



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0101909  
(43) 공개일자 2016년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/32 (2013.01)  
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7015132
- (22) 출원일자(국제) 2013년11월07일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/002733
- (87) 국제공개번호 WO 2015/067986  
국제공개일자 2015년05월14일
- (71) 출원인  
인제팜 (앵스더뮈 나쎄오날 드 라 쟁떼 에 드 라  
호쎄르슈 메디칼)  
프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 푼비악  
101  
유니베르시테 드 몽펠리에  
프랑스 34090 몽펠리에 뤼 어거스트 브로우스네트  
163  
앵스더뮈 레지오날 뤼 쟁세르 드 몽펠리에 - 발  
도렐르  
프랑스, 에프-34298 몽펠리에 세텍스 5, 뤼 데 자  
쁘티게르 - 빠끄 유로메드신즈, 208
- (72) 발명자  
샤르드, 띠에리  
프랑스공화국, 에프-34298 몽펠리에 세텍스 5, 뤼  
데 아쁘티게르 208, 인제팜 위896-위니베르시테  
드 몽펠리에 1-이쎄엠 발 도렐르, 앵스더뮈 드 르  
세르슈 영 쟁쎄호로지 드 몽펠리에  
가보랏, 나테쥬  
이스라엘, 76100, 레호보트, 바이즈만 인스티튜트  
오브 사이언스, 맥스 앤드 릴리안 캔디오티 빌딩,  
디파트먼트 오브 바이올로지컬 레귤레이션  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인오리진

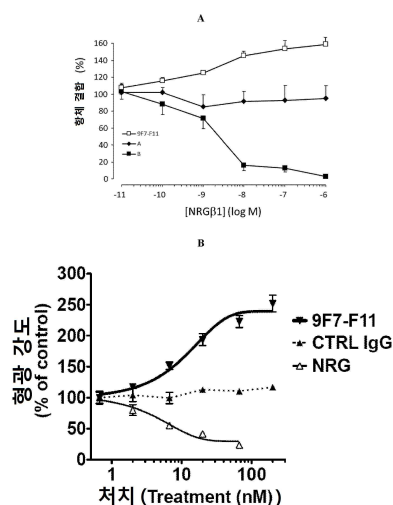
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 뉴레귤린 알로스테릭 항-HER3 항체

(57) 요약

본 발명은 뉴레귤린 (NRG)-비 경합적 알로스테릭 항-인간-HER3 항체 및 이들의 진단 및 치료 방법의 용도와 관련된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/30 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

**라르부렛, 크리스텔**

프랑스공화국, 34298, 몽펠리에 세텍스 5, 빠르끄  
유로메드쉴느, 뤼 데 아쁘티케르 208, 캄뽀스 발  
도렐르, 인제름 위896

**멜르그랭, 앙드레**

프랑스공화국, 34298, 몽펠리에 세텍스 5, 빠르끄  
유로메드쉴느, 뤼 데 아쁘티케르 208, 캄뽀스 발  
도렐르, 인제름 위896

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

중쇄를 포함하는 뉴레글린 비 경합적 알로스테릭 항-인간-HER3 항체로, 상기에서 가변 도메인이:

- SEQ ID NO: 2로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성(identity)을 갖는 H-CDR1,
- SEQ ID NO: 3으로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 H-CDR2,
- SEQ ID NO: 4로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 H-CDR3,
- SEQ ID NO: 6으로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR1,
- SEQ ID NO: 7로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR2,
- SEQ ID NO: 8로 제시된 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR3를 포함하고, 및
- 가변 도메인이 H-CDR1을 위한 SEQ ID NO: 2, H-CDR2를 위한 SEQ ID NO: 3 및 H-CDR3를 위한 SEQ ID NO: 4를 포함하는 중쇄 및 가변 도메인이 L-CDR1를 위한 SEQ ID NO: 6, L-CDR2를 위한 SEQ ID NO: 7 및 L-CDR3를 위한 SEQ ID NO: 8을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 친화성(affinity)으로 HER3과 특이적으로 결합하는, 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

H-CDR1 영역 내 SEQ ID NO:2, H-CDR2 영역 내 SEQ ID NO:3 및 H-CDR3 영역 내 SEQ ID NO:4 을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 L-CDR1 영역 내 SEQ ID NO:6, L-CDR2 영역 내 SEQ ID NO:7 및 L-CDR3 영역 내 SEQ ID NO:8을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체의 중쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 1로 제시된 아미노산 서열을 포함하고 및/또는 경쇄 가변 영역이 SEQ ID NO: 5로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

키메라 항체, 바람직하게는 키메라 마우스/인간 항체인 항체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

휴머니이드 항체인, 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체의 단편.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

VL 또는 VH 사슬을 포함하는 단편.

#### 청구항 8

제6항에 있어서,

Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> 및 디아바디로 구성된 군에서 선택되는 단편.

#### 청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 단편을 암호화하는 핵산 서열.

#### 청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 모노클로날 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 핵산 서열.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:10인 핵산 서열.

#### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 13

제10항 또는 제11항에 따른 핵산 또는 제12항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체의 단편을 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 15

의약으로 사용되는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체의 단편.

#### 청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체의 단편을 개체 내에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 암을 치료하는 방법.

#### 청구항 17

암의 진단에 사용되는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체의 단편.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 뉴레글린 (NRG)-비 경합적 알로스테릭 항-인간-HER3 항체 및 이의 진단 및 치료 방법에 대한 용도와 관련된다.

### 배경 기술

[0002] 수용체 티로신 키나제(receptor tyrosine kinase: RTK)의 인간 상피 성장 인자 수용체 ErbB/HER 패밀리는 4개의 구성원을 포함한다: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (c-Neu, HER2), HER3 (HER3) 및 HER4 (HER4). HER 수용체는 1 내지 4로 표시되고, 막관통 도메인 및 시그널링 경로(signalling pathway)에 연결하기 위한 키나제 도메인을 포함하는 세포 내 C-말단부가 이어지는 4개의 구조적 도메인으로 구성된 세포외 글리코실화 도메인을 포함한다.

HER3을 제외하고, 세포 내 영역은 티로신 키나제 활성을 포함한다. 시그널링은 리간드-유도 수용체 다이머화, 및 그 후에 세포질 시그널링 경로의 활성화를 유도하는 인산화를 통해 조정된다. HER2는 자연적으로 "활성" 형태에 있기 때문에 특이적인 리간드를 갖지 않는다. 다른 HER 수용체는 다이머화를 방지하기 위한 방법으로 폴딩된 분자를 갖는 불활성 모노머로서 존재한다. 도메인 1 및 3에 결합하는 리간드는 궁극적으로 수용체의 도메인 2 내의 다이머화 루프를 노출시키는 주요 형태 변화를 유도한다. 이와 같은 다이머화 루프의 노출은 수용체 다이머화를 가능하게 한다.

[0003] 1990년에 처음 개시된 HER3 수용체는 고유 키나제 활성이 결여된 유일한 HER 패밀리의 구성원 수용체이고, 다운스트림(downstream) 시그널링은 헤테로 다이머화를 통해 달성된다. 따라서, 모노머로서의 HER3 수용체는 "비-자가(non-self)"라고 불리고, 호모다이머(homodimer)를 형성할 수 없다. 리간드 헤레굴린(heregulin: HRG)의 HER3 수용체에 대한 결합은 HER3와 다른 HER 패밀리 수용체(바람직하게는, HER2)의 헤테로다이머화를 촉발한다. 헤테로다이머 내에서, HER3 키나제 도메인은 이의 HER 패밀리 파트너의 알로스테릭(allosteric) 활성체로 작용한다.

[0004] HER3은 유방암 및 난소암을 포함하여 다양한 암의 종양 형성에 연관된다 (Lee-Hoeflich ST, Cancer Res. 2008; McIntyre E, Breast Cancer Res Treat. 2010; Tanner B, J Clin Oncol. 2006). HER3 발현은 종양 진행 및 악성 흑색종(melanoma) 및 전이(metastasis) 환자의 감소된 생존률에 관계되고, 난소암의 생존률 저하에 연관된다. 중요하게도, 유방암에서, 헤르셉틴(Herceptin) 치료에 적합하지 않은 낮은 HER2 발현을 갖는 종양은 종종 장기치료 후에 헤르셉틴에 저항성을 갖는 HER3(Smith et al. Br. J. Cancer 2004) 및 HER2+++ 종양을 강하게 발현하도록 "프로그래밍"되고, HER3(Narayan, Cancer Res. 2009)을 강하게 발현하도록 "재프로그래밍"된다. 또한, 세특시맵(Cetuximab) 저항은 EGFR 내재화(internalization)/열화(degradation)의 조절장애(dysregulation)와 함께, 폐암(Wheeler, Oncogene 2008), 및 직장암종(colorectal carcinoma)(Lu Cancer Res 2007)에서의 HER3 과발현과 연관되었다. 최근에, HER3 과발현은 직장 암종에서의 더 낮은 무전이(metastasis-free) 생존률과 유의적으로 연관지어졌다(Ho-Pun-Cheung, Int J Cancer 2010). 따라서, HER3 과발현 및 PI3K/AKT 경로의 활성화를 통한 보상 시그널링(compensatory signalling)은 HER-표적 요법에 의한 치료(항체 및 TKI)(Wheeler 2008, Lu 2007, Narayan, 2009, Sergina, 2007) 뿐만 아니라 IGF-1R-표적 요법(Desbois-Mouthon, Clin Cancer Res 2009) 및 화학치료제(Kruser, Exp Cell Res 2010)에 의한 치료에 대한 저항을 개발하는 중에 시사되었다.

[0005] 상기와 같은 발견 모두는, HER3-표적 제제, 특히 항체가 암에서 HER3 시그널링의 역할을 더욱 자세하게 이해하고, 특히 효과적인 면역요법으로 사용될 수 있도록 도울 수 있다.

[0006] 과학 문헌이 치료적 종양학에서 HER3를 표적화하는 것의 이점을 강조하고 있지만, 현재 치료적 항-HER3 항체는 상용화되지 않았다. 두 종류의 인간 항체가 Merrimack Pharmaceuticals/Sanofi Aventis(MM-121 항체; PCT WO2008/100624) 및 U3 PharmaAG/Daiichi Sankyo/Amgen(U3-1287 또는 AMG-888; PCT WO2007/077028)에 의해 현재 개발되고 있다. MM-121 항체는 NSCLC에 대해 임상시험 단계 I, 및 ER+ PR+ HER2- 유방암에 대해 임상시험 단계 I/II 중에 있다. U3-1287 항체는 에를로티니브(Erlotinib)에 관련된 NSCLC에 대해 단계 I에 있다. EGFR/HER3 2중 특이적 항체 DL11f(Genentech; PCT WO2010/108127)가 여전히 연구개발 중에 있다. HER2/HER3 2중 특이적 항체 MM-111(Merrimack Pharmaceuticals; PCT WO2005/117973, WO2006/091209)이 HER2-증폭(amplified) 유방암에 대해 단독으로 또는 트라스투주마브 또는 라파티니브와 조합하여 임상시험 단계 I/II 중에 있다.

[0007] 상기의 항체들은 모두 HER3 수용체의 헤레굴린-결합 부위를 차단하여, 리간드-중독된 종양에 대한 상기 항체 요법을 감소시킨다. HER3의 헤레굴린-결합 부위를 표적으로 하지 않는 항체에 의해 HER3을 표적화하는 것은 저항성 HER2-증폭 유방암의 표적요법 또는 화학요법에 대한 저항을 우회하거나, 현재 상기와 같은 치료에 적합하지 않은 저HER2 유방암에 대한 표적요법의 적용 분야를 넓히거나, HER3을 발현하고 아직 사용가능한 표적요법이 없는 3중-음성 유방암을 치료할 수 있게 해야 한다.

### 발명의 내용

[0008] 본 발명은 뉴레굴린 (NRG)-비 결합적 알로스테릭 항-인간-HER3 항체와 관련되고, 이의 진단 및 치료 방법에 대한 용도와 관련된다.

[0009] 본 발명자는 리간드 뉴레굴린의 존재하에서 HER3-양성에 독특한 특이성(unique specificity)을 가지는, 9F7-F11이라고 명명되는 류린 항-인간-HER3 항체를 특징 화하였다. 특히, 본 발명자들은 뉴레굴린이 존재하는 경우 9F7-F11/HER3 친화성이 억제되지 않을 뿐만 아니라 (9F7-F11 항체가 뉴레굴린-비 결합적일 뿐 아니라), 더욱이

뉴레귤린이 HER3-양성 세포의 환경 내 존재하는 경우 9F7-F11/HER3 친화성이 알로스테릭하게 증가됨 (9F7-F11이 알로스테릭 항-HER3 항체임)을 확인하였다. NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11은 MAPK, AKT 및 P53 경로를 억제하고, G1 상 내 세포 사이클을 블로킹하며, 세포 증식을 억제하며, 및 종양 세포의 세포 사멸(apoptosis)을 회복시킨다. 상기 독특한(unique) 항체 9F7-F11은 NRG-중독된 췌장암 및 HER2-중독 또는 3중 음성 유방암의 종양 성장을 감소시키고, 트라스투주마브/페르투주마브 HER2 조합 또는 HER2 항체 단독과 비교하여 HER2-특이적인 항체 페르투주마브(pertuzumab)와의 조합에 더 효과적이다.

[0010] 치료적 항체 9F7-F11는 리간드-경합적 항체 또는 더 제한된 HER3 활성화 메커니즘을 표적화하는 알로스테릭 효과가 없는 리간드-비 경합적 항체와 비교하여 더 광범위한 스펙트럼의 종양 내에서 임상적 활용성을 가진다. 이의 알로스테릭 효과에 의해, NRG-비 경합적 항체 9F7-F11은 뉴레귤린이 종양 (오토크린(autocrine) 분비) 혹은 마이크로환경 (파라크린(paracrine) 분비)에 의해 분비되는 경우, 다른 항체와 비교하여 리간드-의존적 종양에 더 효과적일 것이다. 이의 알로스테릭 효과로 인해, 뉴레귤린의 상향-조절에 의해 매개 되는 저항성이 발생하는 경우 (예를 들어 직장 암종 내 세톡시맙 저항성), 항체 9F7-F11은 더 효과적일 것이다. 수용체가 리간드에 의해 활성화 후 헤테로다이머화되는 경우, 알로스테릭 효과로 인해 9F7-F11 결합은 더 개선될 수 있다. 조합하면, NRG-비 경합적 알로스테릭 항-인간 HER3 항체 9F7-F11는 현존하는 치료적 항체가 임상적으로 효력이 없는 경우의 상태를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0011] 따라서, 본 발명의 항체는 종래 기술에서 언급되는 항-HER3 항체와 비교하여 하기의 장점을 제공한다:

- [0012] - 알로스테릭 항체임,
- [0013] - 뉴레귤린-비 경합적임,
- [0014] - 작용의 더 넓은 스펙트럼 (리간드-독립적 및 리간드-의존적 암 모두)을 제공함,
- [0015] - 오토크린 혹은 파라크린 리간드-의존적 종양에 더 효과적임 (이의 알로스테릭 효과에 의함),
- [0016] - HER3 리간드의 상향-조절(up-regulation)에 의해 매개 되는 저항성이 발생하는 경우 (예를 들어 항체 또는 TKI, 화학적, 항-호르몬에 대한 저항성), 이는 더 효과적임,
- [0017] - 현존하는 치료적 항체가 임상적으로 효력이 없는 상태, 예를 들어 3중-음성 유방암, 췌장암, 다른 nich (예를 들어 신장 세포 암종)의 치료에 사용될 수 있음.

[0018] **정의:**

[0019] 용어 "뉴레귤린"은 당해 분야에서 일반적인 의미가 있고, "헤레귤린"이라는 용어와 상호치환가능 하도록 사용된다. 헤레귤린 패밀리에는 알파, 베타 및 감마 헤레귤린 (Holmes et al., Science, 256: 1205-1210 (1992); U.S. Patent No. 5,641,869; and Schaefer et al. Oncogene 15: 1385-1394 (1997)); neu 분화 인자 (neu differentiation factor: NDFs), 아교 성장 인자 (Glial growth factors: GGFs); 아세틸콜린 수동체 유도 활성 (Acetylcholine receptor inducing activity: ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유래 인자(Sensory and motor neuron derived factor: SMDF)가 포함된다. 리뷰를 위해 [Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996) and Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995); Falls and D. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." Experimental Cell Research 284(1): 14-30]이 참조된다.

[0020] "HER3"이라는 용어는 [Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4905-4909 (1990)]에 개시된 바와 같은 인간 HER3 수용체를 지칭한다(또한, Kani et al., Biochemistry 44: 15842-857 (2005), Cho and Leahy, Science 297: 1330- 1333 (2002) 참조). HER3은 "HER3"으로도 알려졌다.

[0021] "항-인간-HER3 항체"라는 용어는 인간 HER3에 대한 항체를 지칭한다.

[0022] 본 발명에 따르면, "항체" 또는 "면역글로불린(immunoglobulin)"은 같은 의미를 가지고, 본 발명에서는 동등하게 사용될 것이다. 여기서 사용되는 "항체"라는 용어는 면역글로불린 분자, 및 면역글로불린의 면역학적으로 활성인 부분, 즉 면역특이적으로 항원을 결합시키는 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 지칭한다. 이와 같이, 항체라는 용어는 항체 분자 전체뿐만 아니라, 항체 단편, 및 항체 및 항체 단편의 변이체 (유도체 포함)를 포함한다. 자연 항체에서, 2개의 중쇄는 이황화결합에 의해 서로 연결되고, 각 중쇄는 이황화결합에 의해 경쇄에 연결된다. 경쇄에는 람다(λ) 및 카파(k) 두 종류가 있다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 다섯 종류(또는 이소타입(isotype))의 주요 중쇄가 있다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각각의 사슬은 구별되는 서열 도메인을 포함

한다. 경쇄는 가변 도메인(VL) 및 보존 도메인(CL)의 2개의 도메인을 포함한다. 중쇄는 하나의 가변 도메인(VH) 및 세 개의 보존 도메인(CH1, CH2 및 CH3, 총괄적으로 CH로 지칭)의 4개의 도메인을 포함한다. 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 모두의 가변영역은 항원에 대한 특이성 및 결합 인식(binding recognition)을 결정한다. 경쇄의 보존 영역 도메인(CL) 및 중쇄의 보존 영역 도메인(CH)은 항체 사슬 연관성(antibody chain association), 분비(secretion), 경태반 이동성(trans-placental mobility), 보체 결합(complement binding), 및 Fc 수용체(FcR)에 대한 결합과 같은 중요한 생물학적 특징을 부여한다. Fv 단편은 면역글로불린의 Fab 단편의 N-말단부이고, 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄의 가변부로 구성된다. 항체의 특이성은 항체 결합 부위와 항원성 결정인자 사이의 구조적인 상보성에 있다. 항체 결합 부위는 주로 초가변 영역 또는 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)의 잔기로 구성된다. 가끔, 비초가변 영역 또는 프레임워크 영역(framework region: FR)의 잔기가 전체적인 도메인 구조 및 그에 따라 결합 부위에 영향을 준다. 상보성 결정 영역 또는 CDR은 본래의 면역글로불린 결합 부위의 자연 Fv 영역의 결합 친화성 및 특이성을 함께 정의하는 아미노산 서열이다. 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄는 각각 L-CDR1, L-CDR2 및 L-CDR3과 H-CDR1, H-CDR2 및 H-CDR3으로 지정된 3개의 CDR을 각각 갖는다. 따라서, 항원-결합 부위는 중쇄 및 경쇄 V 영역 각각으로부터의 CDR 세트를 포함하여 6개의 CDR을 포함한다. 프레임워크 영역(FR)은 CDR 사이에 위치하는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0023] "키메라 항체"라는 용어는 9F7-F11 항체로부터 유래된 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인, 및 인간 항체의 CH 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0024] 본 발명에 따르면, "휴머니이드 항체"라는 용어는 인간 항체로부터 유래된 가변 영역 프레임워크(framework) 및 보존 영역을 갖지만 9F7-F11 항체의 CDR을 보유하는 항체를 지칭한다.

[0025] "Fab"라는 용어는 IgG를 프로테아제, 파파인에 의해 처리하여 획득된 단편 중에, 약 50,000의 분자량 및 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 지칭하고, 여기서 H 사슬의 N-말단 쪽의 절반 정도 및 L 사슬 전부는 이황화 결합에 의해 함께 결합된다.

[0026] "F(ab')<sub>2</sub>"라는 용어는 IgG를 프로테아제 펩신에 의해 처리하여 획득된 단편 중에, 약 100,000의 분자량 및 항원 결합 활성을 갖고, 힌지(hinge) 영역의 이황화결합에 의해 결합된 Fab 보다 약간 더 큰 항체 단편을 지칭한다.

[0027] "Fab'"이라는 용어는 F(ab')<sub>2</sub>의 힌지 영역의 이황화결합을 절단함으로써 획득되는, 약 50,000의 분자량 및 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 지칭한다.

[0028] 단쇄 Fv("scFv") 폴리펩티드는 펩티드-인코딩 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 인코딩 유전자를 포함하는 유전자 융합으로부터 주로 발현되는, 공유결합된 VH::VL 헤테로다имер이다. "dsFv"는 이황화결합에 의해 안정화된 VH::VL 헤테로다имер이다. 2가 및 다가 항체 단편은 1가 scFv의 연계에 의해 동시에 형성될 수 있고, 또는 2가 sc(Fv)<sub>2</sub>와 같은 펩티드 링커에 의해 1가 scFv를 커플링(커플링)함으로써 생성될 수 있다.

[0029] "디아바디"라는 용어는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭하고, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 내의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다(VH-VL). 동일한 사슬 상의 두 개의 도메인 사이의 짝짓기(pairing)를 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 다른 사슬의 상보적 도메인과 짝을 지어 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강요된다.

[0030] 본 발명에 따른 항체 또는 뉴클레오타이드 서열에서, "정제된" 및 "분리된"은 동일한 종류의 다른 생물학적 거대 분자의 실질적인 부재하에 상기 지칭된 분자가 존재하는 것을 의미한다. 여기서 사용되는 "정제된"이라는 용어는 바람직하게는 75 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 85 중량% 이상, 더욱더 바람직하게는 95 중량% 이상, 가장 바람직하게는 98 중량% 이상의 동일한 종류의 생물학적 거대분자가 존재하는 것을 의미한다. 특정 폴리펩티드를 인코딩하는 "분리된" 핵산 분자는 상기 폴리펩티드를 인코딩하지 않는 다른 핵산 분자가 실질적으로 없는 핵산 분자를 지칭한다. 그러나 상기 분자는 조성의 기본적인 특성에 악영향을 주지 않는 추가적인 베이스 또는 성분을 포함할 수 있다.

# [0031] 본 발명의 항체

[0032] 본 발명은 분리된 뉴레굴린 (NRG)-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 특히, 본 발명자들은 뮤린 항-HER3 항체 (9F7-F11)를 생산 하이브리도마를 제공한다. 본 발명자들은 상기 mAb 9F7-F11의 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 클로닝 및 특징화 하였고, 및 따라서 표 1에 개시된 것과 같이 상기 항체의 상보성 결정 영역 (CDRs) 도메인은 결정하였다:

[0033] [표 1]

mAb 9F7-F11 도메인	서열
VH	EVKLVESGG.GLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYTMSSWVRQTPEKR LEWVAYISDGGGVITYYPDTIKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSE DTAMYYCARDRYGLFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:1)
H CDR1	GFTFSST (SEQ ID NO:2)
H CDR2	ISDGGGV(TSEQ ID NO:3)
H CDR3	ARDRYGLFAY(SEQ ID NO:4)
VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGIAVAWYQQKPGQSP KLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNMQSEDLADYFCQ QYSNYPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:5)
L CDR1	QNVGIA(SEQ ID NO:6)
L CDR2	SAS (SEQ ID NO:7)
L CDR3	QQYSNYPYT (SEQ ID NO:8)

[0034]

[0035] **표 1: mAb 9F7-F11의 VH, VL 및 CDRs의 아미노산 서열**

[0036] 따라서, 본 발명은 가변도메인이 H-CDR1를 위한 SEQ ID NO:2, H-CDR2를 위한 SEQ ID NO:3 및 H-CDR3을 위한 SEQ ID NO:4로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄를 포함하는 HER3에 대해 특이성을 가지는 모노클로날 항체와 관련된다.

[0037] 본 발명은 또한 가변 도메인이 L-CDR1을 위한 SEQ ID NO:6, L-CDR2를 위한 SEQ ID NO:7 및 L-CDR3을 위한 SEQ ID NO:8로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함하는, HER3에 대해 특이성을 가지는 모노클로날 항체와 관련된다.

[0038] 본 발명의 모노클로날 항체는 가변 도메인이 H-CDR1를 위한 SEQ ID NO:2, H-CDR2를 위한 SEQ ID NO:3 및 H-CDR3를 위한 SEQ ID NO:4로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄 및 가변 도메인이 L-CDR1을 위한 SEQ ID NO:6, L-CDR2를 위한 SEQ ID NO:7 및 L-CDR3을 위한 SEQ ID NO:8로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0039] 특히, 본 발명은 H-CDR1 영역 내 SEQ ID NO:2, H-CDR2 영역 내 SEQ ID NO:3 및 H-CDR3 영역 내 SEQ ID NO:4를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 L-CDR1 영역 내 SEQ ID NO:6, L-CDR2 영역 내 SEQ ID NO:7 및 L-CDR3 영역 내 SEQ ID NO:8을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-HER3 모노클로날 항체를 제공한다.

[0040] 특정의 구현예에서, 상기 항체의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 가지고 및/또는 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 가진다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 모노클로날 항체는 키메라 항체, 바람직하게는 키메라 마우스/인간 항체이다. 특히, 상기 마우스/인간 키메라 항체는 전술된 9F7-F11 항체의 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0042] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 모노클로날 항체는 휴머니이드 항체이다. 특히, 상기 휴머니이드 항체에서, 가변 도메인은 인간 수용체 프레임워크 영역 및 선택적으로 존재하는 인간 보존 도메인 및 전술된 바와 같이 마우스 CDR과 같은 비-인간 도너 CDR을 포함한다.

[0043] 본 발명은 상기 항체의 HER3에 대응되는 항-HER3 단편을 제공하고, 여기에는 비제한적으로 Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> 및 디아바디가 포함된다.

[0044] 또 다른 관점에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO:7 및 SEQ ID NO:8로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가지는 폴리펩티드와 관련된다.

[0045] **본 발명의 항체를 제조하는 방법**

[0046] 본 발명의 항-인간-HER3 항체는 해당 분야에 알려진 임의의 기법, 예를 들어 화학적, 생물학적, 유전학적 또는

효소학적 기법 각각 또는 이들의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0047] 원하는 서열의 아미노산 서열을 알면, 통상의 기술자는 폴리펩티드의 제조를 위한 표준 기법에 의해 용이하게 상기 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 이들은 잘 알려진 고체상 방법을 사용하여, 바람직하게는 상용되는 펩티드 합성 장치(예를 들어, Applied Biosystems(Foster City, California)의 제품)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 합성될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 항체는 해당 분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 항체를 인코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터에 혼입시키고, 원하는 항체를 발현시킬 적합한 진핵 또는 원핵 숙주에 상기 벡터를 도입시킴으로써, DNA 발현 산물로서 항체가 획득될 수 있고, 그 후 상기 항체로부터 잘 알려진 기법을 사용하여 이들을 분리시킬 수 있다.

[0048] 이에 따라, 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0049] 특정 구현예에서, 본 발명은 9F7-F11 하이브리도마로부터 획득할 수 있는 항체의 VH 도메인, 또는 9F7-F11 하이브리도마로부터 획득할 수 있는 항체의 VL 도메인을 인코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0050] 특정의 구현예에서, 본 발명은 서열 SEQ ID NO:9를 포함하는 핵산 서열과 관련된다.

[0051] 특정의 구현예에서 본 발명은 서열 SEQ ID NO:10을 포함하는 핵산 서열과 관련된다.

[0052] [표 2]

<b>VH 도메인:</b>	GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TAC ATT AGT GAT GGT GGT GGT GTC ACC TAC TAT CCA GAC ACT ATA AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA GAT AGG TAC GGT CTC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA (SEQ ID NO:9)
<b>VL 도메인:</b>	GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ATT GCT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TCG GCA TCC AAT CGG TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AAT ATG CAG TCT GAA GAC CTG GCA GAT TAT TTC TGC CAG CAA TAT AGC AAC TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG AAA TAA AAC (SEQ ID NO:10)

[0053] [표 2] 본 발명의 mAb 9F7-F11의 VH 및 VL 도메인의 핵산

[0055] 통상적으로, 상기 핵산은 플라스미드, 코스미드, 에피솜, 인공 염색체, 파지 또는 바이러스 벡터와 같은 임의의 적합한 벡터에 포함될 수 있는, DNA 또는 RNA 분자이다.

- [0056] "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"라는 용어는 이에 의해 DNA 또는 RNA 서열(예를 들어, 외래 유전자)이 숙주 세포에 도입되어, 숙주를 형질전환하고, 도입된 서열의 발현(예를 들어, 전사 및 번역)을 촉진할 수 있는 운반체를 의미한다.
- [0057] 따라서, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0058] 상기 벡터는 대상체에 투여시 상기 항체의 발현을 일으키거나 지시하기 위해, 프로모터(promoter), 인핸서(enhancer), 터미네이터(terminator) 등과 같은 조절요소(regulatory element)를 포함할 수 있다. 동물 세포를 위한 발현 벡터에 사용되는 프로모터 및 인핸서의 예는 SV40의 초기 프로모터 및 인핸서(Mizukami T. et al. 1987), 몰로니(Moloney) 마우스 백혈병 바이러스의 LTR 프로모터 및 인핸서(Kuwana Y et al. 1987), 면역글로불린 H 사슬의 프로모터(Mason JO et al. 1985) 및 인핸서(Gillies SD et al. 1983) 등을 포함한다.
- [0059] 인간 항체 C 영역을 인코딩하는 유전자가 삽입되고 발현될 수 있다면, 동물 세포를 위한 어떠한 발현 벡터도 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예는 pAGE107(Miyaji H et al. 1990), pAGE103(Mizukami T et al. 1987), pHSG274(Brady G et al. 1984), pKCR(O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) 등을 포함한다. 플라스미드의 다른 예는 복제 개시점을 포함하는 복제 플라스미드, 예를 들어 pUC, pcDNA, pBR 등과 같은 통합(integrative) 플라스미드를 포함한다. 바이러스 벡터의 다른 예는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스(herpes) 바이러스 및 AAV 벡터를 포함한다. 상기 재조합 바이러스는 해당 분야에 알려진 기법에 의해, 예를 들어 패키징 세포(packaging cell)의 형질감염, 또는 보조 플라스미드 또는 바이러스에 의한 일과성(transient) 형질감염에 의해 제조될 수 있다. 바이러스 패키징 세포의 통상적인 예는 PA317 세포, PsiCRIP 세포, GPenv+ 세포, 293 세포 등을 포함한다. 상기 복제-결함(replication-defective) 재조합 바이러스를 제조하기 위한 자세한 프로토콜은 예를 들어 WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 및 WO 94/19478에서 발견될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터에 의해 형질감염(transfect), 감염 또는 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0061] "형질전환(transformation)"이라는 용어는 숙주 세포가 도입된 유전자 또는 서열을 발현하여 원하는 성분, 통상적으로 도입된 유전자 또는 서열에 의해 코딩된 단백질 또는 효소를 발현할 수 있도록, "외래(즉, 외부 또는 세포 외)" 유전자, DNA 또는 RNA 서열을 숙주 세포에 도입하는 것을 의미한다. 도입된 DNA 또는 RNA를 수용하고 발현하는 숙주 세포는 "형질전환"되었다.
- [0062] 본 발명의 핵산은 적합한 발현 시스템에서 본 발명의 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. "발현 시스템"이라는 용어는 적합한 조건, 예를 들어 외래 DNA에 의해 코딩되고, 벡터에 의해 운반되고, 숙주 세포에 도입된 단백질의 발현을 위한 적합한 조건하의 숙주 세포 및 호환되는 벡터를 의미한다.
- [0063] 일반적인 발현 시스템은 E. coli 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 바큘로바이러스(Baculovirus) 벡터, 및 포유류 숙주 세포 및 벡터를 포함한다. 숙주 세포의 다른 예는 원핵세포(예를 들어, 박테리아) 및 진핵세포(예를 들어, 효모 세포, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 예는 E.coli, 클루이베로미세스(Kluyveromyces) 또는 사카로미세스(Saccharomyces) 효모, 포유류 세포주(예를 들어, 베로(Vero) 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등), 및 일차 또는 구축된 포유류 세포 배양체(예를 들어, 림프아세포, 섬유아세포, 배아세포, 상피세포, 신경세포, 지방세포 등으로부터 제조된 것)를 포함한다. 또한, 상기 예는 마우스 SP2/0-Ag14 세포(ATCC CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC CRL1580), 디히드로폴레이트 환원효소 유전자(하기에서는 "DHFR 유전자"로 지칭됨)가 결합된 CHO 세포(Urlaub G et al; 1980), 래트 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포(ATCC CRL1662, 하기에서는 "YB2/0 세포"로 지칭됨) 등을 포함한다.
- [0064] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 항체를 발현하는 재조합 숙주 세포를 제조하는 방법으로서, (i) 전술된 재조합 핵산 또는 벡터를 컴피턴트(competent) 숙주 세포로 시험관 내(in vitro) 또는 생체 외(ex vivo) 도입하는 단계; (ii) 획득된 재조합 숙주 세포를 시험관내 또는 생체의 배양하는 단계; 및 (iii) 선택적으로, 상기 항체를 발현 및/또는 분리하는 세포를 선별하는 단계를 포함하는 제조방법에 관한 것이다. 상기 재조합 숙주 세포는 본 발명의 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0065] 다른 특정 구현예에서, 본 방법은:
- [0066] (i) 하이브리도마 9F7-F11를 16D3-C1 항체의 발현을 일으키기에 적합한 조건하에서 배양하는 단계; 및

- [0067] (ii) 발현된 항체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0068] 본 발명의 항체는 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트(hydroxylapatite) 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리될 수 있다.
- [0069] 특정 구현예에서, 본 발명의 인간 키메라 항체는 전술된 VL 및 VH 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 획득하고, 인간 항체 CH 및 인간 항체 CL을 인코딩하는 유전자를 갖는 동물 세포를 위한 발현 벡터에 상기 서열을 삽입함으로써 인간 키메라 항체 발현 벡터를 구축하고, 상기 발현 벡터를 동물 세포에 도입함으로써 코딩 서열을 발현함으로써 제조될 수 있다.
- [0070] 인간 키메라 항체의 CH 도메인으로서, 인간 면역글로불린에 속하는 임의의 영역도 될 수 있지만, IgG 형이 적합하고, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와 같이 IgG형에 속하는 어떠한 아형도 사용될 수 있다. 또한, 인간 키메라 항체의 CL 도메인으로서, Ig에 속하는 어떠한 영역도 될 수 있고, 카파(kappa) 중 또는 람다(lambda) 중이 사용될 수 있다.
- [0071] 키메라 항체를 제조하는 방법은 해당 분야에 잘 알려진 종래의 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기법을 포함한다 (Morrison SL. et al.(1984) 및 특허문헌 US5,202,238; 및 US5,204, 244 참조).
- [0072] 본 발명의 휴머니이드 항체는 전술한 바와 같이 CDR 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 획득하고, (i) 인간 항체의 중쇄 보존 영역과 동일한 중쇄 보존 영역; 및 (ii) 인간 항체의 경쇄 보존 영역과 동일한 경쇄 보존 영역을 인코딩하는 유전자를 갖는 동물 세포를 위한 발현 벡터에 상기 서열을 삽입함으로써 휴머니이드 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 발현 벡터를 도입함으로써 유전자를 발현함으로써 획득할 수 있다.
- [0073] 휴머니이드 항체 발현 벡터는 항체 중쇄를 인코딩하는 유전자 및 항체 경쇄를 인코딩하는 유전자가 분리된 벡터에 존재하는 형태, 또는 양 유전자가 모두 동일한 벡터에 존재하는 형태(탠덤(tandem)형)일 수 있다. 휴머니이드 항체 발현 벡터의 구축의 용이성, 동물 세포에의 도입의 용이성, 및 동물 세포에서 항체 H 및 L 사슬의 발현 수준 간의 균형 측면에서, 탠덤형이 바람직하다(Shitara K et al. 1994). 탠덤형 휴머니이드 항체 발현 벡터의 예는 pKANTEX93(WO 97/10354), pEE18 등을 포함한다.
- [0074] 종래의 DNA 및 유전자 형질감염 기법에 기반된 휴머니이드 항체를 제조하는 방법(예를 들어, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985 참조)이 해당 분야에 잘 알려져 있다. 항체는 해당 분야에 알려진 다양한 기법, 예를 들어 CDR-그래프팅(EP 239,400; PCT 공보 WO91/09967; 미국특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 비니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), 및 사슬 셔플링(chain shuffling)(U.S. Pat. No.5,565,332)을 사용하여 인간화될 수 있다. 또한, 이와 같은 항체를 제조하는 일반적인 재조합 DNA 기술이 알려져 있다 (유럽특허출원 EP 125023 및 국제특허출원 WO 96/02576 참조).
- [0075] 본 발명의 Fab는 인간 HER3과 특이적으로 반응하는 항체를 프로테아제, 파파인으로 처리함으로써 획득될 수 있다. 또한, Fab는 원핵 발현 시스템 또는 진핵 발현 시스템을 위한 벡터에 항체의 Fab를 인코딩하는 DNA를 삽입하고, 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab를 발현함으로써 제조될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 F(ab')<sub>2</sub>는 인간 HER3과 특이적으로 반응하는 항체를 프로테아제 펩신으로 처리함으로써 획득될 수 있다. 또한, F(ab')<sub>2</sub>는 하기의 Fab'을 티오에테르결합 또는 이황화결합을 통해 결합시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 Fab'은 인간 HER3과 특이적으로 반응하는 F(ab')<sub>2</sub>를 환원제, 디티오프레이톨에 의해 처리함으로써 획득될 수 있다. 또한, Fab'은 원핵생물을 위한 발현 벡터, 또는 진핵생물을 위한 발현 벡터에 항체의 Fab' 단편을 인코딩하는 DNA를 삽입하고, 벡터를 (적절하게) 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 이의 발현을 수행함으로써 제조될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 scFv는 전술한 바와 같이 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 cDNA를 획득하고, scFv를 인코딩하는 DNA를 구축하고, 원핵생물을 위한 발현 벡터 또는 진핵생물을 위한 발현 벡터에 DNA를 삽입하고, 원핵생물 또는 진핵생물에 (적절하게) 발현 벡터를 도입하여 scFv를 발현함으로써 제조될 수 있다. 휴머니이드 scFv 단편을 생성하기 위해, 도너(donor) scFv 단편으로부터 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 선택하는 단계, 및 이들을 알려진 3차원 구조의 인간 scFv 단편 프레임워크에 그래프팅하는 단계를 포함하는, CDR 그래프팅이라는 잘 알려진 기법이 사용될 수 있다(예를 들어, WO98/45322; WO 87/02671; US5,859,205; US5,585,089; US4,816,567; EP0173494 참조).

- [0079] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)(modification(s))이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 항체의 생물학적 특성을 개선 시키는 것이 바람직할 수 있다. 비인간 동물로부터 유래된 항체의 VH 및 VL의 CDR만을 인간 항체의 VH 및 VL의 FR에 단순히 그래프팅함으로써 휴머니이드 항체가 제조되는 경우에, 비인간 동물로부터 유래된 본래의 항체에 비하여 항원 결합 활성이 감소 된다는 것이 잘 알려져 있다. CDR 뿐만 아니라 FR의 비인간 항체의 VH 및 VL의 몇몇 아미노산 잔기들이 직접적으로 또는 간접적으로 항원 결합 활성과 연관된다는 점이 고려된다. 이에 따라, 상기 아미노산 잔기들의 인간 항체의 VH 및 VL의 FR로부터 유래된 다른 아미노산 잔기로의 치환이 결합 활성을 감소시킬 수 있다. 문제를 해결하기 위해, 인간 CDR로 그래프팅된 항체에서, 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열 중에 항체에 대한 결합과 직접적으로 연관되거나, 또는 CDR의 아미노산 잔기와 상호작용하거나, 또는 항체의 3차원 구조를 유지하면서 항원에 대한 결합에 직접적으로 연관된 아미노산 잔기를 식별하기 위한 노력이 있었다. 감소된 항원 결합 활성은 식별된 아미노산을 비인간 동물로부터 유래된 본래의 항체의 아미노산 잔기로 대체함으로써 증가될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 항체의 구조, 및 이들을 인코딩하는 DNA 서열에서 변형(modification) 및 변화(change)가 일어날 수 있고, 여전히 원하는 특성이 있는 항체를 인코딩하는 기능성 분자를 획득할 수 있다.
- [0081] 아미노산 서열이 변화될 때, 아미노산의 수치요법 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 생물학적 상호작용 기능을 부여하는 데에서 아미노산 수치요법 지수의 중요성은 해당 분야에 일반적으로 알려졌다. 아미노산의 상대적인 수치요법 지수가 생성되는 단백질의 2차 구조에 기여하여, 이는 결과적으로 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 단백질의 상호작용을 규정한다는 것이 인정된다. 각 아미노산에는 이들의 소수성 및 전하 특성에 기반하여 수치요법 지수가 부여되고, 이들은 하기와 같다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르트레이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0082] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 항체의 기능-보존 변이체(variant)를 포함한다.
- [0083] "기능-보존 변이체"란 폴리펩티드의 전체적인 형태 및 기능을 변화시키지 않고 단백질 또는 효소의 주어진 아미노산 잔기가 바뀐 것으로, 유사한 특성(예를 들어, 극성, 수소결합능, 산성, 염기성, 소수성, 방향성 등)을 갖는 다른 것으로의 아미노산의 대체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 보존된 것이라고 지시되는 것과 다른 아미노산은 단백질에 차이가 있을 수 있으며, 따라서 유사한 기능을 갖는 임의의 2개의 단백질 사이의 단백질 또는 아미노산 서열 유사성 퍼센트는 예를 들어 유사성이 MEGALIGN 알고리즘에 기반되는 클러스터법(Cluster Method)에 의한 것과 같은 정렬 방법에 따라 측정시 예를 들어 70% 내지 99%일 수 있다. 또한, "기능-보존 변이체"는 BLAST 또는 FASTA 알고리즘에 의해 측정시 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 동일성(identity)을 갖고, 이는 비교되는 자연형(native) 또는 모 단백질과 동일하거나 실질적으로 유사한 성질 또는 기능을 가진다.
- [0084] 더 짧은 서열의 전체 길이에 걸쳐, 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상의 아미노산이 동일하거나, 약 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상이 유사(기능적으로 동일)할 때, 두 개의 아미노산 서열은 "실질적으로 상동" 또는 "실질적으로 유사"하다. 바람직하게는, 유사한 또는 상동의 서열은 예를 들어 GCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) 파일업(pileup) 프로그램, 또는 BLAST, FASTA 등과 같은 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하여 예를 들어 GCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) 파일업(pileup) 프로그램, 또는 BLAST, FASTA 등과 같은 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하여 얼라인먼트(alignment)에 의해 식별된다.
- [0085] 예를 들어, 특정 아미노산은 활성의 눈에 띄는 손상 없이 단백질 구조 내의 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다. 단백질의 상호작용 능력 및 성질이 단백질의 생물학적 기능 활성을 정의하기 때문에, 특정 아미노산 치환이 단백질 서열, 및 서열을 인코딩하는 이의 DNA에서 물론 일어날 수 있고 반면에 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 획득할 수 있다. 따라서, 이들의 생물학적 활성의 눈에 띄는 손상 없이, 다양한 변화가 본 발명의 항체 서열, 또는 상기 항체를 인코딩하는 대응하는 DNA 서열에서 일어날 수 있다는 점이 고려된다.
- [0086] 특정 아미노산이 유사한 수치요법 지수 또는 스코어를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 제조할 수 있다는 것, 즉 여전히 생물학적 기능적으로 동등한 단백질을 획득할 수 있다는 것이 해당 분야에 알려져 있다.

- [0087] 따라서, 상기한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들어 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기반한다. 전술한 특성을 다양하게 고려하는 바람직한 치환은 해당 분야의 통상의 기술자에 잘 알려져 있으며, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.
- [0088] 따라서, 또한 본 발명은 중쇄를 포함하는 항체를 제공하고, 상기에서 가변도메인은:
- [0089] - SEQ ID NO: 2 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성(identity)을 갖는 H-CDR1,
- [0090] - SEQ ID NO: 3 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 H-CDR2,
- [0091] - SEQ ID NO: 4 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 H-CDR3,
- [0092] - SEQ ID NO: 6 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR1,
- [0093] - SEQ ID NO: 7 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR2,
- [0094] - SEQ ID NO: 8 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 가지는 L-CDR3을 포함하며, 및
- [0095] - 항체는 가변 도메인이 H-CDR1을 위한 SEQ ID NO: 2, H-CDR2를 위한 SEQ ID NO: 3 및 H-CDR3을 위한 SEQ ID NO: 4를 포함하는 중쇄 및 가변 도메인이 L-CDR1을 위한 SEQ ID NO: 6, L-CDR2를 위한 SEQ ID NO: 7 및 L-CDR3을 위한 SEQ ID NO: 8을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 친화성(affinity)으로, 더욱바람직하게는 무린 항-HER3 항체 9F7-F11과 실질적으로 동일한 친화성으로, HER3과 특이적으로 결합한다.
- [0096] 상기 항체는 해당 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 특이적 결합을 위해 분석될 수 있다. 많은 상이한 경쟁적 결합 에세이 포맷(들)이 에피토프 비닝을 위해 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 면역에세이(immunoassay)로는 웨스턴 블롯(western blot), 방사면역에세이(radioimmunoassay), ELISA, "샌드위치" 면역에세이, 면역침강(immunoprecipitation) 에세이, 침강소(precipitin) 에세이, 겔 확산 침강소 에세이, 면역방사(immunoradiometric) 에세이, 형광(fluorescent) 면역에세이, 단백질 A 면역에세이, 및 보체-고정(complement-fixation) 에세이와 같은 기법을 사용하는 경쟁적 에세이 시스템을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 에세이는 해당 분야에서 일반적이고 잘 알려져 있다(예를 들어, Ausubel et al., eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York 참조). 예를 들어, BIACORE®(GE Healthcare, Piscataway, NJ)는 모노클로날 항체의 에피토프 빈 판넬(bin panel)에 일반적으로 사용되는 다양한 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 에세이 포맷들 중 하나이다. 또한, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988]에 개시된 것과 같은 일반적인 크로스-블록킹(cross-blocking) 에세이가 수행될 수 있다.
- [0097] 조작된(engineered) 본 발명의 항체에는 변형(modification)이 VH 및/또는 VL 내 프레임워크에 수행되어, 예를 들어 항체의 특성을 개선시키는 것이 포함된다. 통상적으로 상기와 같은 프레임워크 변형은 항체의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키기 위해 수행된다. 예를 들어, 한가지 접근은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 대응되는 생식계열(germline) 서열로 "복귀돌연변이(backmutate)"하는 것이다. 더욱 상세하게는, 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 경험한 항체는 항체가 유래된 생식세포 서열과는 상이한 프레임워크 잔기를 함유한다. 이러한 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체가 유래된 생식세포 서열과 비교함으로써 확인할 수 있다. 프레임워크 서열을 이들의 생식세포 형태(configuration)으로 복귀시키기 위해서, 예를 들어 위치 지정 돌연변이생성법(site-directed mutagenesis) 또는 PCR-매개 돌연변이생성법(PCR-mediated mutagenesis)에 의해 체세포 돌연변이는 생식세포 서열로 "복귀돌연변이"될 수 있다. 상기 "복귀돌연변이된" 항체가 또한 본 발명에 포함될 수 있다. 또 다른 유형의 프레임워크 변형에는 T 세포-에피토프를 제거하여 잠재적인 항체의 면역원성을 감소시키기 위하여, 프레임워크 영역 내 혹은 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내 하나 이상의 잔기를 돌연변이하는 것이 포함된다. 이러한 접근은 "탈면역화(deimmunization)"라고도 지칭되고 U.S. 특허 공개번호 제20030153043호 (Carr et al)에 더 상세하게 기술되어 있다.
- [0098] 프레임워크 내 또는 CDR 영역 내에서 수행되는 변형에 더하여 또는 변형을 대체하여, 본 발명의 항체는 통상적으로 하나 이상의 항체의 기능적 특성, 예를 들어, 혈청 반감기, 보체결합, Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존성 세포독성을 변형하기 위한 Fc 영역 내의 변형을 포함하도록 조작(engineered)될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형 (예를 들어 하나 이상의 화학적 부분(moieties)이 항체에 부착될 수 있음) 또는 항체의 글리코실화가 바뀌도록 혹은 다시 하나 이상의 항체의 기능적 특성이 바뀌도록 변형될 수 있다. 이러한 구현에 각각이 하기에 더욱 상세하게 기술된다. Fc 영역 내 잔기의 넘버링은 Kabat의 EU index이다.

- [0099] 일 구현예에서, CH1의 힌지 영역이 변형되어 힌지 영역 내 시스테인 잔기의 수가 변화, 예를 들어 증가 되거나 혹은 감소 된다. 이러한 접근법은 Bodmer et al에 의한 미국 등록 특허 번호 제5,677,425호에 더 설명된다. CH1의 힌지 영역 내 시스테인 잔기의 수가 변화되어, 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 조립(assembly)을 촉진하거나 또는 항체의 안정성을 증가시키거나 혹은 감소시킨다.
- [0100] 또 다른 구현예에서, 항체의 힌지 영역은 돌연변이 되어 항체의 생물학적 반감기를 감소시킨다. 더욱 상세하게는, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 인터페이스 영역 내로 도입되어 항체는 본래의 Fc-힌지 도메인 SpA 결합과 비교하여 손상된 스태필로코칼 단백질 A (Staphylococcal Protein A: SpA) 결합을 가진다. 이러한 접근법은 Ward et al에 의한 미국 특허 번호 제 6,165,745호 내에 더 상세하게 기술된다.
- [0101] 또 다른 구현예에서, 항체는 이의 생물학적 반감기가 증가되도록 변형된다. 다양한 접근법들이 가능하다. 예를 들어, Ward에 의한 미국 등록 특허 번호 제6,277,375호에 기술된 바와 같이 하나 이상의 다음의 돌연변이들이 혼입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 그 대신에, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해서 항체는 Presta et al.에 의한 미국 특허 번호 제5,869,046 및 6,121,022호에 기술된 바와 같이, IgG의 Fc영역의 CH2 도메인의 두 개의 루프로부터 취해진 CH1 혹은 CL 영역 내에서 재생 수용체 결합 에피토프를 포함하도록 변화될 수 있다.
- [0102] 여전히 또 다른 구현예에서, Fc 영역은 항체의 이펙터 기능을 변화시키기 위해, 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체함으로써 변화될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기는 상이한 아미노산 잔기로 대체되어 항체가 이펙터 리간드에 대해 변화된 친화성을 가지는 반면 부모 항체의 항원-결합 능력은 유지할 수 있다. 친화성이 변화될 수 있는 이펙터 리간드는 예를 들어 Fc 수용체 혹은 보체의 C1 요소일 수 있다. 본 접근법은 winter et al에 의한 미국 등록특허 번호 제 5,624,821 및 5,648,260호에 더 상세하게 기술된다.
- [0103] 또 다른 구현예에서, 아미노산 잔기에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기는 상이한 아미노산 잔기로 대체되어 항체가 변화된 C1q 결합 및/또는 감소 되거나 소멸된 보체 의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC)을 가질 수 있다. 본 접근법은 Idusogie et al에 의한 미국 특허 번호 제 6,194,551호에 보다 더 상세하게 기술된다.
- [0104] 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 잔기를 변화시켜 항체가 보체와 결합하는 능력을 변화시킬 수 있다. 본 접근법은 Bodmer et al에 의한 PCT 공보 WO 94/29351에서 더 상세하게 기술된다.
- [0105] 여전히 또 다른 구현예에서, Fc 영역은 하나 이상의 아미노산을 변형함으로써 항체가 항체 의존성 세포 독성 (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC)을 매개하거나 및/또는 Fc 수용체에 대한 항체의 친화성을 증가시키도록 변형될 수 있다. 본 접근법은 Presta에 의한 PCT 공보 WO 00/42072에 더욱 상세하게 기술되어 있다. 또한, FcγRI, FcγRII, FcγRIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상 결합부위가 매핑되고, 향상된 결합을 가지는 변이체가 기술된다 (Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, W02010106180 참조)
- [0106] 여전히 또 다른 구현예에서, 항체의 글리코실화는 변형된다. 예를 들어, 탈글리코실화(aglycosylated) 항체 (즉 항체에 글리코실화가 결여된 경우)가 만들어질 수 있다. 글리코실화는 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키도록 변화될 수 있다. 이러한 카보하이드레이트 변형은 예를 들어 항체 서열 내 하나 이상의 글리코실화 위치를 변형 함에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환이 수행되어 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 위치의 제거를 유발하고 따라서 해당 위치의 글리코실화를 제거할 수 있다. 이러한 탈글리코실화(aglycosylation)는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근은 Co et al에 의한 미국 특허 번호 제5,714,350 및 6,350,861에 더 상세하게 기술된다.
- [0107] 추가로 혹은 대체하여, 감소 된 양의 푸코실 잔기를 가지는 혹은 푸코실 잔기를 가지지 않는 하이포푸코실화 된 혹은 비푸코실화 된 항체 혹은 증가 된 양분의(bisecting) GlcNAc 구조를 가지는 항체와 같이 항체가 변화된 유형의 글리코실화를 가지도록 만들어질 수 있다. 이와 같은 변화된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 확인되었다. 상기 카보하이드레이트 변형은 예를 들어 변화된 글리코실화 장치(glycosylation machinery)에 의해 숙주 세포 내에서 항체를 발현함에 의해 달성될 수 있다. 변형된 글리코실화 장치를 가지는 세포는 당해 분야에 기술되어져 왔고, 발명의 재조합 항체를 발현하는 숙주 세포로 사용되어 변화된 글리코실화를 가지는 항체를 제조할 수 있다. 예컨대, Hang et al에 의한 EP 1,176,195는 세포주가 푸코실 트랜스페라제를 인코딩하는 기능적으로 파괴된 FUT8을 가져 상기 세포주 내에서 발현되는 항체가 하이포푸코실화를 보이거나 혹은 비-푸코실화 패턴을 보이는 세포주, 예를 들어 푸코실트랜스페라제를 인코딩하는 FUT8 유전자의 결손 된 발현을

가지는 포유류 세포주 내 제조합 발현에 의해 제조될 수 있다. Presta에 의한 PCT 공보 WO 03/035835에는 포코 오스를 Asn(297)-연결된 카보하이드레이트에 부착하는 능력이 감소 되어 숙주 세포 내 발현되는 항체의 하이포 푸코실화를 유발하는 변이체 CHO 세포주, Lec13 세포가 개시된다 (또한, Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740 참조). Umana et al에 의한 PCT 공보 WO 99/54342에는 당단백질-변형하는 글리코실 트랜스페라제(예를 들어, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작되어 조작된 세포주 내 발현된 항체가 증가 된 양분(bisecting) GlcNac 구조를 나타내어 항체의 증가된 ADCC 활성을 유발하는 세포주가 기술된다. (또한, Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180 참조). Eureka Therapeutics 는 푸코실 잔기가 없는 변화된 포유류 글리코실화 패턴을 가지는 항체를 생산할 수 있는 유전적으로 조작된 CHO 포유류 세포를 기술한다 (<http://www.eurekainc.com/aboutus/companyoverview.html>). 그 대신에, 본 발명의 항체는 포유류-유사 글리코실화 패턴을 위해 조작되고 글리코실화 패턴으로 푸코오스가 결여된 항체를 생산할 수 있는 효모 또는 사상균(filamentous fungi) 내에서 제조될 수 있다 (예를 들어 EP1297172B1 참조).

[0108] 본 발명에 의해 본원에서 고려되는 또 다른 항체의 변형은 페길화(pegylation)이다. 항체는 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어 혈청) 반감기를 증가시키기 위해 페길화될 수 있다. 항체를 페길화하기 위해서, 항체 또는 이의 단편은 통상적으로 하나 이상의 PEG 기가 항체 혹은 항체 단편에 부착될 수 있는 조건하에서, PEG의 반응성 에스테르 혹은 알데히드 유도체와 같은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol: PEG)과 반응된다. 페길화는 반응성 PEG 분자 (혹은 아날로그성 반응성 물-용해성 폴리머)와의 아실화 반응 혹은 알킬화반응에 의해 수행될 수 있다. 본원에서 사용되는, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 모노 (C1- C10) 알콕시- 혹은 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 혹은 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은, 다른 단백질을 유도화 하는데 사용되어온 PEG 형태의 임의의 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 페길화되는 항체는 탈글리코실화된 항체이다. 단백질을 페길화하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어 Nishimura et al에 의한 EP 0 154 316 및 Ishikawa et al에 의한 EP 0 401 384 이 참조된다.

[0109] 본 발명에서 고려되는 또 다른 항체의 변형은 생성되는 분자의 반감기를 증가시키기 위한, 본 발명의 항체의 적어도 항원-결합 영역의 인간 혈청 알부민 혹은 이의 단편과 같은 혈청 단백질로의 접합체 또는 단백질 융합에 있다. 상기의 접근법은 예를 들어 Ballance et al. EP0322094에 기술된다.

[0110] 또 다른 가능성은, 본 발명의 항체의 적어도 항원-결합 영역의 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질에 대한 결합능을 가지는 단백질로의 융합으로 생성된 분자의 반감기를 증가시키는 것이다. 이러한 접근법은 예를 들어 Nygren et al, EP 0 486 525에 기술된다.

#### [0111] 면역접합체:

[0112] 본 발명의 항체는 검출가능 한 표기와 접합 되어 항-HER3 면역접합체를 형성할 수 있다. 적합한 검출가능 한 표지는 예를 들어 방사성 동위원소, 형광 표지, 화학발광 표지, 효소 표지, 생물발광 표지 또는 콜로이드성 금이 포함된다. 상기 검출가능하게-표지된 면역접합체를 제조하고 검출하는 방법은 해당 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 하기에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0113] 검출가능 한 표지는 자기방사선법(autoradiography)에 의해 검출될 수 있는 방사성 동위원소일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 특히 유용한 동위원소로는  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  및  $^{14}\text{C}$  이 있다.

[0114] 또한, 항HER3 면역접합체는 형광 화합물에 의해 표지될 수 있다. 형광으로 표지된 항체의 존재는 면역접합체를 적절한 파장의 빛에 노출시키고 그에 따른 형광을 검출함으로써 측정될 수 있다. 형광 표지된 화합물로는 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피코시아닌(phycoerythrin), 알로피코시아닌(allophycocyanin), o-프탈알데히드(o-phthalaldehyde) 및 플루오레스카민(fluorescamine)이 포함된다.

[0115] 선택적으로 항-HER3 면역접합체는 화학발광 화합물에 항체를 커플링함으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 화학발광-태그된 면역접합체의 존재는 화학 반응의 전개 동안 일어나는 발광의 존재를 검출함으로써 측정된다. 화학발광 표지 화합물의 예에는 루미놀, 이소루미놀, 방향족 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르가 포함된다.

[0116] 유사하게, 생물발광 화합물이 본 발명의 항-HER3 면역접합체를 표지하기 위해 사용될 수 있다. 생물발광은 촉매 단백질이 화학발광 반응의 효율을 증가시키는 생물학적 시스템에서 발견되는 일종의 화학발광이다. 생물발광 단백질의 존재는 발광의 존재를 검출함으로써 측정된다. 표지에 유용한 생물발광 화합물에는 루시페린, 루시페라

제 및 애플이 포함된다.

- [0117] 선택적으로, 항-HER3 면역접합체는 항-인간-HER3 모노클로날 항체를 효소에 연결함으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 항-HER3-효소 접합체가 적절한 기질의 존재 하에서 배양될 때, 효소 성분은 기질과 반응하여 o-를 들어 분광 분석, 형광 분석 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 성분을 생산한다. 다중특이적면역접합체를 검출 가능하게 표지하기 위해 사용될 수 있는 효소로는  $\beta$ -갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 퍼옥시다제 및 알칼라인 포스파타제가 포함된다.
- [0118] 해당 분야의 통상의 기술자는 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 적합한 표지를 알 것이다. 항-인간-HER3 모노클로날 항체에 마커 성분의 결합은 해당 분야에 알려진 표준의 기법을 사용하여 달성될 수 있다. 이와 같은 측면에서 통상적 방법론이 [Kennedy *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 70:1, 1976; Schurs *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 81:1, 1977; Shih *et al.*, *Int'l J. Cancer* 46:1101, 1990; Stein *et al.*, *Cancer Res.* 50:1330, 1990; 및 Coligan, *supra*]에 개시되어 있다.
- [0119] 더욱이, 면역화학 검출의 용이성 및 범용성은 아비딘, 스트렙트아비딘 및 비오틴에 접합된 항-인간-HER3 모노클로날 항체를 사용함으로써 강화될 수 있다. (예를 들어, Wilchek *et al.*(eds.), "Avidin-Biotin Technology", *Methods In Enzymology*(Vol. 184)(Academic Press 1990); Bayer *et al.*, "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", in *Methods In Molecular Biology*(Vol. 10) 149-162(Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992) 참조).
- [0120] 면역에세이를 수행하기 위한 방법은 잘 정립되어 있다 (예를 들어, Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208(Ritter and Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120(Birch and Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay*(Academic Press, Inc. 1996) 참조).
- [0121] 다른 측면에서, 본 발명은 항-인간-HER3 모노클로날 항체-약물 접합체를 제공한다. 본원에서 사용되는 "항-인간-HER3 모노클로날 항체-약물 접합체"는 치료제에 접합된 본 발명에 따른 항-인간-HER3 모노클로날 항체를 지칭한다. 상기 항-인간-HER3 모노클로날 항체-약물 접합체는 개체, 예를 들어 HER-발현 암에 걸린 개체에 통상적으로 단독으로, 그러나 다른 치료제와 조합하여 투여될 때에도, HER3-발현 세포에 임상적으로 유의한 효과를 발생시킨다.
- [0122] 통상적인 구현예에서, 항-인간-HER3 모노클로날 항체는 세포독성제에 접합되어, 그에 따른 항체-약물 접합체가 세포에 의해 섭취 또는 내재화(internalize)되는 경우에, HER3-발현 세포(예를 들어, HER3-발현 암 세포)에 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 가한다. 항체와의 접합을 위해 특히 적합한 성분은 화학치료제, 효소를 전환하는 전구약물(prodrug), 방사성 동위원소 또는 화합물, 또는 독소이다. 예를 들어, 항-인간-HER3 모노클로날 항체는 화학치료제 또는 독소(예를 들어, 아브린(abrin), 리신(ricin) A, 슈도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin) 또는 디프테리아(diphtheria) 독소와 같은 세포증식억제제 또는 세포파괴제(cytocidal agent))와 같은 세포독성제에 접합될 수 있다.
- [0123] 유용한 종류의 세포 독성제는 예를 들어, 항튜블린제(antitubulin agent), 아우리스타틴(auristatin), DNA 마이너 그루브 결합제(minor groove binder), DNA 복제 억제제(DNA replication inhibitor), 알킬화제(alkylating agent)(예를 들어, 시스-플라틴, 모노(백금), 비스(백금), 및 3핵 백금 복합체 및 카르보플라틴과 같은 백금 복합체), 안트라시클린(anthracycline), 항생제(antibiotic), 항엽산제(antifolate), 항대사물질(antimetabolite), 화학요법 증감제(chemotherapy sensitizer), 듀오카르마이신(duocarmycin), 에토포시드(etoposide), 플루오르화 피리미딘(fluorinated pyrimidine), 이오노포어(ionophore), 렉시트로핀(lexitropsin), 니트로소우레아(nitrosourea), 플라티놀(platinol), 프리-포밍(pre-forming) 화합물, 퓨린 항대사물질(purine antimetabolite), 퓨로마이신(puromycin), 방사 증감제(radiation sensitizer), 스테로이드, 타산(taxane), 토모이소머라제 억제제(topoisomerase inhibitor), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 등을 포함한다.
- [0124] 각각의 세포독성제는 예를 들어 안드로젠, 안트라마이신(AMC), 아스파라기나제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 부설판, 부티온인 설포시민, 캄프토테신(Camptothecin), 카르보플라틴, 카르무스틴(BSNU), CC-1065(Li *et al.*, *Cancer Res.* 42:999-1004, 1982), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴, 콜키신

(colchicine), 시클로포스파미드, 시타라빈, 시티딘 아라비노시드, 사이토칼라신 B, 다카르바진(dacarbazine), 탁티노마이신(전(前) 약티노마이신), 다우노루비신, 데카르바진(decarbazine), 도세탁셀, 독소루비신(doxorubicin), 에스트로젠, 5-플루오르데옥시우리딘(fluorodeoxyuridine), 에톱시드 포스페이트(VP-16), 5-플루오로우라실, 그라미시딘 D, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴(CCNU), 메클로레타민, 멜팔란, 6-메르캅토피린, 메토티렉세이트, 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신 C, 미톡산트론(mitoxantrone), 니트로이미다졸, 파클리탁셀(paclitaxel), 플리카마이신(plicamycin), 프로카르비진(procarbazine), 스트렙토조토신(streptozotocin), 테노포시드(tenoposide)(VM-26), 6-티오구아닌, 티오테파(thioTEPA), 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈을 포함한다.

[0125] 특히 적합한 세포독성제는 예를 들어, 돌라스타틴(dolastatin)(예를 들어, 아우리스타틴 E, AFP, MMAF, MMAE), DNA 마이너 그루브 결합제(예를 들어, 엔다이인(enediynes) 및 렉시트롭신), 듀오카르마이신, 탁산(예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀), 퓨로마이신, 빈카 알칼로이드, CC-1065, SN-38(7-에틸-10-히드록시-캄프토테인(camptothecin)), 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신(rhizoxin), 시아노모르폴리노-독소루비신, 에치노마이신(echinomycin), 콤브레타스타틴(combretastatin), 네트로핀(netropsin), 에포틸론(epothilone) A 및 B, 에스트라무스틴(estramustine), 크립토피신(cryptophycin), 세마도틴(cemadotin), 마이탄시노이드(maytansinoid), 디스코데르몰리드(discodeermolide), 엘레우테로빈(eleutherobin) 및 미톡산트론을 포함한다.

[0126] 특정 구현예에서, 세포독성제는 예를 들어, 독소루비신, 파클리탁셀, 멜팔란, 빈카 알칼로이드, 메토티렉세이트, 미토마이신 C 또는 에토포시드와 같은 종래의 화학치료제이다. 또한, CC-1065 유사체, 칼리키아미신(calicheamicin), 메이탄신(maytansine), 돌라스타틴 10의 유사체, 리족신, 및 팔리톡신(palytoxin)과 같은 강한 제제가 항-HER3-발현 항체에 연결될 수 있다.

[0127] 특정 변형예에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 아우리스타틴 E(해당분야에서 돌라스타틴-10으로도 알려짐) 또는 이의 유도체이다. 통상적으로, 아우리스타틴 E 유도체는 예를 들어, 아우리스타틴 E와 케토산 사이에 형성된 에스테르이다. 예를 들어, 아우리스타틴 E는 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응하여 각각 AEB 및 AEVB를 제조할 수 있다. 다른 통상적인 아우리스타틴 유도체는 AFP(디메틸발린-발린-돌라이소류신-돌라프로인-페닐알라닌-p-페닐렌디아민), MMAF(도발린-발린-돌라이소류신-돌라프로인-페닐알라닌), 및 MAE(모노메틸 아우리스타틴 E)를 포함한다. 아우리스타틴 E 및 이의 유도체의 합성 및 구조는 미국특허출원공보 제 20030083263호; 국제특허출원공보 WO 2002/088172 및 WO 2004/010957; 및 미국특허 제6,884,869호; 제 6,323,315호; 제6,239,104호; 제6,034,065호; 제5,780,588호; 제5,665,860호; 제5,663,149호; 제5,635,483호; 제5,599,902호; 제5,554,725호; 제5,530,097호; 제5,521,284호; 제5,504,191호; 제5,410,024호; 제5,138,036호; 제5,076,973호; 제4,986,988호; 제4,978,744호; 제4,879,278호; 제4,816,444호; 및 제 4,486,414호에 기재되어 있다.

[0128] 다른 변형예에서, 세포독성제는 DNA 마이너 그루브 결합제(예를 들어, 미국특허 제6,130,237호 참조)이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 마이너 그루브 결합제는 CBI 화합물이다. 다른 구현예에서, 마이너 그루브 결합제는 엔다이인(예를 들어, 칼리키아미신(calicheamicin))이다.

[0129] 특정 구현예에서, 항체-약물 접합체는 항-튜블린제를 포함한다. 항-튜블린제의 예는 예를 들어, 탁산(예를 들어, Taxol®(파클리탁셀), Taxotere®(도세탁셀)), T67(Tularik), 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈), 및 돌라스타틴 (예를 들어, 아우리스타틴 E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB)을 포함한다. 다른 항-튜블린제는 예를 들어 박카틴 유도체, 탁산 유사체(예를 들어, 에포틸론 A 및 B), 노코다졸(nocodazole), 콜키신 및 콜시미드(colcimid), 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 마이탄시노이드, 콤브레타스타틴, 디스코데르몰리드 및 엘레우테로빈을 포함한다. 몇몇의 구현예에서, 세포독성제는 다른 그룹의 항-튜블린제인 마이탄시노이드이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 마이탄시노이드는 메이탄신 또는 DM-1이다(ImmunoGen, Inc.; see also Chari et al., Cancer Res. 52:127-131, 1992).

[0130] 다른 구현예에서, 세포독성제는 항대사물질이다. 항대사물질은 예를 들어, 퓨린 길항제(antagonist)(예를 들어, 아조티오프린 또는 마이코페놀레이트 모페틸), 디히드로폴레이트 환원효소 억제제(예를 들어, 메토티렉세이트), 아시클로비르(acyclovir), 강시클로비르(gangcyclovir), 지도부딘(zidovudine), 비다라빈(vidarabine), 리바바린(ribavirin), 아지도티미딘(azidothymidine), 시티딘 아라비노시드, 아만타딘, 디데옥시우리딘(dideoxyuridine), 이오도데옥시우리딘(iododeoxyuridine), 포스카르네트(poscarnet) 또는 트리플루리딘(trifluridine)일 수 있다.

[0131] 다른 구현예에서, 항-인간-HER3 모노클로날 항체는 효소를 전환하는 전구-약물 전환 효소에 접합 된다. 전구-약

물 전환 효소는 알려진 방법을 사용하여 항체에 제조합적으로 융합되거나, 화학적으로 접합 될 수 있다. 예시적 전구-약물 전환 효소로는 카르복시펩티다제 G2,  $\beta$ -글루쿠로니다제, 페니실린-V-아미다제, 페니실린-G-아미다제,  $\beta$ -락타마제,  $\beta$ -글루코시다제, 니트로환원효소 및 카르복시펩티다제 A이다.

[0132] 치료제를 단백질, 및 특히 항체에 접합하기 위한 기법은 잘 알려져 있다 (예를 들어, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*(Reisfeld *et al.* eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", *Controlled Drug Delivery*(Robinson *et al.* eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.* eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibodies In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*(Baldwin *et al.* eds., Academic Press, 1985); 및 Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. 또한, 예를 들어 PCT 공보 WO 89/12624 참조).

#### [0133] 진단용도:

[0134] 본 발명의 다른 목적은 HER3 발현과 관련된 암 질병을 진단 및/또는 관찰하기 위한 본 발명의 항-인간-HER3 항체에 관한 것이다. HER 발현과 관련된 암 질병은 통상적으로 평평상피세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암, 신경교아종(glioblastoma) 및 신경섬유종증(neurofibromatosis)과 같은 교질 세포 종양, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암(hepatoma), 유방암, 대장암, 흑색종, 직장암, 자궁내막암종, 침샘암종, 신장암, 신암, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 종류의 두경부암을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 진단된 암은 유방암 또는 난소암이다. 특정의 구현예에서, 본 발명의 항체는 유방암 및 난소암을 진단하기에 유용하다.

[0135] 특정의 구현예에서, 본 발명의 항체는 전술된 바와 같이 형광 분자, 방사성 분자, 또는 해당 분야에 알려진 다른 임의의 표지와 같은 검출가능한 분자 또는 성분에 의해 표지될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 방사성 분자로 표지될 수 있다. 예를 들어 방사성 분자는 I123, I124, In111, Re186, Re188과 같은 신티그래프(scintigraphy) 연구를 위한 방사성 원자를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 항체는 요오드-123, 요오드-131, 인듐-I11, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철과 같은 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance: NMR) 이미징 (소위 자기공명 이미징(magnetic resonance imaging: MRI))을 위한 스핀 표지에 의해 표지될 수 있다. 항체의 투여 후에, 환자 내에서 항체의 분배가 검출된다. 특정 표지의 분배를 검출하기 위한 방법이 해당 분야의 통상의 기술자에 알려져 있고, 어떠한 적절한 방법도 사용될 수 있다. 비제한적인 예는 컴퓨터 단층촬영(computed tomography: CT), 양전자 단층촬영(positron emission tomography: PET), 자기공명 이미징(magnetic resonance imaging: MRI), 형광, 화학발광 및 초음파검사(sonography)를 포함한다.

[0136] 본 발명의 항체는 HER3 발현과 관련된 암 질병의 스테이징(staging)에 유용할 수 있다(예를 들어, 방사선 영상에서). 예를 들어, 본 발명의 항체는 유방암 또는 난소암을 스테이징하는데 유용할 수 있다. 이들은 단독으로, 또는 다른 유방암 또는 난소암 마커와 조합하여 사용될 수 있고, HER2, CA1 25, HE4 및 메소텔린을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0137] 통상적으로, 상기 진단 방법은 환자로부터 획득된 생물학적 샘플의 사용을 포함한다. 본원에서 사용되는 "생물학적 샘플"이라는 용어는 개체로부터 획득되고 진단 또는 관찰 에세이에서 사용될 수 있는 다양한 종류의 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 근원의 혈액 및 다른 액체 샘플, 생검 시료 또는 조직 배양체, 이들로부터 유래된 세포와 같은 고체 조직 샘플, 및 이들의 자손(progeny)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 HER3 발현과 관련된 암 질병을 갖는 것으로 의심되는 개인으로부터 수집된 조직 샘플로부터, 및 바람직한 구현예에서는 유방 또는 난소로부터 획득된 세포를 포함한다. 따라서, 생물학적 샘플은 임상학적 샘플, 배양체 내의 세포, 세포 상청액, 세포 용해액(lysate), 혈청, 혈장, 생물학적 유체 및 조직 샘플을 포함한다.

[0138] 특정의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 개체로부터의 세포 상의 HER3을 검출함으로써 HER3 발현과 관련된 개체의 암 질병을 진단하는 방법이다. 특히, 상기 진단 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0139] (a) HER3을 발현하는 생물학적 샘플의 세포와 복합체를 형성하기에 충분한 조건에서, HER3 발현과 관련된 암 질병에 걸릴 가능성이 있는 개체의 생물학적 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계; 및

- [0140] (b) 상기 복합체를 검출 및/또는 정량하는 단계로서, 상기 복합체의 검출은 HER3 발현과 관련된 암 질병을 나타내는 단계.
- [0141] 암 질병을 관찰하기 위해, 본 발명에 따른 진단방법은 다른 간격의 시간을 두고 반복되어, 샘플에 결합하는 항체가 증가 또는 감소 되는지 여부를 측정하고, 여기서 암 질병이 진행 또는 퇴행되는지를 측정할 수 있다.
- [0142] **치료 용도:**
- [0143] 본 발명의 항체, 단편 또는 면역접합체는 HER3-발현 암을 치료하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 항체는 단독으로, 또는 임의의 적합한 제제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0144] HER3-발현 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 암의 더욱 구체적인 예는 평평상피세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암, 신경교아종 및 신경섬유종증과 같은 교질 세포 종양, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 대장암, 흑색종, 직장암, 자궁내막 암종, 침샘 암종, 신장암, 신암, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 종류의 두경부암을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 치료되는 암은 유방암 또는 난소암이다.
- [0145] 따라서, 본 발명의 목적은 본 발명의 항체, 단편 또는 면역접합체를 치료적 유효한 양으로 필요 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, HER3의 발현과 관련된 암을 치료하는 방법과 관련된다.
- [0146] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 항체는 특히 리간드(예를 들어 NRG) 독립적 암 및 리간드 의존 암의 치료에 적합하다.
- [0147] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 항체는 특히 (이의 알로스테릭 효과에 의해) 오토크린 또는 파라크린 리간드-의존성 종양의 치료에 적합하다.
- [0148] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 항체는 특히 항체, 티로신 키나제 억제제 (TKI), 화학요법제 또는 항-호르몬 제제에 저항성을 가지는 암을 치료하는데 적합하다.
- [0149] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 항체는 특히 3중-음성 유방암, 췌장암 및 신장세포 암종으로 구성된 군에서 선택되는 암의 치료에 적합하다.
- [0150] 본 발명의 문맥에서 "치료하는" 또는 "치료"라는 용어는 상기 용어가 적용되는 장애 또는 질환 또는 상기 장애 또는 질환의 하나 이상의 증상을 반전, 완화, 진행의 억제, 또는 예방하는 것을 의미한다.
- [0151] 본 발명에 따르면, "환자" 또는 "필요대상 환자"라는 용어는 인간 HER3의 발현과 관련된 암에 걸렸거나, 걸릴 위험이 있는 인간 또는 비인간 포유류를 의도한다.
- [0152] 본 발명의 항체의 "치료적으로 유효한 양"은 임의의 의료적 치료에 적용되는 합리적인 수익성/위험성 비로 상기 암을 치료하기에 충분한 항체의 양을 의미한다. 그러나, 본 발명의 항체 및 조성물의 1일 용량은 합리적인 의료적 판단의 범위내에서 의사에 의해 결정될 것으로 이해될 것이다. 임의의 특정 환자를 위한 구체적인 치료적으로 유효한 투여 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특이적 항체의 활성; 사용되는 특이적 조성물; 환자 나이, 체중, 일반적인 건강상태, 성별 및 식습관; 투여 시간, 투여 경로 및 사용되는 특이적 항체의 분비율; 치료의 기간; 사용되는 특이적 항체와 조합하여 또는 함께 사용되는 약물; 의학 분야에 잘 알려진 유사한 요소를 포함하여 다양한 요소에 의존할 것이다. 예를 들어, 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준으로 화합물의 투여를 시작하고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시키는 것이 해당 분야의 통상의 기술자에 잘 알려져 있다.
- [0153] 특정 구현예에서, 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체가 질병 또는 장애의 치료를 위한 제2제제와 조합하여 사용된다. 암을 치료하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체는 예를 들어 수술, 방사능요법, 화학요법 또는 이들의 조합과 같은 종래의 암 치료요법과 조합하여 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명에 따른 항-HER3 항체 또는 항체-약물 접합체와의 조합 암 치료요법에 유용한 다른 치료제는 항-혈관형성제를 포함한다. 일부 측면에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항체-약물 접합체는 사이토카인(예를 들어, 종양에 대한 면역반응을 자극하는 사이토카인)과 공동투여된다.
- [0154] 일부 측면에서, 조합 치료요법에 유용한 다른 치료제는 예를 들어, EGFR, HER2 또는 HER4와 같이 종양 성장에 연관된 특정 요소의 길항제를 포함한다.
- [0155] 특정의 구현예에서, 본 발명의 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체는 트라스투주마브

(Trastuzumab) 또는 페르투주마브(Pertuzumab)와 같은 항-인간-HER2 모노클로날 항체와 조합하여 사용된다.

[0156] 일부 구현예에서, 전술된 바와 같은 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체는 티로신 키나제 억제제(Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI)와 조합하여 사용된다. BAY 43-9006(sorafenib, Nexavar®) 및 SU11248(sunitinib, Sutent®)은 승인된 상기과 같은 두 TKI이다. 다른 TKI는 이마티니브 메실레이트(Imatinib mesylate)(Gleevec®, Novartis); 게피티니브(Gefitinib)(Iressa®, AstraZeneca); 에를로티니브 히드로클로라이드(Erlotinib hydrochloride)(Tarceva®, Genentech); 반데타니브(Vandetanib)(Zactima®, AstraZeneca); 티피파르니브(Tipifarnib)(Zarnestra®, Janssen-Cilag); 다사티니브(Dasatinib)(Sprycel®, Bristol Myers Squibb); 로나파르니브(Lonafarnib)(Sarasar®, Schering Plough); 바탈라니브 숙시네이트(Vatalanib succinate)(Novartis, Schering AG); 라파티니브(Lapatinib)(Tykerb®, GlaxoSmithKline); 닐로티니브(Nilotinib)(Novartis); 레스타우르티니브(Lestaurtinib)(Cephalon); 파조파니브 히드로클로라이드(Pazopanib hydrochloride)(GlaxoSmithKline); 악시티니브(Axitinib)(Pfizer); 카네르티니브 디히드로클로라이드(Canertinib dihydrochloride)(Pfizer); 펠리티니브(Pelitinib)(National Cancer Institute, Wyeth); 탄두티니브(Tandutinib)(Millennium); 보수티니브(Bosutinib)(Wyeth); 세막사니브(Semaxanib)(Sugen, Taiho); AZD-2171(AstraZeneca); VX-680(Merck, Vertex); EXEL-0999(Exelixis); ARRY-142886(Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901(Pfizer); AMG-706(Amgen); BIBF-1120(Boehringer Ingelheim); SU-6668(Taiho); CP-547632(OSI); AEE-788(Novartis); BMS-582664(Bristol-Myers Squibb); JNK-401(Celgene); R-788(Rigel); AZD-1152 HQPA(AstraZeneca); NM-3(Genzyme Oncology); CP-868596(Pfizer); BMS-599626(Bristol-Myers Squibb); PTC-299(PTC Therapeutics); ABT-869(Abbott); EXEL-2880(Exelixis); AG-024322(Pfizer); XL-820(Exelixis); OSI-930(OSI); XL-184(Exelixis); KRN-951(Kirin Brewery); CP-724714(OSI); E-7080(Eisai); HKI-272(Wyeth); CHIR-258(Chiron); ZK-304709(Schering AG); EXEL-7647(Exelixis); BAY-57-9352(Bayer); BIBW-2992(Boehringer Ingelheim); AV-412(AVEO); YN-968D1(Advenchen Laboratories); 미도스타우린(Midostaurin)(Novartis); 페리포신(Perifosine)(Aeterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322(Pfizer); AZD-1152(AstraZeneca); ON-01910Na(Onconova); 및 AZD-0530 (AstraZeneca)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0157] **약학 조성물:**

[0158] 투여를 위해, 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체는 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 항-인간-HER3 모노클로날 항체 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 약학 조성물은 약학적으로 유용한 조성물을 제조하는 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있고, 여기서 치료적 분자는 약학적으로 허용되는 캐리어와 혼합물로 조합될 수 있다. 조성물은 이의 투여가 투여받는 환자에 의해 용인될 수 있으면 "약학적으로 허용되는 캐리어"로 불린다. 멸균 포스포이트-완충된 살린이 약학적으로 허용되는 캐리어의 일 예이다. 다른 적합한 캐리어가 해당 분야의 통상의 기술자에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, 19th ed. 1995) 참조). 제형은 하나 이상의 부형제, 방부제, 용해제, 완충제, 바이알 표면상에서 단백질의 손실을 방지하기 위한 알부민 등을 더 포함할 수 있다.

[0159] 약학조성물의 형태, 투여의 경로, 투여량 및 식이요법은 치료되어야 하는 상태, 병의 중증도, 환자의 나이, 체중 및 성별 등에 자연적으로 의존된다.

[0160] 본 발명의 약학조성물은 국부, 경구, 비경구, 비강내, 정맥내, 근육내, 피하 또는 안구내 투여 등을 위해 제형화될 수 있다.

[0161] 바람직하게는, 약학조성물은 주사될 수 있는 제형을 위해 약학적으로 허용되는 운반체를 포함한다. 이들은 특히 등장성, 멸균된, 식염수(saline solution)(모노소듐 또는 디소듐 포스포이트, 소듐, 포타슘, 칼슘 또는 마그네슘 클로라이드 등, 또는 상기 염의 혼합물), 또는 경우에 따라 멸균수 또는 생리식염수의 첨가시 주사가 가능한 용액의 구성을 가능하게 하는 건조, 특히 동결건조된 조성물일 수 있다.

[0162] 투여를 위해 사용되는 투여량은 적절한 병리학, 또는 선택적으로 원하는 치료 기간의 다양한 매개변수의 함수로, 특히 사용된 투여 모드의 함수로 조정될 수 있다.

[0163] 약학조성물을 제조하기 위해, 유효량의 항체가 약학적으로 허용되는 캐리어 또는 수성 매질에 용해 또는 분산될 수 있다.

[0164] 주사용으로 적합한 약학 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참기름, 땅콩유 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 주사가 가능한 멸균 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 상기

형태는 멸균되어야하고, 용이한 주사가능성(syringability)이 존재하는 범위 내로 유체성이어야 한다. 제조 및 저장의 조건에서 안정적이어야 하고, 박테리아 및 곰팡이류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존되어야 한다.

- [0165] 유리 염기 또는 약물학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 히드록시프로필셀룰로스와 같은 계면 활성제와 적절히 혼합되어 물 중에 제조될 수 있다. 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물, 및 유류 중에 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 보통 조건에서, 상기 제조는 미생물의 성장을 방지하기 위한 방부제를 포함한다.
- [0166] 본 발명의 항체는 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 산부가염(단백질의 유리 아미노기에 의해 형성됨)을 포함하고, 이는 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산에 의해 제조될 수 있다. 또한, 유리 카르복실기에 의해 형성된 염은 예를 들어, 나트륨, 포타슘, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제2철과 같은 무기 염기, 또는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다.
- [0167] 또한, 캐리어는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및 식물유를 포함하는, 용매 또는 분산매질일 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우에 원하는 입자크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장제(isotonic agent), 예를 들어 당류 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 조성물, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴에서의 사용에 의해 달성될 수 있다.
- [0168] 주사가능한 멸균 용액은 적절한 용매에 활성화합물을 원하는 양으로 전술한 다양한 다른 성분과 함께 첨가하고, 여과멸균함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균된 활성성분, 및 전술된 필요한 다른 성분을 염기성 분산매질을 포함하는 살균 운반체에 첨가함으로써 제조된다. 주사가능한 살균용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조방법은 앞서 멸균여과된 용액으로부터 활성성분 및 임의의 원하는 추가적인 성분의 분말을 생산하는 진공건조 및 동결건조 기법이다.
- [0169] 또한, 직접주사를 위한 더욱 또는 고도로 농축된 용액의 제조가 고려되고, 여기서 높은 농도의 활성제를 작은 종양 구역에 전달하는 극히 빠른 침투를 위해 용매로서 DMSO의 사용이 고려된다.
- [0170] 제형화되면, 용액은 투여 제형에 적합한 방법 및 약학적으로 유효한 양으로 투여될 것이다. 제형은 전술된 주사가능한 용액의 종류와 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여되지만, 약물 방출 캡슐(drug release capsule) 등도 사용될 수 있다.
- [0171] 수용액 중의 비경구 투여를 위해, 예를 들어 용액은 필요하면 적절하게 버퍼(buffer)되고, 액체 회석액은 우선 충분한 살린 또는 글루코스에 의해 등장성이 되도록 한다. 상기 특정 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이와 같은 이유로, 사용될 수 있는 살균 수성 매질이 본 발명의 기재내용에 비추어 해당 분야의 통상의 기술자에 알려질 것이다. 예를 들어, 1회 투여량이 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해된 후, 1000 ml의 피하주액(hypodermoclysis fluid)에 첨가되거나, 권장된 주입 지점에 주사될 수 있다(예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, p. 1035-1038 및 1570-1580 참조). 대상체의 상태에 따라 투여량의 변화가 필연적으로 일어날 것이다. 투여에 책임이 있는 자가 어떠한 경우에도 각 개체를 위한 적절한 투여량을 결정할 것이다.
- [0172] 본 발명의 항체는 1회 투여량 당 약 0.0001 내지 1.0 mg, 또는 약 0.001 내지 0.1 mg, 또는 0.1 내지 1.0 mg, 또는 심지어 약 10 mg 정도를 포함하도록 치료 혼합물에 제형화될 수 있다. 또한, 복수회 투여로 투여될 수 있다.
- [0173] 정맥내 또는 근육내 주사같은 비경구 투여를 위해 제형화된 화합물에 부가하여, 다른 약학적으로 허용되는 형태는 예를 들어 타블렛 또는 경구 투여를 위한 다른 고체; 지속방출 캡슐(time release capsule); 및 현재 사용되는 임의의 다른 형태를 포함한다.
- [0174] 특정 구현예에서, 리포솜 및/또는 나노입자의 사용이 숙주 세포로 항체의 도입을 위해 고려된다. 리포솜 및/또는 나노입자의 형성 및 사용은 해당 분야의 통상의 기술자에 알려져 있다.
- [0175] 나노캡슐은 일반적으로 안정적이고 재생가능한 방법으로 화합물을 포획할 수 있다. 세포내 폴리머의 과부하에

다른 부작용을 피하기 위해, 상기와 같은 초미세 입자(약 0.1  $\mu\text{m}$ 의 크기)가 일반적으로 체내에서 분해될 수 있는 폴리머를 사용하여 설계된다. 상기 요건을 충족하는 생분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자가 본 발명에서 사용이 고려되고, 상기 입자는 용이하게 제조될 수 있다.

[0176] 수성 매질 중에 분산된 인지질로부터 리포솜이 형성되고, 동시에 다층 동심 2중막 소포체(다층 소포체(MLV)로도 불림)를 형성한다. MLV는 일반적으로 25 nm 내지 4  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. MLV의 초음파처리는 200 내지 500Å의 직경을 갖고, 코어 내에 수용액을 포함하는 소형 단층 소포체(SUV)의 형성을 야기한다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온강도 및 2가 양이온의 존재에 의존한다.

[0177] **키트:**

[0178] 끝으로, 본 발명은 또한 적어도 하나의 본 발명의 항체를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 키트는 HER3 발현을 검출하는 것, 또는 치료적 또는 진단적 에세이에 용도가 있다. 본 발명의 키트는 고체 지지체, 예를 들어 조직 배양 플레이트 또는 비드 (예를 들어, 세파로스(sepharose) 비드)에 커플링된 항체를 포함할 수 있다. 키트는 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 시험관내(in vitro) HER3의 검출 및 정량을 위한 항체를 포함한 채로 제공될 수 있다. 검출에 유용한 상기 항체는 형광 물질 또는 방사능 표지와 같은 표지와 함께 제공될 수 있다.

[0179] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 따라 더욱 자세히 설명될 것이다. 그러나, 이들 실시예 및 도면은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 고려되어서는 안된다.

### 도면의 간단한 설명

[0180] 도 1은 세포 상 HER3 수용체와의 결합에 대한 mAb 9F7-F11 및 NRG의 상호 알로스테릭 효과를 보여준다. HER3에 대한 9F7-F11 결합은 다양한 농도의 NRG가 첨가되는 경우 SKBR3 세포 상에서 증가하였다. 반면, 항체 A는 NRG 결합에 의해 영향을 받지 않았고, 항체 B는 NRG 결합에 의해 억제되었다 (패널 A). 반대로 HER3에 대한 NRG 결합은 다양한 농도의 mAb 9F7-F11이 첨가되는 경우 HER2/HER3-형질감염된 3T3 섬유아세포 상에서 증가 된 반면, 무관한 IgG는 NRG의 결합에 영향을 미치지 않았다. 반대로 자유 NRG는 HER3과의 결합에 대해 표지된 NRG를 대체 하였다 (패널 B).

도 2는 NRG의 존재 혹은 부존재 하에서 HER3 수용체에 대한 9F7-F11 친화성을 정량화한 것이다. NRG의 부재 하에서 측정된 친화성 ( $2.33 \pm 0.30$  nM)과 비교하여, NRG의 존재 하에서의 친화성이 6배 증가 되는 것으로( $0.47 \pm 0.07$  nM) 측정되었다.

도 3은 BxPC3 췌장암종 세포 내 항-HER3 mAb 9F7-F11을 사용함에 의한 다운스트림(downstream) PI3K/Akt 및 ERK 시그널링 및 HER2/HER3 수용체의 인산화 억제를 보여준다.

도 4는 p53/MDM2 발현 및 인산화에 대한 mAb 9F7-F11의 영향을 보여주며, 이는 웨스턴 블랏 (A)에 의해 확인되고, Image J (B)에 의해 정량화되었다.

도 5는 정량적 PCR에 의해 나타나는, p53-유도 유전자 p21, Cyclin A2, PERP, Puma 및 Bcl-2의 발현에 대해 mAb 9F7-F11이 미치는 영향을 보여준다. 상대적 mRNA 발현이 GAPDH 발현과 관련하여 정상화된다.

도 6은 BxPC3 췌장암 세포의 세포 사이클 억제에 mAb 9F7-F11이 미치는 영향을 보여준다.

도 7은 BxPC3 췌장암 세포 (A)의 세포 사멸에 대해 mAb 9F7-F11이 미치는 영향을 보여준다 (도 7A). 미토콘드리아성 세포사멸을 개시하는 카스파제-9의 절단이 9F7-F11-처리된 BxPC3 세포의 세포 용해물에 대한 웨스턴 블랏에 의해 확인된다 (도 7B)

도 8은 mAb 9F7-F11 단독 혹은 세톡시맵 또는 트라스투주마브과의 조합이 BxPC3 췌장암 세포의 증식에 대해 미치는 영향을 트라스투주마브 또는 세톡시맵 단독에 의해 관찰되는 효과와 비교하여 보여준다.

도 9는 표적 MDA-MB-453 유방암 세포에 대한 mAb 9F7-F11 vs 트라스투주마브의 ADCC 효과를 보여준다.

도 10은 HER2-증폭/PIK3CA-mut MDA-MB-361 유방암 세포로 이종이식된 누드 마우스 내에서 mAb 9F7-F11에 의한 종양 진행의 억제를 보여준다.

도 11은 3중-음성 PTEN-mut/p53-mut MDA-MB-468 유방암 세포로 이종이식된 누드 마우스 내 mAb 9F7-F11에 의한 종양 진행의 억제를 보여준다 (A). Kaplan-Meier 생존률 곡선은 MDA-MB-468 종양이 2000 mm<sup>3</sup>의 볼륨에 도달될

경우에 산출된다 (B).

도 12는 NRG-중독된, p53-mut, HER2<sup>low</sup> BxPC3 췌장암 세포로 이중이식되고 mAb 9F7-F11 단독 (9F7) 또는 페르투주마브 (P + 9F7)와 조합하여 처리된 누드 마우스의 종양 진행 및 생존율을 페르투주마브 단독 (P) 또는 운반체 (Ctrl)와 비교하여 (패널 A) 및 트라스투주마브 및 페르투주마브 (P+T)과 비교하여 (패널 B) 보여준다.

도 13은 shHER3- 또는 shLuc (컨트롤)-넉아웃 BxPC3 췌장 암세포로 이중이식된 누드 마우스 내 mAb 9F7-F11에 의한 종양 진행의 억제력을 보여준다 (A). HER3 침묵(silencing)이 처리된 마우스에서 회수된 이중 이식체에 대한 웨스턴 블랏에 의해 체크 된다 (B).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 실시예 1: HER3 결합에 대한 9F7-F11의 알로스테릭 효과

HER2/HER3 헤테로다имер 형성을 촉진하기 위해 사전에 뉴레글린  $\beta$ 1로 자극된 HER2/HER3-감염된 NIH 3T3 세포주 (약  $2 \times 10^6$  세포)가 Balb/c 마우스에 복강투여 되었다. 면역화된 마우스의 비장 세포가 골수종 PX63Ag8.653를 사용하여 전술된 프로토콜 (Salhi et al. Biochem. J. 2004))에 따라서 융합되었다. 웰 당  $10^5$  융합 세포가 하이브리도마 선별을 위해 HAT 배지와 함께 플레이트에서 배양되었다. 융합 12일 후, 하이브리도마 상청액 스크리닝이 항원으로 HER3-Fc 단백질을 사용하여 ELISA에 의해 수행되었다. 컨트롤 하에서, 항원 HER2-Fc 및 Fc 단편 단독을 구분하는 것과 동시에 스크리닝이 수행되었다.

세포분석 경쟁시험(Cytometry competition experiment)이 SKBR3 세포-기초 에세이 내에서 항체 결합을 억제하는 NRG의 능력을 정량하기 위해 수행되었다. 이의 말미에,  $10^5$  SKBR3 세포는 다양한 농도의 경합적 NRG 리간드와 함께 1.5시간 동안 ice 상에서 전-인큐베이션 되었다. PBS-1% BSA로의 세척 후 선별된 항-HER3 mAb 9F7-F11가 50%의 최대 결합을 가지는 농도로 각 웰에 1시간 동안 ice 상에서 첨가되었다. 몇몇 실험에서는, NRG 리간드 및 항-HER3 9F7-F11이 2시간 동안 ice 상에서 공-인큐베이션되었다. 세포는 이후 세척되었고 45분간 ice 상에서 적합한 FITC-접합된 2차 항체의 1:60 희석과 함께 추가 인큐베이션되었고, 이후 Quanta apparatus (Beckman-Coulter) 세포 분석되었다. FACS에 의한 결합 실험은 9F7-F11 항체가 NRG와 결합하지 않음을 보여주고, 따라서 상기 항체가 NRG-결합 부위에 결합하지 않는다는 것을 제안하고 있다 (도 1A). NRG-비 경합적 9F7-F11 항체 결합은 심지어 NRG가 첨가되었을 때 160%로 증강되었는데, 따라서 이는 HER3 결합에 대한 mAb 9F7-F11의 알로스테릭 효과를 보여준다. 반대로, 양성 컨트롤 항체 A의 결합은 NRG 인큐베이션에 의해 변화되지 않았고, 양성-컨트롤 항체 B는 NRG-의존적 결합을 나타내었다 (도 1A).

반면에,  $10^5$  HER3-형질감염된 3T3 섬유아세포가 starvation 전 2일간 배양되었고, 이후 +4°C에서 45분간 KREBS 버퍼 내 다양한 농도의 9F7-F11 mAb와 함께 배양되었다. d2 크립테이트 염료로 표지된 NRG가 추가 45분 동안 첨가되었다. KREBS 세척 후, 620/670nm에서 형광물질이 Pherastar 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정되었다. 도 1B에서 보이는 바와 같이, 9F7-F11 결합은 NRG의 HER3에 대한 결합의 증가를 유도한 반면, 무관한 (irrelevant) IgG는 그렇지 않았다. 컨트롤로, 다양한 농도의 자유 NRG가 표지된 NRG의 HER3 수용체로의 결합을 대체하였다(도 1B). 따라서 이는 HER3 결합에 대한 9F7-F11 와 NRG 사이의 상호 알로스테릭 효과가 있음을 보여준다.

#### 실시예 2: NRG 첨가가 HER3 수용체에 대한 9F7-F11의 친화성의 6배 증가를 유도한다.

CisBio BioAssay에 의해 개발된 Tag-Lite 기법을 사용하여  $10^4$  HER3 스냅-태그된 HEK 세포가 Lumi4-terbium 크립테이트 공여자로 표지되었고, 및 이후 NRG 및 다양한 농도의 d2 수용자-표지된 mAb 9F7-F11와 함께 공-인큐베이션 되었다. 16시간의 인큐베이션 후 Lumi4-terbium 및 d2의 형광 물질이 [Pherastar FS instrument]에서 337nm 여기(excitation) 상 620 및 665nm에서 각각 측정되었다 ( $60 \mu s$  지연,  $400 \mu s$  인테그레이션). 도 2에서 보이는 바와 같이, NRG 없이 측정된 낮은 HER3 결합에 대하여, HER3 수용체에 대한 9F7-F11 결합의 용량-의존적 증가가 NRG의 존재하에서 관찰되었다. HER3에 대한 9F7-F11 결합의 Kd 값이 NRG와의 공-인큐베이션 후  $0.47 \pm 0.07$  nM로 산출되었다. 반면에 NRG 없이는 Kd 값이  $2.33 \pm 0.30$  nM로 측정되었다; 따라서 이는 NRG의 첨가로 인해 HER3 수용체에 대한 9F7-F11 친화성의 6배 증가가 알로스테릭하게 유도됨을 보여준다.

#### 실시예 3: 항-HER3 NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11는 ERK1/2 및 AKT 인산화의 차단(blockage)과 함께 HER2 및 HER3 인산화를 억제한다

- [0188] 24h 동안 37℃에서 1500개의 웰장 BxPC3 종양 세포가 6-웰 배양 플레이트의 각 웰에 첨가되었다. 16시간 동안 RPMI 완전 배지에서 1% FCS와 함께 serum starvation 후, 추가로 세척되었고, 세포는 세척 및 이어지는 촉진(stimulating) 전에 15분 동안 혹은 1시간 동안 37℃에서 50 µg/ml 농도의 항체 9F7-F11 혹은 음성 컨트롤 항체와 함께 혹은 NRG의 100ng/ml 희석 없이 전-인큐베이션되었다.
- [0189] 세포들은 이후 세척, 스크랩 및 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1% Triton, 10% 글리세롤, 0.1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 100 mM 소듐 플루오라이드, 1 mM 소듐 오르쏘바나테이트 (Sigma-Aldrich)를 함유하는 버퍼 및 하나의 완전(complete) 프로테아제 억제제 혼합물 테블릿 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)과 함께 용해(lysed)되었다. 30-분 인큐베이션 시간 후, 샘플에서 불용성 부분이 원심분리에 의해 제거되었고, 세포 용해물 내 단백질 농도가 Bradford 에세이에 의해 측정되었다. 상기 단백질 용해물은 바로 Laemmli 버퍼 (표적 및 세포주에 의존하는 1-20 µg 총 단백질)와 혼합되었고, 95℃에서 5분 동안 가열되었다. 환원 조건 하 7% SDS-PAGE 상에서의 전기영동 후, 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막 (Millipore)으로 전달되어 25℃에서 1시간 동안 5% 무지방 건조 우유를 함유하는 TNT 버퍼 (Tris 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.1%) 하에서 포화 되었다. 키나제 수용체 또는 시그널링 키나제, 및 이들의 인산화 형태에 대한 일차 항체가 4℃에서 18시간 동안 TNT-5% BSA 버퍼 하에서 인큐베이션되었다. 5번의 TNT 버퍼 내 세척 후 퍼옥시다제-접합 된 래빗, 염소 또는 마우스 폴리클로날 항체 (Sigma-Aldrich)가 25℃에서 1시간 동안 5% 무지방 건조 우유를 함유하는 TNT 버퍼 내에 적절하게 첨가되었다. TNT 버퍼 내에서 5번의 세척 후, 화학발광 기질(Western lightning Plus-ECL, Perkin Elmer)을 사용하여 블롯이 시각화되었다.
- [0190] 놀랍게도, 9F7-F11 항체는 Y1289-HER3 및 Y1242-HER2 상 리간드-유도된 인산화를 차단하였다 (도 3). 이와 함께, 알로스테릭 비-경합적 항체 9F7-F11는 Ser473 상 Akt 인산화 및 Thr202/204 상 ERK1/2 인산화의 억제를 유도하였다.
- [0191] **실시예 4: 항-HER3 NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11은 P53 경로의 조절(modulation)과 함께 MDM2 발현 및 인산화를 억제한다.**
- [0192] 전술된 바와 유사하게, BxPC3 종양 세포가 37℃에서 24시간 동안 6웰 배양 플레이트의 각 웰에 첨가되었다. 1% FCS를 첨가한 RPMI 완전 배지 내 16시간 동안의 serum starvation 후 추가로 세척되고, 세포는 세척 및 이어지는 촉진(stimulation) 전에 37℃에서 24시간 또는 72시간 동안 50 µg/ml의 항체 9F7-F11, 또는 음성 컨트롤 항체와 함께 혹은 NRG의 100ng/ml 희석 없이 전-인큐베이션되었다. 세포가 이어서 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 위해 용해되거나 또는 적당한 프라이머를 사용한 RNA 추출, 역 전사 및 정량적 PCR에 보내졌다. 웨스턴 블랏에 의한 도 4에서 보이는 바와 같이, 9F7-F11 처치는 MDM2 발현 및 인산화를 억제하고 p53의 발현을 증가시켰다. 관련하여, Q-PCR에 의해 보이는 바와 같이, 9F7-F11 처치는 p53-유도 유전자 발현, 예를 들어 세포 사이클 및 증식의 차단과 관련된 p21, 및 양성적으로-조절되는 세포사멸(apoptosis)과 관련되는 Puma 및 PERP의 발현을 증가시킨다 (도 5). 반면에 각각 증식을 촉진하고 세포사멸을 억제하는 Cyclin A2 및 Bcl2 유전자 발현은 NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11의 처리 후 감소 되었다 (도 5).
- [0193] **실시예 5: 항-HER3 NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11은 G1 상 내 세포 사이클을 차단하고, 세포 증식을 억제하며, 및 세포사멸을 회복시킨다.**
- [0194] HER3-특이적인 Ab 9F7-F11의 세포 사이클에 대한 영향이 프로피디움 요오드 염색을 사용하여 평가되었다. 개략적으로 300,000 BxPC3 종양 세포/웰이 6-웰 마이크로타이터 플레이트에서 24시간 동안 배양되었고, 및 이후 serum starvation 되었으며, 추가적인 24시간 동안 FCS가 첨가되지 않은 RPMI 배지 내에서 싱크로나이즈되었고, 100 µg/ml 항-HER3 Ab 9F7-F11 및 100 ng/ml NRG와 함께 공-인큐베이션되었다. 투과가능하게 된 (Permeabilized) 세포가 프로피디움 요오드로 24시간 후 염색되었고, 유동 세포측정 분석법이 수행되었다. 증식 및 세포사멸 에세이를 위해, 50,000 BxPC3 세포/웰이 starvation (RPMI-1% FCS) 전에 이식되었다. HER3-특이적인 Ab 9F7-F11 및 NRG가 120시간 동안 첨가되었다. 세포 증식이 배양의 끝 30시간 동안 Alexa Fluor 488-접합된 5-에티닐-2'-데옥시유리딘 (EdU) (Invitrogen)을 혼입함에 의해서 측정되었다. 세포 사멸은 형광-접합된-Annexin V 및 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD; Beckman-Coulter)와의 배양에 의해 평가되었다. 모든 실험들이 3회씩 반복되었다. 카스파제-9 분석을 위해, BxPC3 세포가 전술된 바와 같이 처리되었고 용해되었다. 세포 용해물의 SDS-PAGE 및 웨스턴블랏에 이어, 프로-효소의 절단(cleavage)을 통한 카스파제-9의 활성화가 적절한 항체를 사용하여 입증되었다. 도 6에서 보이는 바와 같이, 알로스테릭 9F7-F11 Ab의 24시간-처치는 G1 상 내 세포 사이클을 차단하였고, 비처리된 혹은 컨트롤 Ab-처리된 세포의 36-38% 에서 9F7-F11-처리된 BxPC3 세포의 32%로 G1 세포가 증가되었다. 이와 함께 9F7-F11 처치는 S 및 G2/m 상 내 BxPC3 세포의 비율(percentage)을 감소시켰

다 (도 6). BxPC3 세포의 9F7-F11 mAb 처리는 미토콘드리아성 세포사멸을 개시하는 Pro-카스파제 9의 절단과 함께 (도 7b) 비처리된 및 컨트롤 Ab-처리된 세포와 비교하여 전기(18%) 및 후기(12%) 세포사멸을 증가시켰다 (도 7a). 끝으로, BxPC3 세포 증식은 120시간의 9F7-F11 Ab 처리 후 억제 되었다. HER2<sup>low</sup> BxPC3 세포에 대한 항-HER2 트라스투주마브 단독의 세포 증식에 대한 특이적인 영향은 관찰되지 않았고, 반면에 항-EGFR 세톡시맵은 항-HER3 Ab 9F7-F11과 비교하여 덜 효과적이었다 (도 8). 반면, mAb 9F7-F11 및 트라스투주마브의 조합은 9F7-F11/세톡시맵 조합과 비교하여 세포 증식을 더 효과적으로 억제하였고, 이는 HER2<sup>low</sup> 종양 세포에 대한 트라스투주마브/9F7-F11 조합의 가능한 시너지 효과 및 세톡시맵/9F7-F11 조합의 부가적인 효과를 나타낸다. 조합하면, 상기의 결과는 NRG-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 항체 9F7-F11이 G1 상 내 세포 사이클을 차단하고 전기 및 후기 미토콘드리아성 세포 사멸을 Pro-카스파제-9 절단을 통해 회복시키고 및 종양 세포의 증식을 억제한다는 것을 보여준다. 본 사안에서, 항-HER2 Abs와 mAb 9F7-F11의 조합은 HER2<sup>low</sup> 종양의 큰 관심사가 될 수 있을 것이다.

[0195] **실시예 6 : 항-HER3 NRG-비 경합적 알로스테릭 항체 9F7-F11가 유방암 세포의 항체-의존성 세포 독성을 유도한다.**

[0196] 기초-유사 3중-음성 유방암에서 유래 되는 MDA-MB-453 종양 표적 세포가 ADCC 에세이 하루 전에 평평-바닥 96웰 마이크로플레이트의 웰당 20,000 세포로 이식되었다. MDA-MB-453 세포주가 약 180,000 HER2 및 21,000 HER3 수용체를 발현한 반면, EGFR 발현은 관찰되지 않았다. 배양 배지 내 세척 후 9F7-F11 mAb이 30분 동안 10 µg/ml로 첨가되었고, 말초 단핵구 세포 (PBMC)에서 유리되는 이펙터세포(effector cell)가 첨가되었다. PMBC는 “Etablissement Francais du Sang” 에서 획득한 건강한 기증자의 혈액 샘플을 농도 구배 원심분리하여 준비하였다. 이펙터/표적 (Effector/Target: E/T) 세포가 가습된 세포 인큐베이터 내에서 24시간 동안 15/1 E/T 비율로 인큐베이트되었다. MDA-MB-453 표적 세포의 사멸이 세포독성 검출 키트(LDH Detection kit; Promega G-1780)를 사용하여 제조자의 인스트럭션에 따라 손상된 세포에서의 락테이트 디하이드로게나제 (LDH) 방출을 측정함으로써 평가되었다. 간략하게 언급하면, 50 µl의 세포 상층액이 새로운 평평-바닥 96웰 마이크로플레이트로 조심스럽게 옮겨지고, 키트의 LDH 혼합물 (50 µl/well)이 각 웰에 첨가되었다. 30분간의 37°C에서의 인큐베이션 후, 50 µl의 정지 용액(키트 내 포함)이 첨가되고 흡광도(optical density)가 490 nm에서 측정되었다. 하기의 컨트롤이 각 실험마다 주어졌다: PBMC 단독, MDA-MB-453 표적 세포 단독 (자발적 LDH 방출), PBMC를 가지는 표적 세포 (항체 의존적 자발적 방출), 용해 버퍼를 가지는 표적 세포 (최대 LDH 방출), Ab를 가지는 PBMC, Ab를 가지는 표적 세포. 각 샘플의 특이적 용해 비율이 하기 식을 사용하여 측정되었다:

[0197] 특이적 용해 비율 = (샘플 값- 자발적 방출)/(최대 방출 - 자발적 방출)\*100. 도 9에서 보이는 바와 같이, 건강한 기증자 1 및 2로부터의 PBMC를 사용하여, 9F7-F11 Ab이 MDA-MB-453 유방암 세포의 1 내지 10% 특이적 세포 용해를 유도하였다. 동일한 실험에서, 양성 컨트롤 트라스투주마브가 약 40%의 용해를 유도하였는데, 이는 MDA-MB-453이 HER3 수용체와 비교하여 10배 더 많은 HER2 수용체를 발현한다는 사실에 기인한다.

[0198] **실시예 7: HER2-중폭 MDA-MB-361 및 3중-음성 MDA-MB-468 유방암으로 이종이식된 마우스 내 9F7-F11 단독요법**

[0199] 무흉선의, 6- 내지 8-주-연령의, 암컷 BALB/c 누드 마우스를 [Janvier and Charles Rivers Laboratories]에서 구입하였다. HER2-중폭/PIK3CA-mut 유방암 세포 MDA-MB-361 (10x10<sup>6</sup>) 및 HER2-비 중폭/PTEN-mut/p53-mut/ER-/PR- 3중-음성 유방암 세포 MDA-MB-468 (3.5x10<sup>6</sup>)가 무흉선 BALB/c 누드 마우스의 오른쪽 옆구리로 s.c. 투여되었다. 이들은 둘 다 낮은 정도로 HER3 수용체를 발현하였다 (약 10,000 수용체/세포). 모든 in vivo 실험들이 [French guidelines for experimental animal studies (Agreement no. B34-172-27)]를 준수하여 수행되었다.

[0200] 종양이 대략 100 mm<sup>3</sup>의 볼륨에 도달하는 경우 종양-함유 마우스가 상이한 처치 그룹으로 무작위 추출되었다. 마우스는 HER3-특이적인 항체 9F7-F11 vs 운반체 (PBS)의 i.p.투여로 처리되었다. 주사된 항체의 양은 300 µg/주사(15 mg/kg)이었고, 1주에 3번, 6주 동안 연속하여 투여되었다 (Q2D-6W). 종양 크기(dimensions)가 칼리퍼를 사용하여 주당 2회 측정되었고, 볼륨은 식 D1 x D2 x D3/2에 의해 산출되었다. 종양 진행이 식 [(최종 볼륨)-(최초 볼륨)]/(최초 볼륨)을 사용하여 산출되었다. 또한, 결과는 종양이 결정된 최종 볼륨인 2,000 mm<sup>3</sup>에 도달하는데 소요되는 시간을 사용하여 Kaplan-Meier 생존률 곡선에 의해 표현되었다. 평균지연(median delay)이 50%의 마우스가 결정된 볼륨에 도달한 종양을 가지는 시간으로 정의되었다.

[0201] 도 10에 보이는 바와 같이, 우리는 종양 이식 후 55일 (대응되는 항체 처리의 종결; 40일)째 되는 날에, 운반체

로 처치된 마우스 내에서 측정된 평균 종양 크기와 비교하여 9F7-F11-처리된 마우스 내 MDA-MB-361 종양 성장의 유의한  $47 \pm 5\%$ -감소가 관찰되었다( $p < 0.001$ ). 실험의 종점(97일)에서, 더 작지만, 유의한 종양 크기의  $21 \pm 2\%$ -감소가 9F7-F11-처리된 그룹에서 관찰되었는데, 이는 아마도 9F7-F11의 처치가 57일부터 중단되었기 때문일 것이다.

[0202] 도 11A에서 보이는 바와 같이, 평균 종양 볼륨이 컨트롤(운반체)과 비교하여 MDA-MB-468 세포로 이종이식된 9F7-F11-처리 마우스에서 유의하게 더 낮았다(9F7-F11로의 처치 후 이종이식-후 105일에서의 35% 볼륨 감소). 9F7-F11 Ab의 처치는 MDA-MB-468 세포로 이종이식된 동물 내에서 50% 평균 생존 시간(median survival time)을 20일까지로 유의하게 지연시켰다 (9F7-F11-처리 그룹에 대해 실험 종결 시, 예를 들어 190일 시점에서, 한 마리의 마우스가 안정화되었다;  $p < 0.05$ ). 종합하면, 상기 결과는 NRG-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 Ab 9F7-F11가 HER2-중폭 또는 3중-음성 유방암 세포주로 이종이식된 마우스 내 종양 성장을 지연시킨다는 것을 보여준다.

[0203] **실시예 8: NRG-중독된 BXP33 체장암으로 이종이식된 마우스 내 페르투주마브와의 9F7-F11 조합요법**

[0204] 본 발명자는 이전에 다른 표적요법과 치료적 항체 트라스투주마브의 조합이 낮은 HER2 발현을 가지는 체장암종에 시너지 효과를 보인다는 것을 확인하였다 (Larbouret, 2007, 2010). 본 발명자는 HER2<sup>low</sup> 체장암종 내에서의 알로스테릭 항-HER3 Ab 9F7-F11 및 항-HER2 Ab 페르투주마브 조합 요법을 평가하였다. 3주/연령 암컷 무흉선 마우스의 우측 옆구리에 뉴레굴린을 분비하는 (NRG-중독된) HER2<sup>low</sup> 체장 BxPC-3 세포 ( $4.5 \times 10^6$ )가 피하주사 되었다. 종양이  $100 \text{ mm}^3$ 의 볼륨에 도달되는 경우 종양-함유 마우스는 서로 다른 처치 그룹으로 무작위 추출되었고 (적어도 동물 6마리/그룹), 이후 2 또는 10 mg/kg의 페르투주마브, 10 mg/kg 9F7-F11 또는 페르투주마브 및 9F7-F11 조합 (10 mg/kg 의 각 mAb)으로 처리되었다. 항체들이 주당 2회씩 4주 동안 복강투여 (i.p.)되었다. 종양 볼륨이 다음의 식  $D1 \times D2 \times D3 / 2$ 을 통해 산출되었다. 생존률 비교를 위해, 마우스는 종양이  $1000 \text{ mm}^3$ 에 달하는 경우 희생되었다.

[0205] 비-처리 그룹과 비교하여 두 항체 단독 모두 현저하게 종양의 성장을 완화시켰고( $p < 0.001$ ), 항-HER3 Ab 9F7-F11 및 페르투주마브의 사이에서 어떠한 유의한 차이도 관찰되지 않았다 ( $p = 0.6488$ ) (도 12A). 50% 평균 생존 시간(median survival time)이 대조군과 비교해서 9F7-F11 처리된 마우스에서 17일까지, 페르투주마브 처리된 마우스에서 23일까지 지연되었다 (도 12A). 더욱이, 각 항체 단독으로 투여한 경우보다 9F7-F11 및 페르투주마브의 공-처치가 종양의 성장을 훨씬 더 억제하였다 (페르투주마브 vs 9F7-F11/페르투주마브;  $p = 0.004$ ). 4주간의 처치가 끝난 시점에서, 종양 볼륨이 9F7-F11 또는 페르투주마브 단독으로 처리된 마우스에서 여전히 증가 된 반면, 9F7-F11/페르투주마브 조합을 투여받은 동물에서는 상당히 안정된 상태로 남아있었다 (도 12A). 평균 생존률(Median survival)은 두 개의 항체 조합을 투여한 동물에서, 컨트롤 동물(42 일의 획득;  $p = 0.0001$ ) 또는 단일 항체를 투여받은 마우스 (9F7-F11/페르투주마브 vs 9F7-F11  $p = 0.0013$ ; 9F7-F11/페르투주마브 vs 페르투주마브  $p = 0.0355$ ) 보다 더 길었다 (도 12A). 끝으로, 항-HER3 Ab 9F7-F11 및 페르투주마브의 조합은 페르투주마브/트라스투주마브 조합보다 현저하게 더 효과적이었는데, 평균 생존 시간이 9F7-F11/페르투주마브로 처리된 동물 (42 일)에서 페르투주마브/트라스투주마브를 처리 받은 동물(13일) 보다 더 길었다 (도 12B). 종합하면, 상기 결과는 NRG-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 Ab 9F7-F11 및 항-HER2 페르투주마브 조합요법이 HER2-특이적인 항체를 사용한 조합요법에 비하여 HER2<sup>low</sup> 종양에 더 효과적이라는 것을 보여준다.

[0206] **실시예 9: HER3 넉-아웃은 NRG-중독된 BXP33 체장암으로 이종이식된 마우스 내 9F7-F11 in vivo 효율을 없앤다.**

[0207] [Lee-Hoeflich et al. (2008)]의 작업에 기초하여, 물질 및 방법을 뒷받침하여 기술된 바와 같이, 두 개의 짧은 헤어핀 올리고뉴클레오타이드가 HER3 mRNA 레벨을 넉다운(knockdown)하는데 선택되었다. 컨트롤 벡터 (shCTRL) pSIREN-shLuc는 L. Le Cam에 의해 친절하게 제공되고, 이는 이전에 공지되어있다 ((Le Cam et al., 2006)). 퓨로마이신 N-아세틸 트랜스페라제 저항성 유전자를 함유하는 pSIREN-shHER3 및 pSIREN-shLuc이 이후 암포트로픽 피키징 세포주 AmphoPack-293 (Clontech)로 형질전환되었다. 2일 후, 복제-결손 바이러스 입자를 함유하는 상청액이 수집되었고 BxPC3 세포를 감염시키는데 사용되었다. 항생물질 선별( $10 \mu\text{g/ml}$  퓨로마이신)이 2일 후 시작되었다. 선별 7일 후, 세포가 서브클론되고 내재적 HER3 단백질의 발현의 부재에 기초하여 선별되었다. Harlan (Le Malcourlet, France)에서 구매된 6 주/령 암컷 무흉선의 마우스의 오른쪽 옆구리에 부모(parental) shHER3 ( $3.5 \times 10^6$ ) 또는 컨트롤 shLuc BxPC-3 세포 ( $4.5 \times 10^6$ )가 앞서 전술된 바와 같이 피하주사 되었다. 종양-함유 마우스는 종양이  $100 \text{ mm}^3$ 의 볼륨에 도달할 때 서로 다른 처치 그룹 (적어도 6 동물/ 그룹)으로 무작위 선별되었고, 이후 1주당 2회, 4주 동안(Q3D-4W) 10 mg/kg 9F7-F11 복강투여로 처리되었다. HER3 발현 및 9F7-

F11 *in vivo* 치료적 효율 사이의 관련성을 확인하기 위해 마우스가 shHER3 또는 shCTRL BxPC-3 세포로 이종이식되었다 (도 13A). 본 발명자의 *in vitro* 데이터와 일치하여, 비처리된 컨트롤 군과 비교하여, NRG-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 항체 9F7-F11은 유의적으로 shCTRL BxPC-3 종양 이종이식체의 성장을 억제하였다 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0015$ ) (도 13A). 반면에, 비처리된 컨트롤과 비교하여 어떠한 유의한 종양 성장도 shHER3 BxPC-3 암 세포로 이종이식되고 9F7-F11 Ab로 처리된 마우스에서 발견되지 않았다(도 13A). 실험의 종결 시에, HER3 발현은 처리된 마우스에서 유래된 shHER3 BxPC-3 종양 이종이식체 내에서 여전히 침묵되었다 (도 13B). 상기 결과는 *in vivo* HER3 억제가 NRG-비 경합적 알로스테릭 항-HER3 항체 9F7-F11 치료적 효율을 없앤다는 것을 의미한다.

[0208]

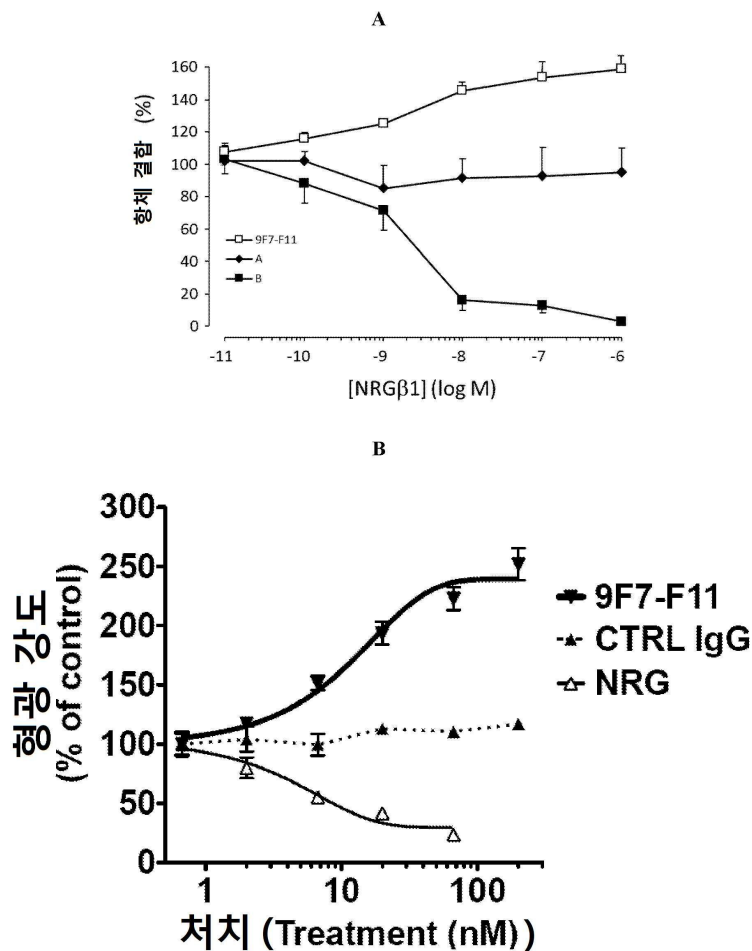
참고문헌:

[0209]

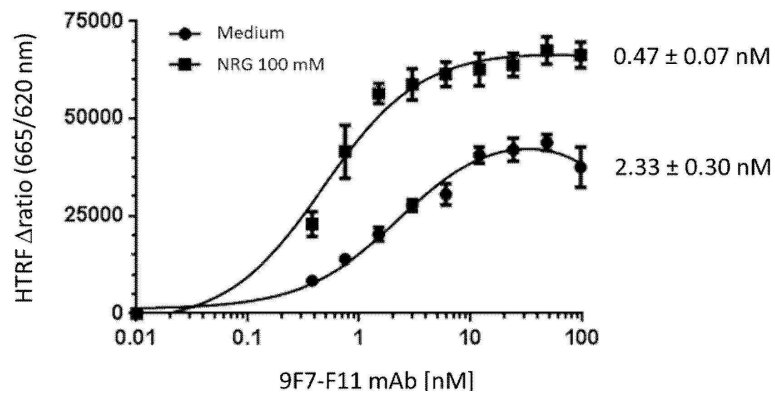
본원에 걸쳐 다양한 참고문헌이 본 발명과 관련된 선행 기술을 개시한다. 이들 참고문헌의 개시내용은 본 발명의 기재내용에 참고용으로 삽입된다.

## 도면

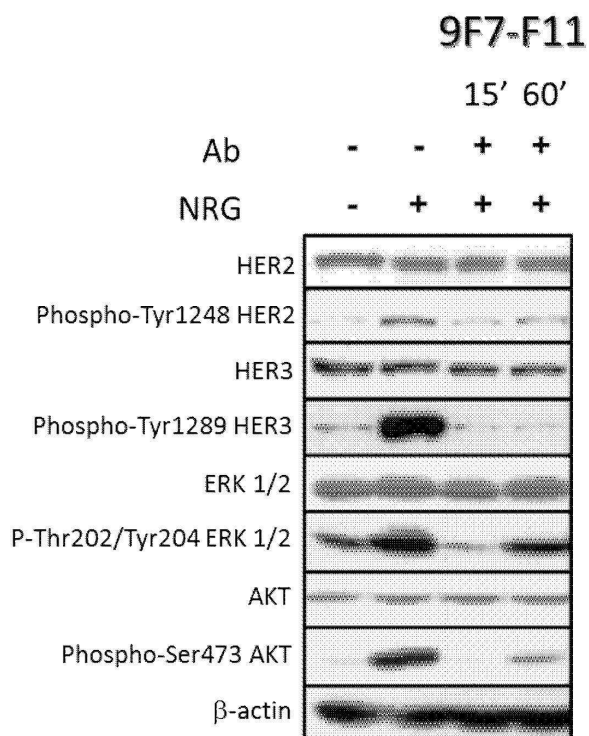
### 도면1



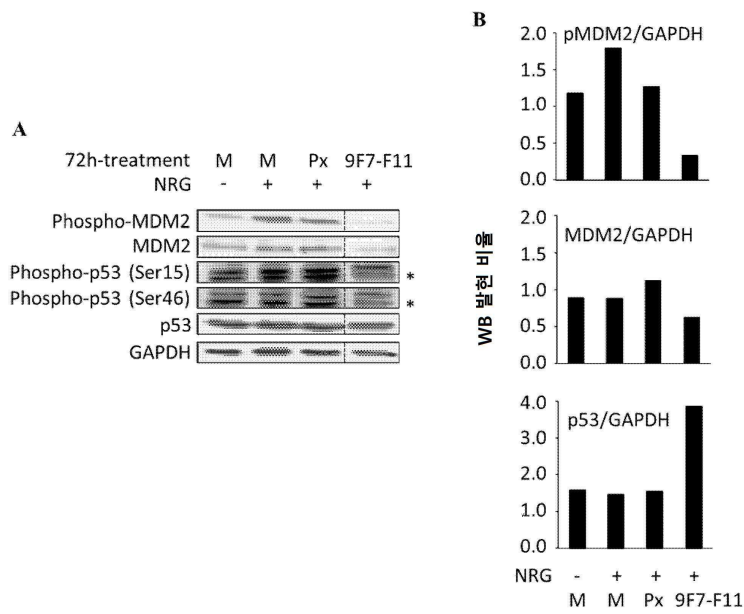
도면2



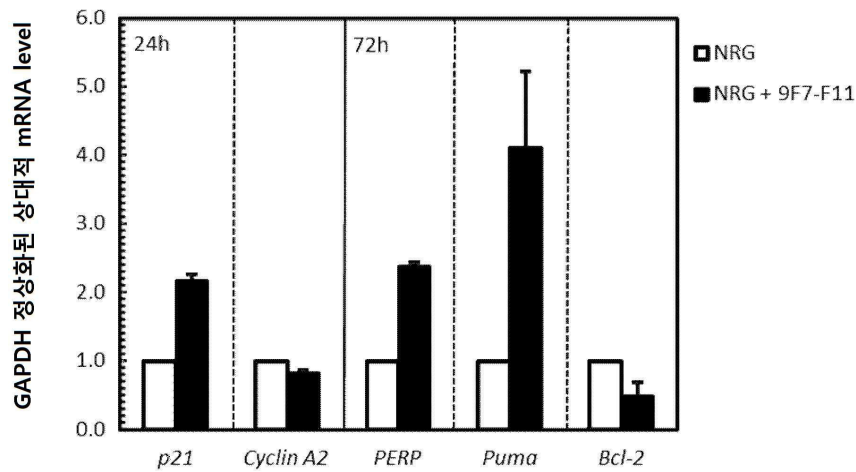
도면3



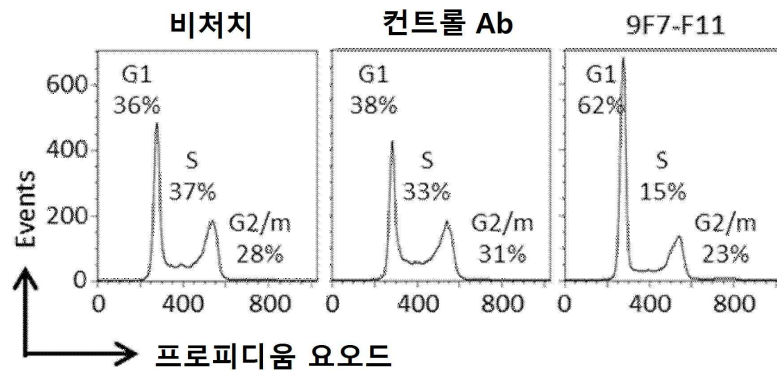
도면4



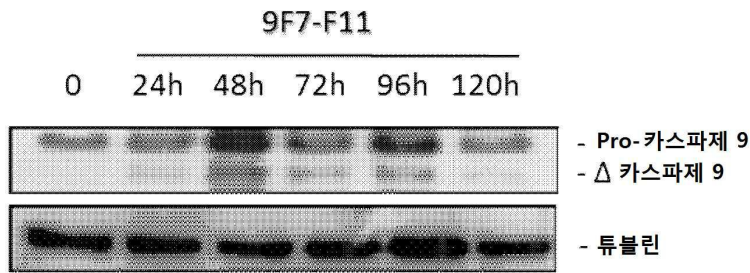
도면5



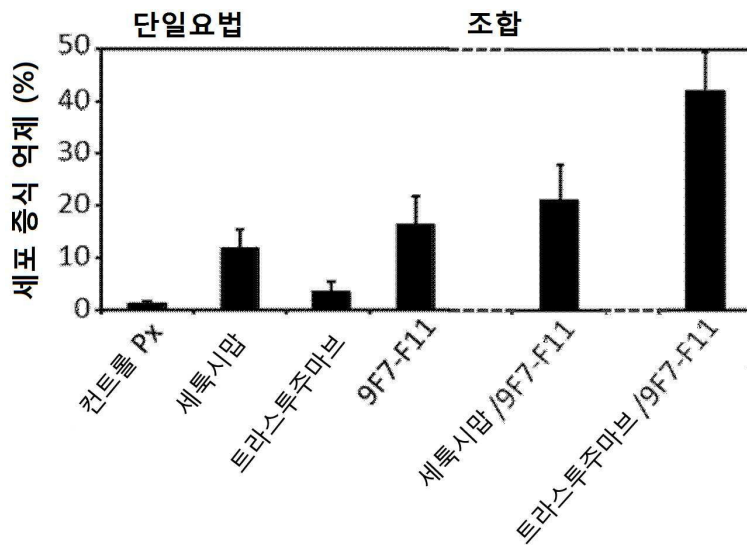
도면6



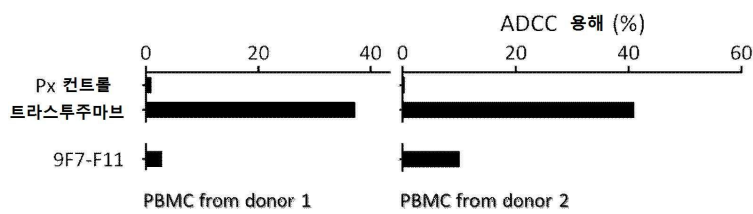
도면7



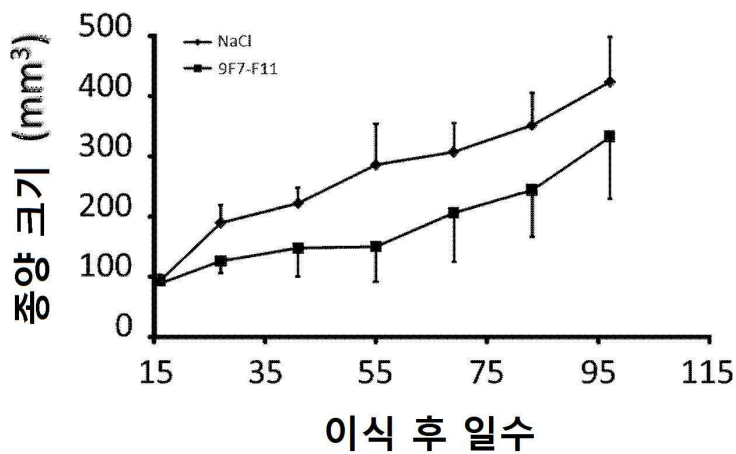
도면8



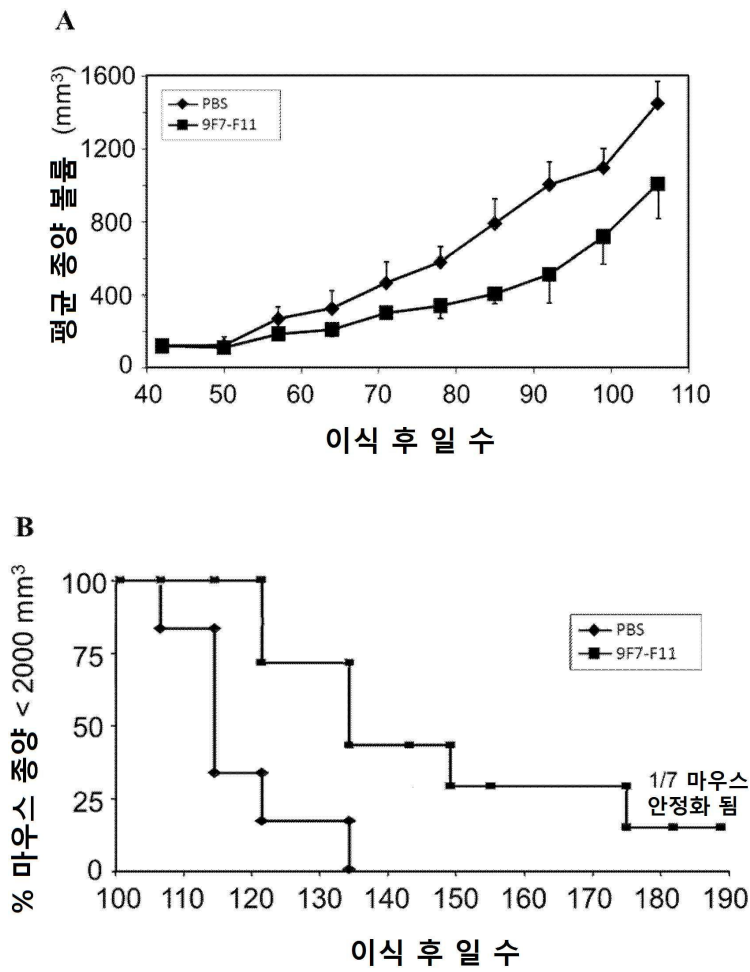
도면9



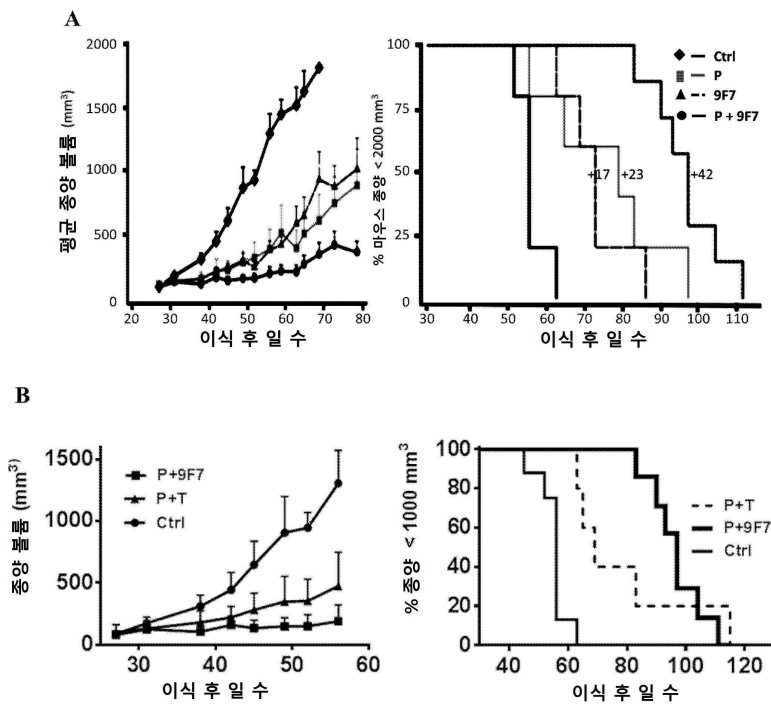
도면10



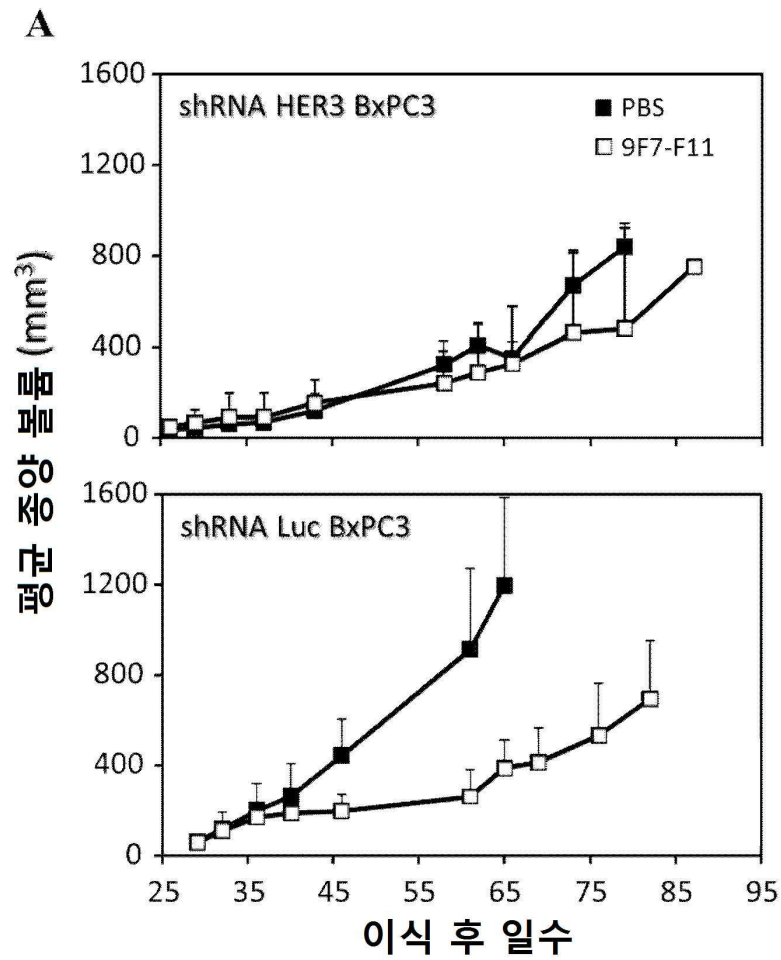
도면11



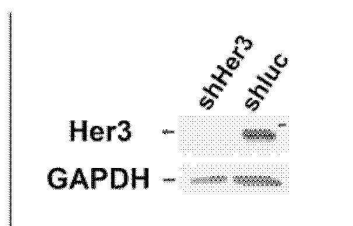
도면12



도면13



**B**



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)  
UNIVERSITE DE MONTPELLIER  
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE MONTPELLIER
- <120> NEUREGULIN-NON COMPETITIVE ALLOSTERIC ANTI-HUMAN HER3 ANTIBODIES  
AND USES THEREOF

<130> IP20162974FR

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Ile Ser Asp Gly Gly Gly Val Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ala Arg Asp Arg Tyr Gly Leu Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Asn Val Gly Ile Ala

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Ala Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

gaagtgaagc tggctggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatatc attagtgatg gtggtggtgt cacctactat	180
ccagacacta taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagagatagg	300
tacggctctct ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a	351

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
atcacctgca aggccagtc gaattgtgggt attgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatccaatc ggtacactgg agtcctgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tatgcagtct	240
gaagacctgg cagattatct ctgccagcaa tatagcaact atccgtacac gtccggaggg	300
gggaccaagc tgaataaaaa c	321