방출된 방출 중성 올리고당류의  
양성 모드 MALDI-TOF 질량 스펙트럼



도면16a

경쇄

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	K	P	G	K	A	P	K	45	
46	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	90	
91	H	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C												

중쇄

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL 45  
 15  
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90  
 60  
 91 TAVYYCSRWG G DGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA P S S 135  
 105  
 136 KSTSGGTAA L GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA V L Q S S 180  
 150  
 181 GLYSLS S V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K 225  
 195  
 226 THTCPC P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S 270  
 240  
 271 HEDPEVK F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D 315  
 285  
 316 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E 360  
 330  
 361 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G 405  
 375  
 406 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G 449

도면16b

도면17a

1	V	H	S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	I	G	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	45
46	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	90		
91	C	Q	Q	Y	Y	I	Y	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	135
136	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	180	
181	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C									

(시열 23)

도면17b

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD YTM DWVRQA PGKGL  
 15  
 46 EWVADYNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVD RSKNTLYLQ MNSLR AED  
 60  
 91 TAVY YCARNLGPF SFYFDYWGQGT LVT VSSASTKG P S V F P L A P S S K  
 105  
 136 STSGTAAALGCLVKDYFP EEPVT VSWNSGALTS GVHTFP AVLQSSG  
 150  
 181 LYSLSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKT  
 195  
 226 HTCPCPAP ELLGGP S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H  
 240  
 271 EDPEVKFNWYVDGV E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W  
 285  
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M  
 330  
 361 TKNQVSLTCLVKGF Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
 375  
 406 FFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSV M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
 420  
 449

(서열 24)

서열목록

<110> GENENTECH, INC.

KAO, YUNG-HSIANG

VANDERLAAN, MARTIN

<120> HER2 ANTIBODY COMPOSITION

<130> P2105R1 PCT

<140> PCT/US2005/025084

<141> 2005-07-15

<150> US 60/590,202

<151> 2004-07-22

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp	Thr	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
				50					55					60
Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105
Ile	Lys													

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15
Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu

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

110	115
-----	-----

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val			
1	5	10	15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser			
	20	25	30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys			
	35	40	45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	80	85	90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
	95	100	105

Ile Lys

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20						25				30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
				50						55				60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser
				65						70				75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80						85				90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
				95						100				105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				110						115				

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
20 25 30  
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr  
50 55 60  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
65 70 75  
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

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

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

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<220><221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa is preferably D or S

<400> 7

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

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 8

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe  
 1 5 10 15  
 Lys Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 9

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 10

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala  
5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is preferably R or L

<220><221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is preferably Y or E

<220><221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is preferably T or S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa  
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr  
5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 13

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	
	80	85
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	
	95	100
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro	
	110	115
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
	125	130
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	

	140	145	150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu		
	155	160	165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr		
	170	175	180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu		
	185	190	195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn		

200

205

210

Arg Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
395	400	405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 410 415 420  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 425 430 435  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440 445

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser  
 20 25 30  
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105  
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 110 115 120  
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 125 130 135  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
155 160 165  
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr  
170 175 180  
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu  
185 190 195  
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn  
200 205 210  
Arg Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr  
20 25 30  
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr  
50 55 60  
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser  
65 70 75  
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr  
95 100 105  
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
110 115 120

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	350	355	360
	365	370	375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	380	385	390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
	395	400	405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	410	415	420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
	425	430	435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	440	445	

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 17

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr			
1	5	10	15
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
	20	25	30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser			
	35	40	45
Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
	50	55	60
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr			
	65	70	75
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	80	85	90

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

95 100 105

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

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

155 160 165

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

170 175 180

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

185 190 195

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

200 205 210

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

215 220 225

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

230

<210> 18

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35	40	45
Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro		
50	55	60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly		
65	70	75
Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser		
80	85	90
Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu		
95	100	105
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly		
110	115	120
Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
125	130	135
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
140	145	150
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
155	160	165
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
170	175	180
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
185	190	195
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
200	205	210
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
215	220	225
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
230	235	240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
260	265	270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly

<210> 19

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15
Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly
				20					25					30
Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr
				35					40					45
Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly
				50					55					60
Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln
				65					70					75
Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
				80					85					90
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr
				95					100					105
Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu
				110					115					120
Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg
				125					130					135
Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile
				140					145					150
Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn
				155					160					165
Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser
				170					175					180
Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg
				185					190					195

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly

35 40 45

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg Val

<210> 21

<211> 169

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val  
1 5 10 15

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

Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala

35 40 45

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

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro

65	70	75
Asp Ser Leu Pro	Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile	
80	85	90
Arg Gly Arg Ile	Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln	
95	100	105
Gly Leu Gly Ile	Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu	
110	115	120
Gly Ser Gly Leu	Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe	
125	130	135
Val His Thr Val	Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln	
140	145	150
Ala Leu Leu His	Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly	
155	160	165
Glu Gly Leu Ala		

<210> 22

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys His Gln Leu Cys	Ala Arg Gly His Cys	Trp Gly Pro Gly Pro
1	5	10
15		
Thr Gln Cys Val	Asn Cys Ser Gln Phe	Leu Arg Gly Gln Glu Cys
20	25	30
Val Glu Glu Cys	Arg Val Leu Gln Gly	Leu Pro Arg Glu Tyr Val
35	40	45
Asn Ala Arg His	Cys Leu Pro Cys His	Pro Glu Cys Gln Pro Gln
50	55	60
Asn Gly Ser Val	Thr Cys Phe Gly Pro	Glu Ala Asp Gln Cys Val
65	70	75
Ala Cys Ala His	Tyr Lys Asp Pro Pro	Phe Cys Val Ala Arg Cys
80	85	90

Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys  
95 100 105

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys  
110 115 120

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

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr  
140

<210> 23

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr

95 100 105

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

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

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

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

Sequence is synthesized.

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr  
20 25 30  
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr  
50 55 60  
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser  
65 70 75  
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr  
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 110 115 120  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 125 130 135  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 140 145 150  
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 155 160 165  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 170 175 180  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 185 190 195  
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 200 205 210  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 215 220 225  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 305 310 315  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 320 325 330  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

335	340	345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
350	355	360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
365	370	375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
380	385	390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
395	400	405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
410	415	420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
425	430	435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
440	445	