



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0080371  
(43) 공개일자 2018년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*C07K 16/22* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/32* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 39/3955* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7019133(분할)

(22) 출원일자(국제) 2005년06월15일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2017-7034117

원출원일자(국제) 2005년06월15일

심사청구일자 2017년12월26일

(85) 번역문제출일자 2018년07월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/021287

(87) 국제공개번호 WO 2006/078307

국제공개일자 2006년07월27일

(30) 우선권주장

60/645,697 2005년01월21일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 임크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자

알리슨, 레이비드 이

미국 94403 캘리포니아주 샌 마테오 이스트우드 드라이브 26

브루노, 르네

프랑스 에프-13013 마르세유 쉬맹 테 그리브 84 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 HER 항체의 고정 용량 투여법

**(57) 요약**

본 발명은 HER 항체, 예컨대 페르투주마브(pertuzumab)의 고정 용량 투여법에 관한 것이다.

**대 표 도**

(52) CPC특허분류

*A61K 39/39558* (2013.01)

*C07K 16/22* (2013.01)

*C07K 16/2863* (2013.01)

*C07K 16/32* (2013.01)

*A61K 2039/545* (2013.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

(72) 발명자

**루, 지안-페**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 안드로메다

레인 842

**엔쥐, 치 엠.**

미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 콜럼비아 드라

이브 741

**명세서****청구범위****청구항 1**

고정 용량의 HER2 항체를 포함하고, 고정 용량이 HER2 항체 420 mg이며, HER2 항체가 각각 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인, 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, HER2 항체가 네이키드(naked) 항체인 제약 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, HER2 항체가 비손상 항체인 제약 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, HER2 항체가 항원 결합 영역을 포함하는 항체 단편인 제약 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, HER2 항체가 인간화 또는 인간 IgG1 항체인 제약 조성물.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 암이 HER 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는 것인 제약 조성물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 암이 난소암, 복막암 또는 난관암인 제약 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 암이 전이성 유방암 (MBC)인 제약 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 암이 비-소세포 폐암 (NSCLC)인 제약 조성물.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 암이 전립선암인 제약 조성물.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 암이 직장결장암인 제약 조성물.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 제2 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제, 상이한 HER 항체, 상이한 종양 관련 항원에 대해 지정된 항체, 항-호르몬 화합물, 심장보호제, 시토킨, EGFR-표적화 약물, 항-혈관형성제, 티로신 키나제 억제제, COX 억제제, 비-스테로이드성 항-염증성 약물, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 종양태아성 단백질 CA125에 결합하는 항체, HER2 백신, 또 다른 HER 표적화 요법, Raf 또는 ras 억제제, 독소루비신 HCL 리포좀 주사, 토포테칸, 탁산, 이 중 티로신 키나제 억제제, TLK286, EMD-7200, 구역질을 치료하는 의약, 피부 발진을 예방 또는 치료하는 의약 또는 표준 여드름 요법, 체온-감소 의약, 및 조혈 성장 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제인 제약 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 화학요법제가 항대사물 화학요법제인 제약 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 항대사물 화학요법제가 겹시타빈인 제약 조성물.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 제2 치료제가 트라스투주마브인 제약 조성물.

#### 청구항 18

420 mg의 페르투주마브 고정 용량을 포함하는, 인간 환자의 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 암이 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암, 및 직장결장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 20

420 mg의 페르투주마브 고정 용량을 함유한 바이알을 포함하는, 암을 치료하기 위한 제품.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 고정 용량을 암 환자에게 투여하도록 사용자에게 지시하는 패키지 사용 설명서를 추가로 포함하는 제품.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 암이 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암, 및 직장결장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제품.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 상기 패키지 사용 설명서가 사용자에게 HER 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는 암 환자에게 고정 용량을 투여하도록 추가로 지시하는 제품.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

##### 관련 출원

[0001] 본원은 2005년 1월 21일자로 제출된 가출원 제60/645,697호 (이의 발명은 참고로 본원에 포함됨)를 35 USC § 119(e)하에서 우선권으로 주장하며 37 CFR 1.53(b)하에 제출된 출원이다.

[0003] 본 발명은 HER 항체, 예컨대 페르투주마브(pertuzumab)의 고정 용량 투여법에 관한 것이다.

### 배경 기술

##### HER 수용체 및 이에 대한 항체

[0005] 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.

[0006] *erbB1* 유전자에 의해 코딩되는 EGFR은 인과적으로 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.

[0007] 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)]; [Zhau 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)]).

[0008] 래트 p185<sup>neu</sup> 및 인간 HER2 단백질 생성물에 대해 지정된 항체가 기재되었다.

[0009] 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.

[0010] 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 수득하였다. 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)]; [Slawikowski 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.

- [0011] 뮤린 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.
- [0012] 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.
- [0013] 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.
- [0014] HER 수용체는 일반적으로 세포 내의 다양한 배합물에서 발견되며, 이종이량체화는 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- $\alpha$ ), 암피레귤린, 혼파린 결합 표피 성장 인자 (HB-EGF), 베타셀룰린 및 에피레귤린 (문헌 [Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]). 단일 유전자의 별도의 스플라이싱으로부터 초래되는 혼레귤린 단백질의 족은 HER3 및 HER4에 대한 리간드이다. 혼레귤린 족은 알파, 베타 및 감마 혼레귤린 (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 보고된 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.
- [0015] EGF 및 TGF- $\alpha$ 는 HER2에 결합하지 않는 반면, EGF는 EGFR 및 HER2를 자극하여 이종이량체를 형성하고, 이는 EGFR을 활성화시키며 이종이량체 내의 HER2의 인산전달을 초래한다. 이량체화 및/또는 인산전달은 HER2 티로신 카나제를 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, 혼레귤린 (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)]).
- [0016] HER 항체에 관한 특허 출원은 하기를 포함한다: US 5,677,171, US 5,720,937, US 5,720,954, US 5,725,856, US 5,770,195, US 5,772,997, US 6,165,464, US 6,387,371, US 6,399,063, US 2002/0192211 A1, US 6,015,567, US 6,333,169, US 4,968,603, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213, US 6,719,971, US 6,800,738, US 2004/0236078 A1, US 5,648,237, US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,515, WO 98/17797, US 6,127,526, US 6,333,398, US 6,797,814, US 6,339,142, US 6,417,335, US 6,489,447, WO 99/31140, US 2003/0147884 A1, US 2003/0170234 A1, US 2005/0002928 A1, US 6,573,043, US 2003/0152987 A1, WO

99/48527, US 2002/0141993 A1, WO 01/00245, US 2003/0086924, US 2004/0013667 A1, WO 00/69460, WO 01/00238, WO 01/15730, US 6,627,196 B1, US 6,632,979 B1, WO 01/00244, US 2002/0090662 A1, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 04/24866, US 2004/0082047, US 2003/0175845 A1, WO 03/087131, US 2003/0228663, WO 2004/008099 A2, US 2004/0106161, WO 2004/048525, US 2004/0258685 A1, US 5,985,553, US 5,747,261, US 4,935,341, US 5,401,638, US 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, US 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527 A1, WO 91/02062, US 5,571,894, US 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, US 5,288,477, US 5,514,554, US 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5,856,089, WO 94/22478, US 5,910,486, US 6,028,059, WO 96/07321, US 5,804,396, US 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, US 5,783,404, US 5,977,322, US 6,512,097, WO 97/00271, US 6,270,765, US 6,395,272, US 5,837,243, WO 96/40789, US 5,783,186, US 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6,214,388, US 5,925,519, WO 98/02463, US 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5,994,071, WO 98/45479, US 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO 02/05791, WO 02/11677, US 6,582,919, US 2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO 03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5,705,157, US 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 및 WO 03/86467.

#### **[0017] 진단**

HER2 과발현/증폭을 기초로 하는 치료법에 대해 HER2 항체인 트라스투주마브로 치료되는 환자를 선별한다. 예를 들어, WO 99/31140 (페이튼과 동료들(Paton *et al.*)), US 2003/0170234 A1 (헬만, 에스.(Hellmann, S.)), 및 US 2003/0147884 (페이튼과 동료들); 뿐만 아니라 WO 01/89566, US 2002/0064785 및 US 2003/0134344 (마스와 동료들(Mass *et al.*))를 참조한다. 또한, HER2 과발현 및 증폭을 검출하기 위한 면역조직화학 (IHC) 및 형광 계내 혼성화 (FISH)에 관한 문헌 [US 2003/0152987, Cohen *et al.*]을 참조한다.

문헌 [WO 2004/053497 (Bacus *et al.*)]은 헤르셉틴(등록상표) 요법에 대한 반응을 측정하거나 예측하는 것에 관한 것이다. 문헌 [US 2004/013297 A1 (Bacus *et al.*)]은 ABX0303 EGFR 항체에 대한 반응을 측정하거나 예측하는 것에 관한 것이다. 문헌 [WO 2004/000094 (Bacus *et al.*)]은 EGFR-HER2 티로신 키나제 억제제인 소분자의 GW572016에 대한 반응을 측정하는 것에 관한 것이다. 문헌 [WO 2004/063709, Amler *et al.*]은 EGFR 억제제인 에를로티니브 HC1에 대한 감수성을 측정하는 생마커 및 방법에 관한 것이다. 문헌 [US 2004/0209290, Cobleigh *et al.*]은 유방암 예후에 대한 유전자 발현 마커에 관한 것이다.

HER 활성화 또는 이량체화를 기초로 하는 치료법에 대해 페르투주마브로 치료하는 환자를 선별할 수 있다. 페르투주마브 및 이로 치료하기 위한 환자의 선별에 관한 특허 출원은 하기를 포함한다: WO 01/00245 (아담스와 동료들(Adams *et al.*)); US 2003/0086924 (슬리우코우스키, 엠.(Sliwkowski, M.)); US 2004/0013667 A1 (슬리우코우스키, 엠.); 뿐만 아니라 WO 2004/008099 A2 및 US 2004/0106161 (보센마이어와 동료들(Bossenmaier *et al.*)).

문헌 [Cronin *et al.*, *Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004)]에는 저장성 파라핀-포매 조직에서의 유전자 발현의 측정이 기재되어 있다. 문헌 [Ma *et al.*, *Cancer Cell* 5:607-616 (2004)]에는 저장되는 1차 생검으로부터 적출된 종양-조직 절편으로부터 단리된 RNA를 사용하는 유전자 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이에 의한 유전자 프로파일이 기재되어 있다.

#### **[0022] 항암 약물 및 HER 항체의 용량 투여법**

항암 약물의 용량 투여법을 논의한 논문은 하기를 포함한다: 문헌 [Egorin, M. *J Clin Oncol* 2003; 21:182-3 (2003)]; [Baker *et al.* *J Natl Cancer Inst* 94:1883-8 (2002)]; [Felici *et al.* *Eur J Cancer* 38:1677-84 (2002)]; [Loos *et al.* *Clin. Cancer Res.* 6:2685-9 (2000)]; [de Jongh *et al.* *J. Clin Oncol.* 19:3733-9 (2001)]; [Mathijssen *et al.* *J. Clin Oncol.* 20:81-7 (2002)]; 및 [de Jong *et al.* *Clin Cancer Res*

10:4068-71 (2004)].

[0024] 전형적으로, 시판되는 인간화 IgG 모노클로날 항체 (즉, 미국 사우쓰 샌 프란시스코 소재의 제넨테크 인크.(Genentech Inc.)사의 트라스투주마브 및 베바시주마브(Bevacizumab) 및 미국 필라델피아 소재의 웨이쓰 파마슈티칼즈(Wyeth Pharmaceuticals)사의 겨투주마브 오조고미신(gemtuzumab ozogamicin)), 및 종양학의 세포독성 소분자 약물을 체중-기준 (mg/kg) 또는 신체 표면적-기준 (BSA) 용량 투여법으로 투여한다.

[0025] 세툭시마브(Cetuximab) (에르비툭스(ERBITUX)(등록상표))는 EGF 수용체에 결합하여 직장결장암의 치료법으로 승인된 항체이다. 직장결장암에서, 세툭시마브 400 mg/m<sup>2</sup>가 2시간에 걸친 정맥내 주입에 의한 부하 용량으로 주어진다. 후속적으로 1시간에 걸쳐 주어지는 250 mg/m<sup>2</sup>의 유지 용량을 1주 1회 투여한다. 세툭시마브 규정 정보를 참조한다.

[0026] 트라스투주마브 (헤르셉틴(등록상표))를 전이성 유방암에 걸린 환자에게 4 mg/kg 부하 용량에 이어서 1주일에 2 mg/kg 용량으로 투여한다. 트라스투주마브 규정 정보를 참조한다.

[0027] 또한, 트라스투주마브 용량 투여법에 관한 WO 99/31140; US 2003/0147884 A1; US 2003/0170234 A1; US 2005/0002928 A1; WO 00/69460; WO 01/15730 및 US 6,627,196 B1를 참조한다.

[0028] 페르투주마브 (또한, 재조합 인간 모노클로날 항체 2C4로 공지됨; 미국 사우쓰 샌 프란시스코 소재의 제넨테크, 인크.사의 옴니타르그(OMNITARG)(상표명))는 HER 이량체화 억제제 (HDI)로 공지된 작용제의 신규 부류로 최초로 나타났고, HER2가 다른 HER 수용체 (예컨대 EGFR/HER1, HER3 및 HER4)와 함께 활성 이종이량체를 형성하는 것을 억제하는 작용을 하며, HER2 발현 수준에 상관없이 활성화이다. 예를 들어, 문헌 [Harari and Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000)]; [Yarden and Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001)]; [Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003)]; [Cho et al. Nature 421:756-60 (2003)]; 및 [Malik et al. Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003)]를 참조한다.

[0029] 종양 세포에서 HER2-HER3 이종이량체 형성의 페르투주마브 차단은 중요한 세포 신호전달을 억제하는 것을 입증하며, 이는 종양 증식 및 생존을 감소시킨다 (문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-37 (2002)]).

[0030] 페르투주마브는 단일 제제로서 진행암에 걸린 환자에서 Ia기 시험 및 난소암 및 유방암 뿐만 아니라, 폐암 및 전립선암에 걸린 환자에서 II기 시험으로 임상적으로 시험하였다. I상 연구에서, 표준 치료 동안 또는 후에 진행되는 불치성, 국소 진행성, 재발성 또는 전이성 고형 종양을 갖는 환자를 3주마다 정맥 주사로 주어지는 페르투주마브로 치료하였다. 페르투부마브는 일반적으로 관용성이다. 종양 퇴보는 반응에 대해 평가할 수 있는 20명의 환자 중 3명에서 달성되었다. 2명의 환자는 부분 반응을 확인하였다. 2.5개월 초과 동안 지속하는 적합한 질환은 21명의 환자 중 6명에서 관찰되었다 (문헌 [Agus et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:192 (2003)]). 2.0 내지 15 mg/kg의 용량에서, 페르투주마브의 약동학은 선형이며, 2.69 내지 3.74 mL/일/kg에 이르는 평균 제거율 및 15.3일 내지 27.6일에 이르는 평균 말단 제거 반감기이다. 페르투주마브에 대한 항체는 검출되지 않았다 (문헌 [Allison et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:197 (2003)])). 페르투주마브는 I상 시험에서 체중-기준 (mg/kg)으로 투여하였다. II기 시험은 고정-용량을 이용하여 개시하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

#### 발명의 요약

[0032] 본 발명은 약동학 및 표적 약물 농도에 대한 인간화 IgG1 모노클로날 항체의 고정 용량 투여의 효과 및 효능의 최초의 중요한 평가를 제공한다. HER 항체 페르투주마브의 이러한 분석의 제1 목적은 1) 암 환자에서 페르투부마브에 대한 집단 약동학 및 예측 공변수를 평가하는 것, 및 2) 고정 용량 또는 체중-기준 용량 및 신체 표면적 (BSA)-기준 용량 투여 후의 항정-상태 최저 농도 및 노출의 변이율을 조사하는 것이었다.

### 과제의 해결 수단

[0033] 따라서, 제1 국면에서, 본 발명은 하나 이상의 고정 용량의 HER 항체를 인간 환자에게 암을 치료하는데 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다.

[0034] 또 다른 국면에서, 본 발명은 페르투주마브 약 420 mg, 약 525 mg, 약 840 mg 및 약 1050 mg으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고정 용량의 페르투주마브를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 환자에서의

암의 치료 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명은 또한 HER 항체 약 420 mg, 약 525 mg, 약 840 mg 및 약 1050 mg으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고정 용량의 HER 항체를 함유한 바이알을 포함하는 제품에 관한 것이다.

### 발명의 효과

[0036] \*\*

### 도면의 간단한 설명

[0037] 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 κ1, 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 및 중쇄의 아미노산 서열 (각각, 서열 13 및 14)을 나타낸다. CDR은 볼드체로 나타낸다. 경쇄 및 중쇄의 계산된 분자량은 23,526.22 Da 및 49,216.56 Da이다 (환원 형태의 시스테인). 탄수화물 잔기는 중쇄의 Asn 299에 부착되어 있다.

도 4는 HER2의 이종이량체 결합 부위에서의 2C4의 결합, 및 그로 의한 활성화된 EGFR 또는 HER3와의 이종이량체화의 방지를 개략적으로 나타낸다.

도 5는 MAPK 및 Akt 경로에 대한 HER2/HER3의 커플링을 나타낸다.

도 6은 트라스투주마브와 페르투주마브의 다양한 활성을 비교한다.

도 7a 및 7b는 각각 트라스투주마브 경쇄 (도 7a; 서열 15) 및 중쇄 (도 7b; 서열 16)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8a 및 8b는 각각 변이체 페르투주마브 경쇄 서열 (도 8a; 서열 17) 및 변이체 페르투주마브 중쇄 서열 (도 8b; 서열 18)을 나타낸다.

도 9a 및 9b는 제1- (도 9a) 또는 제2- (도 9b) 구획 모델에 의해 피팅된 단일 대상체의 PK 데이터의 대표적인 프로파일이다. 흰원은 측정된 농도를 나타낸다. 실선 및 점선은 각각 집단 예측 농도 및 개별 예측 농도를 나타낸다.

도 10a 및 10b는 모델 진단 플롯을 나타낸다. 도 10a는 측정된 페르투주마브 농도 대 예측된 페르투주마브 농도를 나타낸다. 실선은 단일선이다. 도 10b는 각종 잔여치 대 예측된 페르투주마브 농도를 나타낸다. 점선은 데이터의 평활 회스(LOESS)이다.

도 11a 및 11b는 기저 모델 (도 11a) 및 최종 모델 (도 11b)에 대하여 체중에 의한 제거율 (CL)에 대한 무작위 효과 (h) 및 신체 표면적 (BSA)에 의한 중심 구획 ( $V_c$ )에서의 부피를 나타낸다.

도 12a 내지 12f는 사후 모델 확인을 이용하는 페르투주마브 최종 집단 약동학 모델의 모델 평가를 나타낸다. 검정 통계에 대한 사후 예측 분포 및 측정치: 도 12a - 2.5번짜; 도 12b - 5번짜; 도 12c- 50번짜, 도 12d - 90번짜, 도 12e - 95번짜, 도 12f - 97.5번짜. 각 막대 그래프에 대한 수직선은 검정 통계의 측정치를 나타낸다.

도 13은 최종 모델에 따른 원래 약동학 (PK)으로부터의 부트스트랩(bootstrapp)된 1000명의 모의 대상체에 대한 고정 투여, 체중(WT)-기준 투여 또는 BSA-기준 용량 투여 후의 예측된 페르투주마브 항정 상태 최저 농도 (제84 일)를 나타낸다.

도 14a 및 14b는 10번짜 (50.4 kg) WT 값 이하 (도 14a) 또는 90번짜 (88.5 kg) (도 14b) WT 값 이상의 환자에 대한 고정 투여, 체중(WT)-기준 투여 또는 BSA-기준 용량 투여 후의 예측된 페르투주마브 항정 상태 최저 농도

(제84일)를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### I. 정의

##### [0038]

본원에서 치료제의 "고정" 또는 "균일" 용량은 환자의 체중 (WT) 또는 신체 표면적 (BSA)에 관계없이 인간 환자에게 투여되는 용량을 나타낸다. 따라서, 고정 또는 균일 용량은 mg/kg 용량 또는 mg/m<sup>2</sup> 용량으로 나타내지 않으며, 오히려 치료제의 절대량으로 나타낸다.

##### [0040]

본원에서 "부하" 용량은 일반적으로 환자에게 투여하는 치료제의 개시 용량을 포함하며, 이어서 이의 하나 이상의 유지 용량을 포함한다. 일반적으로 단일 부하 용량을 투여하나, 본원에서는 다중 부하 용량이 고려된다. 통상적으로, 투여되는 부하 용량의 양이 투여되는 유지 용량의 양을 초과하고/하거나 부하 용량이 유지 용량보다 더 자주 투여되어 유지 용량으로 달성할 수 있는 것보다 더 일찍 치료제의 원하는 항정-상태 농도를 달성한다.

##### [0041]

본원에서 "유지" 용량은 치료 기간에 걸쳐 환자에게 투여되는 치료제의 하나 이상의 용량을 나타낸다. 통상적으로 유지 용량은 시간차 치료 간격, 예컨대 대략 매주마다, 대략 2주마다, 대략 3주마다, 또는 대략 4주마다 투여한다.

##### [0042]

"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.

##### [0043]

"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 나타낸다. erbB1은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 나타낸다.

##### [0044]

"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 나타낸다. "erbB2"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 지칭하며, "neu"는 p185<sup>neu</sup>를 코딩하는 유전자를 나타낸다. 바람직한 HER2는 천연 서열 인간 HER2이다.

##### [0045]

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.

##### [0046]

"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 나타낸다.

##### [0047]

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 나타낸다.

##### [0048]

"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-α) ([Marquardt et al., *Science* 223:1079-1082 (1984)]); 신경초종 또는 각질세포 자가 분비 성장 인자로도 알려진 암피레귤린 ([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)]; 혼파린-결합 표피 성장 인자 (HB-EGF) ([Higashiyama et al., *Science* 251:936-939 (1991)]; 에피레귤린 ([Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995)]; 및 [Komurasaki et al., *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)]); 혼레귤린 (하기 참조); 뉴레귤린-2 (NRG-2) ([Carraway et al., *Nature* 387:512-516 (1997)]); 뉴레귤린-3 (NRG-3) ([Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)]); 뉴레귤린-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- $\alpha$ , 암페레귤린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 혼파린을 들 수 있다. HER3에 결합하는 HER 리간드로는 혼레귤린을 들 수 있다. HER4에 결합할 수 있는 HER 리간드로는 베타셀룰린, 혼파린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 및 혼레귤린을 들 수 있다.

[0049]

본원에서 사용될 경우 "혼레귤린" (HRG)은 미국 특허 제5,641,869호 또는 문헌 [Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]에 개시된 바와 같은 혼레귤린 유전자 생성물에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 나타낸다. 혼레귤린의 예로는 혼레귤린- $\alpha$ , 혼레귤린- $\beta$ 1, 혼레귤린- $\beta$ 2 및 혼레귤린- $\beta$ 3 (문헌 [Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)]; 및 미국 특허 제5,641,869호); neu 분화 인자 (NDF) ([Peles et al., *CeII* 69:205-216 (1992)]); 아세틸콜린 수용체-유도 활성 (ARIA) ([Fallas et al., *CeII* 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)]);  $\gamma$ -혼레귤린 ([Schaefer et al., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)])을 들 수 있다.

[0050]

본원에서 "HER 이량체"는 2개 이상의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유 회합된 이량체이다. 이러한 복합체는 예를 들어 문헌 [Slivkowski 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 단리하고, SDS-PAGE에 의해 분석할 경우 형성될 수 있다. 이러한 HER 이량체의 예로는 EGFR- HER2, HER2-HER3 및 HER3-HER4 이종이량체를 들 수 있다. 더욱이, HER 이량체는 HER3, HER4 또는 EGFR과 같은 상이한 HER 수용체와 조합된 2개 이상의 HER2 수용체를 포함할 수 있다. 시토킨 수용체 서브유닛 (예를 들어 gp130)과 같은 다른 단백질은 이량체와 회합될 수 있다.

[0051]

"HER 억제제"는 HER 활성화 또는 기능을 방해하는 작용제이다. HER 억제제의 예는 HER 항체 (예, EGFR, HER2, HER3 또는 HER4 항체); EGFR-표적화 약물; 소분자 HER 길항제; HER 티로신 키나제 억제제; HER2 및 EGFR 이종 티로신 키나제 억제제, 예컨대 라파타니브(lapatinib)/GW572016; 안티센스 분자 (예를 들어, WO 2004/87207 참조); 및/또는 하류 신호전달 분자에 결합하거나 이의 기능을 방해하는 작용제, 예컨대 MAPK 또는 Akt (도 5 참조)를 포함한다. 바람직하게는, HER 억제제는 HER 수용체에 결합하는 항체 또는 소분자이다.

[0052]

"HER 항체"는 HER 수용체에 결합하는 항체이다. 임의로, HER 항체는 추가로 HER 활성화 또는 기능을 방해한다. 바람직하게는, HER 항체는 HER2 수용체에 결합하는 항체이다. 본원에서 특히 관심있는 HER2 항체는 페르투주마브이다. HER2 항체의 또 다른 예는 트라스투주마브이다. EGFR 항체의 예는 세툭시마브 및 ABX0303을 포함한다.

[0053]

"HER 활성화" 또는 "HER2 활성화"는 임의의 하나 이상의 HER 수용체 또는 HER2 수용체의 활성화 또는 인산화를 나타낸다. 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. 예를 들어, 도 5를 참조한다.

[0054]

"인산화"는 HER 수용체 또는 이의 기질과 같은 단백질에 하나 이상의 포스페이트 기(들)의 첨가를 나타낸다.

[0055]

"HER 이량체화를 억제하는" 항체는 HER 이량체 형성을 억제하거나 방해하는 항체이다. 바람직하게는, 이러한 항체는 HER2의 이종이량체 결합 부위에서 HER2와 결합한다. 본원에서 가장 바람직한 이량체화 억제 항체는 페르투주마브 또는 Mab 2C4이다. 2C4의 HER2 이종이량체 결합 부위로의 결합은 도 4에 나타낸다. HER 이량체화를 억제하는 항체의 다른 예는, EGFR와 결합하며 이의 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이량체화를 억제하는 항체 (예를 들어, EGFR 모노클로날 항체 806, 즉 활성화된 또는 "속박되지 않은" EGFR에 결합하는 Mab 806; 문헌 [Johns et al., *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)] 참조); HER3에 결합하며 이의 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이량체화를 억제하는 항체; 및 HER4에 결합하며 이의 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이

량체화를 억제하는 항체를 포함한다.

- [0056] "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 뮤린 모노클로날 항체 2C4, 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 Fab 단편, 비손상 폐르투주마브 및 폐르투주마브의 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  $\alpha$ -의 존성 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).
- [0057] 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 나타낸다. 상기 영역은 HER2의 도메인 II에서 발견된다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).
- [0058] HER2 항체는 트라스주마브보다 효과적으로 "HRG-의 존성 AKT 인산화를 억제"할 수 있고/거나 "HRG- 또는 TGF  $\alpha$ -의 존성 MAPK 인산화"를 억제할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 참조).
- [0059] HER2 항체는 "HER2 엑토도메인(ecto도메인) 절단을 억제하지 않는" 것일 수 있다 (문헌 [Molina et al. *Cancer Res.* 61:4744-4749 (2001)]).
- [0060] HER2의 "이종이량체 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 이종이량체의 형성을 일정 정도 이상으로 입체 장해할 수 있다. 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]은 RCSB 단백질 데이터 맹크 (ID 코드 IS78)에 기탁된 HER2-폐르투주마브 결정 구조를 특성화하면서, HER2의 이종이량체 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 설명한다.
- [0061] 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 연접부에 결합한다.
- [0062] "원래 서열" 폴리펩티드는 천연 유래 폴리펩티드 (예, HER 수용체 또는 HER 리간드)로서 동일한 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 이러한 천연 서열 폴리펩티드는 천연으로부터 단리할 수 있거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조할 수 있다. 이와 같이, 천연 서열 폴리펩티드는 천연 발생 인간 폴리펩티드, 뮤린 폴리펩티드, 또는 임의의 다른 포유동물 종 유래의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0063] 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 포함한다.
- [0064] 본원에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단을 포함하는 개별 항체는, 모노클로날 항체의 생성 동안 발생할 수 있으며 일반적으로 보다 적은 양으로 존재하는 가능한 변이체를 제외하고 동일하고/하거나, 동일한 에피토프(들)에 결합한다. 이러한 모노클로날 항

체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드의 선별을 포함하는 방법에 의해 수득된다. 예를 들어, 선별 방법은 다수의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀(pool)로부터의 유일한 클론의 선별일 수 있다. 예를 들어, 표적에 대한 친화도를 향상시키고, 표적 결합 서열을 인간화시키고, 세포 배양에서 클론의 생성을 향상시키고, 생체내에서 클론의 면역원성을 감소시키고, 다중특이성 항체를 생성시키는 것 등을 위하여 선별 표적 결합 서열을 추가로 변형시킬 수 있으며, 변형된 표적 결합 서열을 포함하는 항체가 또한 본 발명의 항체임을 이해해야 한다. 상이한 결정자(에피토프)에 대해 지정된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제조물에 비해, 모노클로날 항체 제조물의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다. 그의 특이성 이외에, 모노클로날 항체 제조물은 다른 이뮤노글로불린에 의해 전형적으로 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, 예를 들어 하이브리도마 방법(예, 문헌 [Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]; [Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법(예, 미국 특허 제4,816,567호 참조), 파지 디스플레이 기술(예, 문헌 [Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)]; [Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]; [Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 338(2):299-310 (2004)]; [Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 340(5):1073-1093 (2004)]; [Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)]; 및 [Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 좌위, 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전체를 가진 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성시키는 기술(예, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,591,669호(출원인이 모두 젠팜(GenPharm)); 미국 특허 제5,545,807호; WO 1997/17852; 미국 특허 제5,545,807호; 동 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 및 동 제5,661,016호; 문헌 [Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994)]; [Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0065]

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, 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 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.

[0066]

"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.

[0067]

본원에서 "비손상 항체"는 2개의 항원-결합 가변 영역, 및 Fc 영역을 포함하는 항체이다. 바람직하게는, 비손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0068]

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 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 지정된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있다.

[0069]

항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기여 가능한 생물학적 활성을 나타낸다. 항체 이펙터 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.

[0070] "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 나타낸다. ADCC를 매개하기 위한 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심의 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 동 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 관심의 분자의 ADCC 활성을 예를 들어 문헌 [Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가될 수 있다.

[0071] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하며 ADCC 이펙터 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. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 단리될 수 있다.

[0072] "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 γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체, 및 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 별법으로 스플라이싱된 형태를 들 수 있다. Fc γ RII 수용체로는 유사한 아미노산 서열을 갖지만 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한, Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 들 수 있다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (검토를 위해 문헌 [M. in Daeron, *Ann. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]을 참조한다). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Ann. 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 담당하고 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. (문헌 [Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).

[0073] "상보적 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 상보체의 존재하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 나타낸다. 상보적 활성화 경로는 상보체 시스템 (Clq)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.

[0074] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종 사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디슬퍼드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디슬퍼드 결합의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄내 디슬퍼드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 많은 불변 도메인에 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.

[0075] "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 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된  $\beta$ -쉬트 형태를 크게 채택하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각각의 쇄의 초가변 영역은 다른 쇄로부터의 초가변 영역과 함께 FR에 의해 가까이 근접하여 함께 수용되어 항체의 항원-결

합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> 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 이펙터 기능을 나타낸다.

[0076] 본원에서 사용될 경우 "초가변 영역"이라는 용어는 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 초가변 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*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "초가변 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 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0077] 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. 웨신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교시킬 수 있는  $F(ab')_2$  단편을 생성한다.

[0078] "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 초가변 영역이 상호작용하여  $V_H-V_L$  이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정하는 상기 형태이다. 집합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 낮은 친화도이기는 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.

[0079] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 헌지 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 지침이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 원래 그들 사이에 헌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.

[0080] 임의의 척추동물 종으로부터의 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.

[0081] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 상기 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄에 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.

[0082] "디아바디"라는 용어는 동일한 폴리펩티드 쇄 ( $V_H - V_L$ ) 내의 가변 경쇄 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 가변 중쇄 도메인 ( $V_H$ )을 포함하는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타낸다. 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 지을 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 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.

[0083] 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역으로부터의 잔기가, 목적하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 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 공여

자 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 그것을 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.

- [0084] 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 트拉斯투주마브 (헤르셉틴(등록상표)); 본원에 기재된 바와 같은 인간화 520C9 (WO 93/21319) 및 인간화 2C4 항체를 들 수 있다.
- [0085] 본원의 목적을 위해, "트拉斯투주마브," "헤르셉틴(등록상표)" 및 "huMAb4D5-8"은 각각 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 나타낸다.
- [0086] 본원에서, "페르투주마브," "옴니타르그(상표명)" 및 "rhuMAb 2C4"는 각각 서열 13 및 14의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 나타낸다.
- [0087] 트拉斯투주마브와 페르투주마브 기능의 차이는 도 6에 예시되어 있다.
- [0088] "네이키드(naked) 항체"는 세포독성 잔기 또는 방사성표지와 같은 이종 분자와 컨쥬게이션되지 않은 항체이다.
- [0089] "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 캠 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 제조합 세포 내의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0090] "친화도 성숙된" 항체는, 변형(들)을 함유하지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 향상시킨, 하나 이상의 다변이 영역에서 하나 이상의 변형을 함유한 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화도 성숙이 기재되어 있다. 문헌 [Barbas et al. *Proc Natl. Acad. Sci., USA* 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)]에는 CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이가 기재되어 있다.
- [0091] 본원에서 "주요종 항체"라는 용어는 조성물 중에 양적으로 우세한 항체 분자인, 조성물 중의 항체 아미노산 서열 구조를 나타낸다. 바람직하게는, 주요종 항체는 HER2의 도메인 II에 결합하는 항체, HER 이량체화를 트拉斯투주마브보다 효과적으로 억제하는 항체, 및/또는 HER2의 이종이량체 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 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것 (페르투주마브)이다.
- [0092] 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 리더 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 경

쇄 상에 아미노-말단 리더 연장물을 포함하며, 임의로 주요종 항체에 대해 다른 아미노산 서열 및/또는 글리코실화 차이를 추가로 포함하는 항체이다.

[0093] 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.

[0094] 항체가 Fc 영역을 가질 경우, 본원에서 도 9에 나타낸 것과 같은 올리고당류 구조는 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에, 예를 들어 잔기 299 (298, 잔기의 Eu 넘버링)에 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.

[0095] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 "G1 올리고당류 구조"는 G1(1-6) 및 G1(1-3) 구조를 포함한다.

[0096] 본원에서 "아미노-말단 리더 연장물"은 항체의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에 존재하는 아미노-말단 리더 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 나타낸다. 예시적인 아미노-말단 리더 연장물은 항체 변이체의 경쇄 하나 또는 둘다 상에 존재하는 3개의 아미노산 잔기, VHS를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0097] "탈아미드화된" 항체는 그의 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 예를 들어 아스파르트산, 숙신이미드 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.

[0098] "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), 중피종, 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 세포암), 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장관암을 비롯한 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암 (전이성 유방암 포함), 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.

[0099] 본원에서, "환자"는 인간 환자이다. 환자는 "암 환자", 즉 하나 이상의 암 증상으로 앓고 있거나 이러한 위험이 있는 환자, 또는 HER 항체를 사용하는 치료법으로부터 이익을 얻을 수 있는 다른 환자일 수 있다.

[0100] "생물학적 샘플"은 일반적으로 생물학적 공급원으로부터 유래된 세포 또는 조직인 샘플을 나타낸다.

[0101] "환자 샘플"은 암 환자와 같은 환자로부터 수득되는 샘플을 나타낸다.

[0102] 본원에서 "종양 샘플"은 환자의 종양으로부터 유래된 샘플, 또는 환자의 종양으로부터의 종양 세포를 포함하는 샘플이다. 본원에서 종양 샘플의 예는 종양으로부터 유래되거나 종양-유사 특성을 나타내는 종양 생검, 순환 종양 세포, 순환 혈장 단백질, 복수, 일차 세포 배양 또는 세포주, 뿐만 아니라 보존된 종양 샘플, 예컨대 포르말린-고정 종양 샘플, 파라핀-포매 종양 샘플 또는 동결된 종양 샘플을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0103] "고정" 종양 샘플은 고정액을 사용하여 조직학적으로 보존되는 것이다.

[0104] "포르말린-고정" 종양 샘플은 고정액으로서 포름알데히드를 사용하여 보존되는 것이다.

[0105] "포매" 종양 샘플은 단단하고 일반적으로 경질의 매질, 예컨대 파라핀, 왁스, 셀로이딘 또는 수지로 둘러싸인 것이다. 포매는 현미경 조사용 또는 조직 마이크로어레이 (TMA)의 생성용 박절편의 절단을 가능하게 한다.

[0106] "파라핀-포매" 종양 샘플은 석유로부터 유래된 고체 탄화수소의 정제된 혼합물로 둘러싸인 것이다.

[0107] 본원에서, "동결된" 종양 샘플은 동결되어진 종양 샘플을 나타낸다.

[0108] "HER 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은, 진단 시험에서, HER 수용체를 (과발현시키는 것을 포함하는) 발현하고, 증폭된 HER 유전자를 갖고/갖거나, 또한 HER 수용체의 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다. 이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, HER 인산화를 측정함으로써) 또는 간접적으로 (예를 들

어, 본원에 기재되는 바와 같은 유전자 발현 프로파일링 또는 HER 이종이량체를 검출함으로써) 측정할 수 있다.

[0109] "HER 수용체를 과발현 또는 증폭"하는 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해, 상당히 보다 높은 수준의 HER 수용체 단백질을 갖는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 유발될 수 있다. HER 수용체 과발현 또는 증폭은 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 (qRT-PCR)과 같은 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술을 통해 측정될 수 있다. 또한, HER 수용체 과발현 또는 증폭은 혈청과 같은 생물학적 유체에서 흘려진 항원 (예를 들어, HER 세포의 도메인)을 측정함으로써 연구될 수 있다 (예를 들어 1990년 6월 12일자로 허여된 미국 특허 제4,933,294호; 1991년 4월 18일자로 공개된 WO 91/05264; 1995년 3월 28일자로 허여된 미국 특허 제5,401,638 호; 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 세포에의 결합을, 예를 들어 방사성 활성에 대해 외부 스크리닝함으로써 또는 항체에 이전에 노출된 환자로부터 취해진 생검을 분석함으로써 평가할 수 있다.

[0110] 반대로, "HER2 수용체를 과발현 또는 증폭하지 않는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 정상적인 수준의 HER2 수용체보다 높게 발현하지 않는 것이다. HER 이량체화를 억제하는 항체, 예컨대 페르투주마브는 HER2 수용체를 과발현 또는 증폭하지 않는 암을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0111] 본원에서 사용될 경우 "성장 억제제"는 세포의 성장, 특히 시험관내 또는 생체내에서 HER 발현 암 세포를 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 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), 탁산, 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, oncogene, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)], 특히 제13면에서 발견할 수 있다.

[0112] "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 억제제를 SK-BR-3 세포의 항체에의 노출 후 6일에 측정했을 때 약 0.5 내지 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 트拉斯투주마브이다.

[0113] "아폽토시스"를 유도하는 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 베지를 (아폽토시스 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. 아폽토시스와 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/염색 질 응축은 저이배체 세포의 임의의 증가에 의해 평가될 수 있다. 바람직하게는, 아폽토시스를 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. 아폽토시스를 유도하는 HER2 항체의 예는 7C2 및 7F3이다.

[0114] "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 지

도화를 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 연접부에서 HER2의 세포외 도메인에 결합한다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).

[0115] "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 HER2 ECD의 전체 잔기로, 신호 웨티드를 포함하는 잔기 넘버링인 약 잔기 529 내지 약 잔기 625의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기)에 결합하는지 여부를 평가할 수 있다.

[0116] "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 HER2 ECD의 전체 잔기로, 신호 웨티드를 포함하는 잔기 넘버링인 약 잔기 22 내지 약 잔기 53의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기)에 결합하는지 여부를 확립할 수 있다.

[0117] "치료"는 치료적 치료 및 방지적 또는 예방적 수단 둘다를 나타낸다. 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.

[0118] "유효량"이라는 용어는 환자에서 질환을 치료하는데 유효한 약물의 양을 나타낸다. 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 정도 까지는, 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 증상 (예를 들어 FOSI에 의해 평가되는 바와 같음)을 개선시킬 수 있다.

[0119] "총 생존"은 진단 또는 치료의 시간으로부터 1년, 5년 등과 같은 정의된 시간의 기간 동안 살아있는 환자를 나타낸다.

[0120] "무진행 생존"은 암의 악화됨 없이 살아있는 환자를 나타낸다. "객관적 반응"은 완전 반응 (CR) 또는 부분 반응 (PR)을 포함하는, 측정가능한 반응을 나타낸다.

[0121] "완전 반응" 또는 "완전 완화"는 치료에 반응하여 암의 모든 정후가 사라지는 것을 의미한다. 이는 항상 암이 치유되었음을 의미하는 것은 아니다.

[0122] "부분 반응"은 치료에 반응하여 하나 이상의 종양 또는 병변의 크기의 감소, 또는 신체 내 암의 면적의 감소를 나타낸다.

[0123] 본원에서 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 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.

[0124] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오데파 및 시톡산(CYTOXAN(등록상표)) 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라벨라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 엘타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀

(MARINOL)(등록상표)); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히신; 베타토제신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)(등록상표)) 포함), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)(등록상표), 아세틸캄토데신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토데신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도겔레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류트레로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디인 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 네오카르지노스타틴 크로모포르 및 관련 크로모프로테인 에네디인 항생제 크로모포르), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칙티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)(등록상표), 모르풀리노-독소루비신, 시아노모르풀리노-독소루비신, 2-페롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포좀 주사 (독실(DOXIL)(등록상표)), 리포좀 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOSET)(등록상표)), 페글릴화 리포좀 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX)(등록상표)) 및 토록시독소루비신 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 메토트렉세이트, 겨시타빈 (겐자르(GEMZAR)(등록상표)), 테가푸르 (우프토랄(UFTORAL)(등록상표)), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)(등록상표)), 에포티론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토트렉세이트, 프데로프테린, 트리메트랙세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 항-아드레날린제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 루니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 웬토스타틴; 폐나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (미국 오래온주 유진에 소재하는 JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 톡신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘; 우레탄; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)(등록상표)), 파클리탁셀의 일부분-유전자조작된 나노입자 제제 (아브라간(ABRAXANE)(상표명)), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)(등록상표)); 클로란부실; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 플라티늄 제제, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 투불린 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; 류코보빈; 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)), 과미드로네이트 (아레디아(AREDIA)(등록상표)), 텔루드로네이트 (스켈리드(SKELID)(등록상표)), 또는 리세드로네이트 (액토넬(ACTONEL)(등록상표)); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 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(ATHERATOPE)(등록상표) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로벡틴(ALLOVECTIN)(등록상표) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)(등록상표) 백신, 및 백시드(VAXID)(등록상표) 백신; 토포이소메라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토데칸(LURTOTECAN)(등록상표)); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)(등록상표)); BAY439006 (소라페니브; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어 셀레콕시브 또

는 에토리콕시브), 프로테오좀 억제제 (예를 들어 PS341); 보르테조미브 (벨카드(VELCADE)(등록상표)); CCI-779; 티피파르니브 (R11577); 오라페니브, ABT510; Bcl-2 억제제, 예를 들어 오블리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)(등록상표)); 광산트론; 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, 빙크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN(상표명))을 사용한 치료 처방의 약어 폴폭스(FOLFOX)를 들 수 있다.

[0125] 또한, 상기 정의에는 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM)와 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)(등록상표) 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)(등록상표) 토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 마가세(MEGASE)(등록상표) 메게스트를 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)(등록상표) 액세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)(등록상표) 보로졸, 페마라(FEMARA)(등록상표) 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)(등록상표) 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 로프릴리드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상 세포 증식에 연관된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 상피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 유전자 요법 백신과 같은 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)(등록상표) 백신, 로벡틴(LEUVECTIN)(등록상표) 백신 및 박시드(VAXID)(등록상표) 백신; 프롤로킨(PROLEUKIN)(등록상표) rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)(등록상표) 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)(등록상표) rmRH; 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0126] "항대사물 화학요법제"는 대사물과 구조적으로 유사하나 생산적 방식으로 신체에 의해 사용될 수 없는 작용제이다. 다수의 항대사물 화학요법제는 핵산, RNA 및 DNA의 생성을 방해한다. 항대사물 화학요법제의 예는 켐시타빈 (겜자르(GEMZAR)(등록상표)), 5-플루오로우라실 (5-FU), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)(상표명)), 6-메르카프토퓨린, 메토트렉세이트, 6-티오구아닌, 페메트렉세드, 랄티트렉세드, 아라비노실시토신 ARA-C 시타라빈 (시토사르-U(CYTOSAR-U)(등록상표)), 다카르바진 (DTIC-DOME(등록상표)), 아조시토신, 데옥시시토신, 퍼리드미텐, 플루다라빈 (플루다라(FLUDARA)(등록상표)), 클라드라빈, 2-데옥시-D-글루코스 등을 포함한다. 바람직한 항대사물 화학요법제는 켐시타빈이다.

[0127] "켐시타빈" 또는 "2'-데옥시-2',2'-디플루오로시티딘 모노하이드로클로라이드 (b-이성질체)"는 항종양 활성을 나타내는 뉴클레오시드 유사체이다. 켐시타빈 HC1에 대한 실험식은 C9H11F2N3O4 · HC1이다. 켐시타빈 HC1은 상표명 쟈자르(등록상표)로 일라이 릴리(Eli Lilly)에서 판매하고 있다.

[0128] "백금-기재 화학요법제"는 분자의 통합 부분으로 백금을 함유한 유기 화합물을 포함한다. 백금-기재 화학요법제의 예는 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라티늄을 포함한다.

[0129] "백금-기재 화학요법"은 하나 이상의 백금-기재 화학요법제를 임의로 하나 이상의 다른 화학요법제와 함께 사용하는 치료법이다.

[0130] "백금 내성" 암은 암 환자가 백금-기재 화학요법 (즉, 환자는 "백금 불응성"임)을 받는 동안 진행되거나 또는 환자가 백금-기재 화학요법 치료가 완료된 후에 12개월 내에 (예를 들어 6개월 이내) 진행되는 것을 의미한다.

[0131] "항혈관신생제"는 혈관의 발달을 일정 정도로 차단하거나 방해하는 화합물을 나타낸다. 항혈관신생 인자는 예를 들어 혈관신생을 촉진하는데 관련되는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 본원에서 바람직한 항혈관신생 인자는 베바시주마브 (아바스틴(AVASTIN)(등록상표))와 같은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 결합하는 항체이다.

[0132] "시토킨"이라는 용어는 세포내 매개자로서 또 다른 세포에 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 시토킨의 예로는 램포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬을 들 수 있다. 시토킨 중에 포함되는 것은 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬, 파라갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 텔락신; 프로텔락신; 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체 호르몬 (LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토젠; 종양 괴사 인자- $\alpha$  및 - $\beta$ ; 물러리안-억제 물질; 마우스 생식선자극호르몬-관련 펩티드; 인히

빈; 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 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자를 들 수 있다. 본원에서 사용된 시토킨이라는 용어는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 시토킨의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

[0133] 본원에서 사용된 용어 "EGFR-표적화된 약물"은 EGFR에 결합하고, 임의로 EGFR 활성을 억제하는 치료제를 나타낸다. 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) (미국 특허 제4,943,533호, 멘델존(Mendelsohn)과 동료들 참조) 및 그의 변이체, 예를 들어 키메라화된 225 (C225 또는 세툭시마브; 에르부티스(ERBUTIX)(등록상표)) 및 재성형된 인간 225 (H225) (WO 96/40210, 임클론 시스템스 인크.(Imclone Systems Inc.) 참조); 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 (WO 98/50433, 아브게닉스(Abgenix) 참조); EMD 55900 (문헌 [Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)]); 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 세포독성제와 컨쥬게이션되어 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다 (예를 들어, EP 659,439 A2, 머크 페이턴트 게엠베하(Merck Patent GmbH) 참조). EGFR에 결합하는 소분자의 예는 ZD1839 또는 게피티니브(Gefitinib) (IRESSAJ; 아스트라제네카(Astra Zeneca)); CP-358774 또는 에를로티니브(Erlotinib) HCL (TARCEVAJ; 제넨테크(OSI)); 및 AG1478, AG1571 (SU 5271; 서젠(Sugen))을 포함한다.

[0134] "티로신 키나제 억제제"는 HER 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 억제하는 분자이다. 이러한 억제제의 예로는 선행 문단에서 언급된 EGFR-표적화된 약물; 다케다(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-파발현 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(GLEEVAC(상표명))와 같은 비-HER 표적화된 TK 억제제; MAPK 세포의 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 (디페룰로일 메탄, 4,5-비스(4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 니트로티오펜 잔기를 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lamber)); 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); 시아노구아닌 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); 및 US 2005/0101617을 들 수 있다.

[0135] 본원에서 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직 또는 공동-분리계로부터 발생하여 이에 대항하는 질환 또는 장애, 또는 이의 증상 또는 이들로부터 생성된 상태이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 관절염 (류마티스성 관절염 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스성 관절염, 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임(Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염 및 유년기-발병 류마티스성 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형성 관절염, 만성 원발성 다발성 관절염, 재활성 관절염 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질환, 건선, 예컨대 플라크 건선, 물방울 건선, 농

포성 건선 및 손발톱의 건선, 아토피성 질환을 비롯한 아토피, 예컨대 건초열 및 잡 증후군(Job's Syndrome), 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉 피부염, 포진성 피부염 및 아토피성 피부염을 비롯한 피부염, X염색체-연관 고 IgM 증후군, 두드러기, 예컨대 만성 알레르기성 두드러기, 및 만성 자가면역성 두드러기를 포함하는 만성 특발성 두드러기, 다발성근염/피부근염, 유년기 피부근염, 독성 표피 괴사용해, 피부경화증 (전신성 피부경화증 포함), 경화증, 예컨대 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예컨대 척수-광학 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS) 및 재발성 이장성 MS (RRMS), 진행성 전신성 경화증, 아테롬성 동맥 경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 자가면역-매개 위장관 질환, 결장염, 예컨대 궤양성 결장염(ulcerative colitis), 현미경적 결장염, 콜라겐성 결장염, 폴립성 결장염, 괴사성 장결장염 및 경벽성 결장염, 및 자가면역성 염증성 장 질환), 괴저 농피증, 결정성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염), 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)을 비롯한 호흡 곤란 증후군, 수막염, 전부 또는 일부 포도막의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역성 혈액학적 장애, 류마티스성 척추염, 특발성 돌발성 난청, IgE-매개 질환, 예컨대 아나필락시스, 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예컨대 라스무센(Rasmussen) 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 후방 포도막염, 또는 자가면역성 포도막염, 신 증후군을 갖거나 갖지 않은 사구체신염 (GN), 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염, 예컨대 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (막성 신장병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신장병증, 제I형 및 제II형을 비롯한 막성- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 및 급속 진행성 GN, 알레르기성 상태 및 반응, 알레르기성 반응, 알레르기성 또는 아토피성 습진을 비롯한 습진, 천식, 예컨대 세기관지 천식, 기관지 천식 및 자가면역성 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증성 반응과 관련된 상태, 외부 항원에 대한 면역 반응, 예컨대 임신 동안의 태아 A-B-O 혈액형, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역성 심근염, 백혈구 부착 결핍, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 전신성 에리테마토데스 루푸스, 예컨대 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 파종상 홍반성 루푸스, (신장염, 뇌염, 소아파, 비-신장, 외-신장, 원판상, 탈모증을 비롯한) 루푸스, 소아파 인슐린-의존성 진성 당뇨병 (IDDM)을 비롯한 유년기 발병 (제I형) 진성 당뇨병, 성인 발병 진성 당뇨병 (제II형 당뇨병), 자가면역성 당뇨병, 특발성 요붕증, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연성 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 림프종성 육아종증을 비롯한 육아종증, 베게너 육아종증, 무과립구증, 혈관병증, ((류마티스성 다발성 근육통 및 거대 세포 (다까야스) 동맥염을 비롯한) 대 혈관 혈관염, (가와사끼병 및 결정성 다발성 동맥염/결정성 동맥 주위염을 비롯한) 중간 혈관 혈관염, 현미경적 다발성 동맥염, CNS 혈관염, 괴사성, 피부 또는 과민성 혈관염, 전신성 괴사성 혈관염, 및 ANCA-관련 혈관염, 예컨대 처르크-스트라우스(Churg-Strauss) 혈관염 또는 증후군 (CSS)을 비롯한) 혈관염, 측두 동맥염, 재생 불량성 빈혈, 자가면역성 재생 불량성 빈혈, 쿰즈 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙판 빈혈, 용혈성 빈혈, 또는 자가면역성 용혈성 빈혈 (AIHA)을 비롯한 면역 용혈성 빈혈, 악성 빈혈 (빈혈 악성), 애디슨병, 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성 진정 적혈구계 빈혈 (PRCA), 제VIII인자 결핍, A형 혈우병, 자가면역성 호중구감소증, 베혈구감소증, 백혈구감소증, 백혈구 누출에 관련된 질환, CNS 염증성 장애, 다발성 기관 손상 증후군, 예컨대 폐혈증, 외상 또는 출혈에 대한 속발성 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병(Bechet's 또는 Behcet's disease), 캐슬만(Castleman) 증후군, 굿파스처(Goodpasture) 증후군, 레이노드(Reynaud) 증후군, 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 스티븐-존슨(Stevens-Johnson) 증후군, 유천포창, 예컨대 유천포창 볼루스 및 피부 유천포창, (심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유천포창 천포창, 및 홍반성 천포창을 비롯한) 천포창, 자가면역성 다발내분비병증, 라이터(Reiter) 질환 또는 증후군, 면역 복합체 신장염, 항체-매개 신장염, 시신경 척수염, 다발신경병증, 만성 신경병증, 예컨대 IgM 다발신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 수혈후 자반증 (PTP), 헤파린-유도된 혈소판감소증, 및 자가면역성 또는 면역-매개 혈소판감소증, 예컨대 만성 또는 급성 ITP를 비롯한 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP)을 비롯한 혈소판감소증 (예를 들어, 심근경색증 환자에 의해 발병되는 경우), 자가면역성 고환염 및 난소염을 비롯한 고환 및 난소의 자가면역성 질환, 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역성 내분비선 질환, 갑상선염, 예컨대 자가면역성 갑상선염, 하시모또병, 만성 갑상선염 (하시모또 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역성 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 그레이브(Grave) 질환, 다분비선 증후군, 예컨대 자가면역성 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 신경학적 부신생물 증후군, 예컨대 람버트-이튼 근무력증 증후군 또는 이튼-람버트 증후군, 근육강직(stiff-man 또는 stiff-person) 증후군을 비롯한 부신생물 증후군, 뇌척수염, 예컨대 알레르기성 뇌척수염 또는 알레르기성 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증, 예컨대 흉선종-관련 중증 근무력증, 소뇌 변성, 신경근긴장증, 안진전 또는 안진전 간대성근경련증 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초접성 운동성 신경병증, 쉬한(Sheehan) 증후군, 자가면역성 간염, 만성 간염, 루포이드 간염, 거대 세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역성 만성 활성 간염, 림프양 간질성 폐렴 (LIP), 폐쇄성 세기관지염

(비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레(Guillain-Barré) 증후군, 벼거병(Berger's disease) (IgA 신장병증), 특발성 IgA 신장병증, 선형 IgA 피부병, 원발성 담즙성 간경변, 폐경변, 자가면역성 장병증 증후군, 복강(Celiac) 질환, 복강(Coeliac) 질환, 복강 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글루불린혈증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS; 루 게릭 병), 관상 동맥 질환, 자가면역성 이 질환, 예컨대 자가면역성 내이 질환 (AIED), 자가면역성 난청, 안진전 간대성근경련증 증후군 (OMS), 다발성 연골염, 예컨대 불응성 또는 재발성 다발성 연골염, 폐 폐포 단백증, 아밀로이드증, 공막염, 비-암종성 림프구증가증, 모노클로날 B 세포 림프구증가증 (예, 양성 모노클로날 감마병증 및 모노클로날 감마병증(Monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS))을 비롯한 원발성 림프구증가증, 말초 신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예컨대 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근병증, 초점성 분절성 사구체신염 (FSGS), 내분비선 암구병증, 포도막막염, 맥락막막염, 자가면역성 간학적 장애, 섬유근육통, 다발성 내분비선 부전증, 슈미츠(Schmidt) 증후군, 부신염, 위선 위축, 초로성 치매, 탈수초성 질환, 예컨대 자가면역성 탈수초성 질환 및 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 당뇨병성 신장병증, 드레슬러(Dressler) 증후군, 원형 탈모증, 크레스트(CREST) 증후군 (석회증, 레이노(Raynaud) 현상, 식도 기능장애, 손발가락 경화증, 및 모세혈관화장증), 남성 및 여성 자가면역성 불임증, 혼합성 결합 조직 질환, 샤가스병(Chagas's disease), 류마티스열, 재발성 유산, 농부 폐, 다형성 홍반, 심장절개술후 증후군, 쿠싱(Cushing) 증후군, 조류-사육자폐, 알레르기성 육아종성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트(Alport) 증후군, 폐포염, 예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 카파노소미아스증(kypanosomiasis), 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증(aspergillosis), 샘프터(Sampter) 증후군, 카플란(Caplan) 증후군, 뎅기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 미만성 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 암구내염, 장기 융기성 홍반, 태아적모구증, 호산구성 근막염, 술만(Shulman) 증후군, 펠티(Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예컨대 만성 섬모체염, 이종만성 섬모체염, 홍채섬모체염 (급성 또는 만성), 또는 푸흐(Fuch) 섬모체염, 헤노흐-쇼늘레인(Henoch-Schonlein) 자반증, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 예방접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 앱스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 감염, 유행성 이하선염, 에반(Evan) 증후군, 자가면역성 생식선 부전증, 시든햄(Sydenham) 무도증, 연쇄상 구균 감염후 신장염, 혈전혈관염 ubiterans, 갑상선증독증, 척수로, 맥락막염, 거대 세포 다발성 근육통, 내분비선 암구병증, 만성 과민성 폐렴, 건성 각결막염, 유행성 각결막염, 특발성 신염 증후군, 미소 병변 신장병증, 양성 가족성 및 허혈-재판류 손상, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 장애, 정자무발생증, 자가면역성 용혈, 뷔크병(Boeck's disease), 한랭글루불린혈증, 뒤피트렌구축(Dupuytren's contracture), 수정체파민 암구내염, 알레르기성 장염, 나병 결정성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류마티스열(febris rheumatica), 해면-리치병(Hamman-Rich's disease), 감각신경성 난청, 발작성 혈색소뇨증, 성선기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구감소증, 감염성 단핵구증, 횡단성 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 췌장염, 급성 다발성 신경근염, 괴저 농피증, 케르뱅(Quervain) 갑상선염, 후천성 비장 위축, 항정자 항체로 인한 불임증, 비-악성 흉선증, 백반증, SCID 및 앱스타인-바 바이러스-관련 질환, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충 질환, 예컨대 리슈만편모충(Leshmania), 독성-쇼크 증후군, 식중독, T 세포의 침윤에 관련된 상태, 백혈구-부착 결핍증, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연성 과민증에 관련된 면역 반응, 백혈구 누출에 관련된 질환, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기성 신경염, 자가면역성 다발내분비병증, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역성 위축 위염, 교감성 안염, 류마티스성 질환, 혼합성 결합 조직 질환, 신 증후군, 췌도염, 다발성 내분비선 부전증, 말초 신경병증, 자가면역성 다분비선 증후군 제I형, 성년기-발병 특발성 부갑상선 기능저하증 (AOIH), 전체 탈모증, 확장성 심근병증, 후천성 표피 수포증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비화농성 동염, 급성 또는 만성 동염, 사골 동염, 전두 동염, 상악 동염, 또는 접형 동염, 호산구-관련 장애, 예컨대 호산구증가증, 폐 침윤 호산구증가증, 호산구증가증-근육통 증후군, 로플러(Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증가증, 기관지폐렴성 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구 함유 육아종, 아나필락시스, 혈청음성 척추관절염, 다발성 내분비선 자가면역성 질환, 경화성 담관염, 공막, 공막위, 만성 점막피부 칸디다증, 부루톤(Bruton) 증후군, 유아기의 일과성 감마글로불린저혈증, 비스코트-알드리히(Wiskott-Aldrich) 증후군, 모세혈관화장성 운동실조증, 콜라겐 질환에 관련된 자가면역 장애, 류마티스, 신경학적 질환, 림프절염, 허혈성 재판류 장애, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 혈관화장, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민, 대뇌 허혈, 및 혈관화 수반 질환, 알레르기성 과민성 장애, 사구체신염, 재판류손상, 심근 또는 다른 조직의 재판류손상, 급성 염증성 성분을 갖는 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추 신경계 염증성 장애, 암구 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-관련 증후군, 시토킨-유도된

독성, 기면증, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경변, 당뇨병성 망막변증, 당뇨병성 대동맥 장애, 동맥내막 과다형성, 소화 궤양, 판막염, 및 자궁내막증을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0136] "양성 과다증식성 장애"는 세포 증식에 관한 것으로 의료계 일원들에 의해 비정상적인 것으로 인식되는 환자의 상태를 의미한다. 비정상 상태는 장애를 겪지 않고 있는 기관에서 관찰되는 수준과 통계학적으로 상이한 특성의 수준을 특징으로 한다. 세포 증식은 세포 증가에 의한 성장 또는 신장을 나타내며, 세포 분열을 포함한다. 세포 증식율은 주어진 단위 시간 내에 생성된 세포 수를 계수함으로써 측정할 수 있다. 양성 과다증식성 장애의 예는 건선 및 폴립을 포함한다.

[0137] "호흡기 질환"은 호흡기계에 관련되며, 만성 기관지염, 급성 천식 및 알레르기성 천식을 비롯한 천식, 낭성 섬유증, 기관지확장증, 알레르기성 또는 다른 비염 또는 동염, α1-항트립신 결핍, 기침, 폐기종, 폐 섬유증 또는 과다-반응성 기도, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 만성 폐쇄성 폐 장애를 포함한다.

[0138] "건선"은 국한성, 분리성 및 융합성 적색 은빛-규모의 반점구진의 발진을 특징으로 하는 상태이다. 건선성 병변은 일반적으로 팔꿈치, 무릎, 두피 및 몸통 상에 주로 발생하며, 특징적인 이상각화증 및 상피 돌기의 신장을 현미경상 나타낸다. 건선은 이 질환의 박탈성, 농포성 중등 내지 중증 및 난치성 형태를 비롯한 다양한 형태의 건선을 포함한다.

[0139] "자궁내막증"은 변형된 혈액을 함유하는 낭종을 빈번하게 형성하는 자궁내막 조직의 이소성 발생을 나타낸다.

[0140] 본원에서 용어 "혈관 질환 또는 장애"는 심혈관계를 비롯한 혈관계에 영향을 미치는 다양한 질환 또는 장애를 나타낸다. 이러한 질환의 예는 동맥경화증, 혈관 재폐쇄, 아테롬성 동맥 경화증, 수술후 혈관 협착증, 재협착증, 혈관 폐색 또는 경동맥 폐쇄성 질환, 관상 동맥 질환, 협심증, 소혈관 질환, 고콜레스테롤혈증, 고혈압 및 혈관 상피 세포의 비정상 증식 또는 기능에 관련된 상태를 포함한다.

[0141] 용어 "협착증"은 신체 중공 통로 (예, 관 (duct 또는 canal))의 좁아짐 또는 협착을 나타낸다.

[0142] 용어 "혈관 협착증"은 혈관의 폐색 또는 좁아짐을 나타낸다. 혈관 협착증은 빈번하게 지방 퇴적 (아테롬성 동맥 경화증의 경우) 또는 혈관 평활근 세포 및 내피 세포의 과도한 이동 및 증식으로부터 야기된다. 동맥은 특히 협착증에 감수성이다. 본원에서 사용되는 용어 "협착증"은 구체적으로 개시 협착증 및 재협착증을 포함한다.

[0143] 용어 "재협착증"은 개시 협착증의 치료가 외관상으로 성공한 후에 협착증이 재발된 것을 나타낸다. 예를 들어, 혈관 협착증의 관점에서 "재협착증"은, 예를 들어 혈관성형술 (예, 경피 경관 관상동맥 성형술), 관상동맥경화 반제거술 또는 스텐트 등에 의해 지방 퇴적물을 제거함으로써 혈관 협착증의 치료를 외관상 성공한 후에 혈관 협착증이 재발하는 것을 나타낸다. 재협착증의 기여 요인 중 하나는 내막 과다형성이다. "신생혈관내막 과다형성" 및 "신생혈관내막 형성"과 호환하여 사용되는 용어 "내막 과다형성"은 혈관 평활근 세포 및 내피 세포의 과도한 증식 및 이동의 결과로서 혈관의 가장 내부 층, 즉 혈관내막이 비후해지는 것을 나타낸다. 재협착증 동안 발생하는 다양한 변화는 종종 집합적으로 "혈관 벽 리모델링"으로 지칭된다.

[0144] 용어 "풍선 혈관성형술" 및 "경피 경관 관상동맥 성형술" (PTCA)은 빈번하게 호환하여 사용하여, 관상 동맥으로부터 플라크를 제거하기 위한 비-수술적 카테터-기초 치료법을 나타낸다.

[0145] 협착증 또는 재협착증은 빈번하게 혈류에 대한 증가된 내성의 결과로서 고혈압을 유발시킨다.

[0146] 용어 "고혈압"은 비정상적으로 높은 혈압, 즉 정상 범위의 상한값을 넘어서는 혈압을 나타낸다.

[0147] "폴립"은 정상 표면 수준으로부터 전후방으로 부풀어지고 들출되어 상대적으로 넓은 기저 또는 가는 출기로부터 자라난 반타원형, 타원형 또는 불규칙 융기형 구조로서 육안으로 보이게 된 조직의 덩어리를 나타낸다. 예로는 결장, 직장 및 비강 폴립이 있다.

[0148] "섬유선종"은, 증식한 섬유모세포 및 결합 조직 요소의 눈에 띄는 간질이 존재하는, 선상피로부터 유래된 양성 신생물을 나타낸다.

[0149] "천식"은 호흡 곤란 상태이다. 기관지 천식은, 평활근의 수축 (연축), 점막의 부종, 또는 기관지 및 세기관지 내강의 점액 때문일 수 있는 기도의 광범위한 좁아짐이 존재하는 폐의 상태를 나타낸다.

[0150] "기관지염"은 기관지관의 점막 염증을 나타낸다.

[0151] 본원의 목적을 위해, "바이알"은 치료제를 담는 용기를 나타낸다. 바이알은 시린지가 관통하는 마개에 의해 밀

봉될 수 있다. 일반적으로, 바이알은 유리 재료로 형성된다. 바이알 내의 치료제는 액상, 동결건조상, 동결상 등을 비롯한 다양한 상태로 존재할 수 있다.

[0152] "패키지 사용 설명서"는 치료 제품의 용도에 대한 지시, 용법, 용량, 투여, 금기 및/또는 주의에 대한 정보를 담고 있는, 치료제의 상업적 패키지에 통상적으로 포함되는 지시서를 나타낸다.

## II. 항체의 생산

[0154] 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.

### (i) 폴리클로날 항체

[0155] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복막내 (ip) 주사에 의해 동물에서 발생된다. 이는 면역화되어야 할 종, 예를 들어 키홀 립팻 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 이관능성 또는 유도체화제를 이용한 대두 트립신 억제제, 예를 들어 말레이미도벤조일 슬포숙신이미드 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.

[0156] [0157] 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 웨티드 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.

### (ii) 모노클로날 항체

[0158] [0159] 본원에 기재된 모노클로날 항체를 제조하는 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 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.

[0160] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 생물을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 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)]).

[0161] 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 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없을 경우, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 터미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이며, 이들의 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0162] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고-수준 생산을 자지하고, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들어 미국 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 살크 인스티튜트 세포 분화 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들, 및 미국 메릴랜드주 로크빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)에서 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항

체의 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)]).

- [0163] 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.
- [0164] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐처드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0165] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 회석 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.
- [0166] 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, 복수 액, 또는 혈청으로부터 분리한다.
- [0167] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어 뮤린 항체의 종쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 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 내에서 모노클로날 항체를 합성할 수 있다. 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.
- [0168] 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 뮤린 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.
- [0169] DNA는 또한 예를 들어 동종 뮤린 서열 대신 인간 종쇄 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.
- [0170] 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 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.
- [0171] (iii) 인간화 항체
- [0172] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되었다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 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)]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 비손

상인 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 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.

[0173] 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)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 이용한다. 동일한 프레임워크는 몇몇 여려가지 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)]).

[0174] 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 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 수여자 및 도입 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 결합하여, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 목적하는 항체 특징이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 직접적으로 항원 결합에 영향을 주는 것에 관여한다.

[0175] WO 01/00245에는 HER2에 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 예시적인 인간화 HER2 항체의 생산이 기재되어 있다. 본원에서 특정 관심의 인간화 항체는 본질적으로 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 EGF, TGF- $\alpha$  및/또는 HRG 매개된 MAPK 활성화를 차단하고/거나 본질적으로 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 HER2에 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*, 5<sup>th</sup> 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. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 위치 69H, 71H 및 73H 중 2개 또는 전부에 FR 치환을 포함한다.

[0176] 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.

[0177] 인간화 항체는 예를 들어 선행 문단의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에 가변 경쇄 상보성 결정 잔기 KASQDV SIGVA (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.

[0178] 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 포함하는 것 (즉, 변이체 574)일 수 있다. 친화도 성숙된 항체는 바람직하게는 뮤린 2C4 또는 변이체 574의 것보다 우수한 친화도 (예를 들어 HER2-세포의 도메인 (ECD) ELISA를 이용하여 평가된 바로, 예를 들어 약 2배 또는 약 4배 내지 약 100배 또는 약 1000배 개선된 친화도)로 HER2 수용체에 결합한다. 치환을 위한 예시적인 가변 중

쇄 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. 변경을 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.

[0179] 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체의 다양한 형태가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 이뮤노컨쥬케이트를 생성하기 위한 1종 이상의 세포독성제(들)과 임의로 컨쥬케이션된 Fab와 같은 항체 단편일 수 있다. 별법으로, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 비순상 IgG1 항체와 같은 비순상 항체일 수 있다. 바람직한 비순상 IgG1 항체는 서열 13의 경쇄 서열 및 서열 14의 중쇄 서열을 포함한다.

[0180] (iv) 인간 항체

[0181] 인간화에 대한 별법으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화시 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전 래퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식 계열 돌연변이체 마우스 내의 항체 중쇄 결합 영역 ( $J_H$ )의 동종컨쥬케이트성 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, 동 제5,589,369호 및 동 제5,545,807호를 참조한다.

[0182] 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 계놈의 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 래퍼토리를 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 동 제5,573,905호를 참조한다.

[0183] 인간 항체는 또한 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 동 제5,229,275호 참조).

[0184] 인간 HER2 항체는 1998년 6월 30일자로 허여된 미국 특허 제5,772,997호 및 1997년 1월 3일자로 공개된 WO 97/00271에 기재되어 있다.

[0185] (v) 항체 단편

[0186] 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비순상 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,  $\text{Fab}'\text{-SH}$  단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜  $\text{F}(\text{ab}')_2$  단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따르면,  $\text{F}(\text{ab}')_2$  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 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0187] (vi) 이중특이적 항체

[0188] 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 백혈구 상의 촉발 분자, 예컨대 T-세포 수용체 분자 (예를 들어 CD2 또는 CD3), 또는 Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) 및 Fc γ RIII (CD16)와 같은 IgG에 대한 Fc 수용체 (Fc γ R)에 결합하는 팔과 결합되어, HER2-발현 세포에 대한 세포 방어 메카니즘에 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-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 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.

[0189] WO 96/16673에는 이중특이적 HER2/Fc γ RIII 항체가 기재되어 있으며, 미국 특허 제5,837,234호에는 이중특이적 HER2/Fc γ RI 항체 IDM1 (오시뎀(Osidem))이 기재되어 있다. 이중특이적 HER2/Fc α 항체는 WO 98/02463에 나타나 있다. 미국 특허 제5,821,337호는 이중특이적 HER2/CD3 항체를 교시한다. MDX-210은 이중특이적 HER2-Fc γ RIII Ab이다.

[0190] 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 (콰드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정체는 다소 번거로우며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차는 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0191] 상이한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)는 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 헌지, 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 동일하지 않은 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 비율에 특정 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터 내의 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0192] 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 화합물을 원하지 않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 분리하는 것을 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.

[0193] 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 항체 분자의 쌍 사이의 계면을 유전자조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이종이량체의 퍼센트를 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C<sub>μ</sub>3 도메인의 적어도 일부를 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 보통적 "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 의해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0194] 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 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위한 것으로 제안된다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될

수 있다. 적합한 가교체는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0195] 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 디티올 치물화제나트륨 아르세나이트의 존재하에서 환원시켜 근접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디술피드 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, 동물량의 다른  $Fab'$ -TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.

[0196] 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  $Fab'$  단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되고, 이를 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 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0197] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리하는 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 웨티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의  $Fab'$  부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 헌지 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 쇄 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 또 다른 단편의 상보적  $V_L$  및  $V_H$  도메인과 쌍을 지어 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄  $Fv$  ( $sFv$ ) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하는 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0198] 2 이상의 결합가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]).

[0199] (vii) 다른 아미노산 서열 변형

[0200] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내로 도입함으로써, 또는 웨티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 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 항체의 번역후 과정을 변화시킬 수 있다.

[0201] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 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 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 항체 변이체를 목적하는 활성을 대해 스크리닝한다.

[0202] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리웨티드의 길이 범위의 아미노- 및/또

는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 들 수 있다. 항체 분자와 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 융합 (예를 들어 ADEPT를 위해) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합을 포함한다.

- [0203] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 상기 변이체는 상이한 잔기로 대체된 항체 분자 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이유발법에 가장 큰 관심 부위로는 초가변 영역을 들 수 있지만, FR 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 하기야 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물이 스크리닝될 수 있다.

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

[0204]

항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 쉬트 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)]:

[0206] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0207] (2) 비하전된 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0208] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0209] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0210] 별법으로, 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기재한 기로 나누어질 수 있다.

[0211] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0212] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- [0213] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0214] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0215] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0216] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0217] 비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원으로 또 다른 구성원을 교체하는 것을 수반할 것이다.
- [0218] 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 결합(들)을 항체에 첨가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편일 경우).
- [0219] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어 인간화 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 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 제시를 사용한 친화도 성숙을 포함한다. 간략히, 몇몇 초가변 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 생성물에의 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 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발법을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 초가변 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.
- [0220] 항체의 또 다른 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.
- [0221] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 나타낸다. 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.
- [0222] 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).
- [0223] 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 패텔(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.
- [0224] 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 상보적 의존성 세포독성 (CDC)을 증진시키기 위해, 본 발명의 항체를 이펙터 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 쇄간 디슬퍼드 결합을 형성할수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체성 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 동종이량체성 항체는 또한 문헌 [Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이종이관능성 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.

[0225] WO 00/42072 (프레스타, 엘.)에는 그의 Fc 영역 내에 아미노산 치환을 포함하는, 인간 이펙터 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.

[0226] 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.

[0227] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 구조 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편) 새로 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 나타낸다.

[0228] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대해 증대된 결합력을 가지며, 증가된 반감기를 갖는 항체는 WO 00/42072 (프레스타, 엘.)에 기재되어 있다. 이러한 항체는 항체 내에 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함하여 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합력이 증대된다. 예를 들어, Fc 영역은 위치 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 한 군데에서 치환을 가질 수 있다. 증대된 FcRn 결합력을 갖는 바람직한 Fc 영역-포함 항체 변이체는 그의 Fc 영역의 위치 307, 380 및 434 중 하나, 둘 또는 세 군데에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0229] 3개 이상의 (바람직하게는 4개) 관능성 항원 결합 부위를 갖는 유전자조작된 항체가 또한 고려된다 (미국 특허 출원 제US 2002/0004587 A1호, 밀러(Miller) 등).

[0230] 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 올리고뉴클레오티드-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.

[0231] (viii) 목적하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝

[0232] 항체를 생성하는 기술은 상기에 기재되었다. 목적에 따라 특정 생물학적 특징을 갖는 항체를 선별할 수 있다.

[0233] 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 또 다른 HER 수용체와의 컨쥬게이션으로) 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.

[0234] 예를 들어, HER2 항체에 의한 MCF7 유방 종양 세포주에의 HER 결합의 억제는 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 rHRG $\beta$  1<sub>177-224</sub> (25 pm) 을 첨가하고, 인큐베이션을 4 내지 16시간 동안 계속할 수 있다. 용량 반응 곡선을 작성할 수 있고, IC<sub>50</sub> 값을 관심의 항체에 대해 계산할 수 있다. 한 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

$IC_{50}$ 은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0235] 별법으로, 또는 부가적으로, HER2 항체가 HER 헤テ로-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 컨쥬게이션됨)을 사용하여 HER 리간드-의존성 티로신 인산화 활성에 대해 분석할 수 있다. 미국 특허 제5,766,863호에 기재된 키나제 수용체 활성화 분석법은 또한 HER 수용체 활성화 및 항체에 의한 활성의 차단을 측정하는데 이용가능하다.

[0236] 한 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, rHRG $\beta$  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  $\mu$ L의 첨가에 의해 반응을 중단시킬 수 있다. 각각의 샘플 (25  $\mu$ L)을 4 내지 12% 구배 겔 (노벡스(Novex)) 상에서 전기영동한 후, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전기영동적으로 옮길 수 있다. 항포스포티로신 (1  $\mu$ g/mL) 이뮤노블롯을 전개시키고,  $M_r$  ~ 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 용량-반응 곡선을 작성하고, 관심의 항체에 대한  $IC_{50}$ 을 계산할 수 있다. 한 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  $IC_{50}$ 을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석법에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하기 위한  $IC_{50}$ 은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0237] 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  $\mu$ g/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. 바람직하게는, 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.

[0238] 한 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 혜데글린 의존성 회합을 차단할 수 있다.

[0239] 성장 억제성 HER2 항체를 확인하기 위해, HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 항체에 대해 스크리닝 할 수 있다. 한 실시양태에서, 선택의 성장 억제성 항체는 세포 배양물에서의 SK-BR-3 세포의 성장을 약 0.5 내지 30  $\mu$ g/mL의 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 플레이팅한다. 디쉬당 HER2 항체 0.5 내지 30  $\mu$ g/mL을 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.

[0240] 아폽토시스를 유도하는 항체를 선별하기 위해, BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석법이 이용가능하다. 선행 문단에서 논의된 바와 같이 BT474 세포를 배양하고, 디쉬에 시팅한다. 그 후, 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독 또는 모노클로날 항체 10  $\mu$ g/mL를 함유하는 배지로 대체한다. 3일 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 떼어낸다. 그 후, 세포 사멸 분석법에 대해 상기 논의된 바와 같이 세포를 원심분리

하고,  $\text{Ca}^{2+}$  결합 완충액에 재현탁시키고, 투브 내로 분취한다. 그 후, 투브를 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FTIC) ( $1 \mu\text{g/mL}$ )을 넣는다. 샘플을 팍스칸(FACSCAN)(상표명) 유동 세포측정기 및 팍스컨버트(FACSCONVERT) (상표명) 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (베톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석할 수 있다. 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 아폽토시스-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  $37^\circ\text{C}$ 에서 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 2배 이상 (바람직하게는 3배 이상)인 아폽토시스 세포의 퍼센트 변화를 유도하는 항체를 프로-아폽토시스 항체로서 선별할 수 있다. 7C2 및 7F3과 같은 아폽토시스를 유도하는 항체에 대한 스크리닝을 위한 분석법에 대해서는 WO 98/17797을 참조한다.

[0241] 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.

[0242] (ix) 페르투주마브 조성물

[0243] HER2 항체 조성물의 한 실시양태에서, 상기 조성물은 주요종 페르투주마브 항체와 그의 하나 이상의 변이체의 혼합물을 포함한다. 본원에서 페르투주마브 주요종 항체의 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 13 및 17로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열 및 서열 14 및 18로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 (상기 서열의 탈아미드화 및/또는 산화된 변이체를 포함함)을 포함하는 것이다. 한 실시양태에서, 본원의 조성물은 주요종 페르투주마브 항체, 및 아미노-말단 리더 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 리더 연장물은 항체 변이체의 경쇄 상에 (예를 들어 항체 변이체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에) 있다. 주요종 HER2 항체 또는 항체 변이체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어  $\text{F(ab')}_2$  단편의 Fab)일 수 있지만, 바람직하게는 둘다 전장 항체이다. 본원의 항체 변이체는 그의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장물을 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 리더 연장물은 항체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 있다. 아미노-말단 리더 연장물은 바람직하게는 VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다. 조성물 중의 아미노-말단 리더 연장물의 존재는 N-말단 서열 분석, 전하 이질성에 대한 분석법 (예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동법), 질량 분광법 등을 포함하나 이에 한정되지 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%)의 항체 분자가 아미노-말단 리더 연장물을 포함한다. 이러한 퍼센트 양은 바람직하게는 정량적인 N-말단 서열 분석 또는 양이온 교환 분석 (바람직하게는 고-분해능, 약한 양이온 컬럼, 예컨대 PROPAC WCX-10(상표명) 양이온 교환 컬럼을 이용함)을 이용하여 측정된다. 아미노-말단 리더 연장물 변이체 이외에, 그의 중쇄 하나 또는 둘다 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체, 탈아미드화된 항체 변이체 등을 포함하나 이에 한정되지 않는, 주요종 항체 및/또는 변이체의 추가의 아미노산 서열 변경이 고려된다.

[0244] 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.

[0245] 조성물은 유전자조작된 세포주, 예를 들어 HER2 항체를 발현하는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주로부터 회수될 수 있거나, 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0246] (x) 이뮤노컨쥬게이트

[0247] 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.

[0248] 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.

[0249] 본 발명의 바람직한 한 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)]) 마이탄시노이드-항체 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다.

[0250] 관심의 또 다른 이뮤노컨쥬게이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 컨쥬게이션된 HER2 항체를 포함한다. 항생제의 칼리케아미신 혹은 서브-피코몰 농도에서 이중-가닥 DNA 과쇄를 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; 동 제5,712,374호; 동 제5,264,586호; 및 동 제5,773,001호를 참조한다.

[0251] 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A 쇄 (슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 애노마이신 및 트리코테신을 들 수 있다. 예를 들어 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

[0252] 본 발명은 또한 항체와 핵분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제, 또는 데옥시리보뉴클레아제와 같은 DNA 엔도뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 이뮤노컨쥬게이트를 고려한다.

[0253] 다양한 방사성 동위원소는 방사성컨쥬게이션된 HER2 항체를 제조하는데 이용가능하다. 예로는  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  및  $Lu$ 의 방사성 동위원소를 들 수 있다.

[0254] 항체와 세포독성제의 컨쥬게이트는 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (글루타렌 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-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)과 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-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드의 항체에의 컨쥬게이션을 위한 예시적인 킬레이트제화이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 웹티다제-감수성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)])를 사용할 수 있다.

[0255] 별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웹티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0256] 다른 이뮤노컨쥬게이트가 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비단백질성 종합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로파일렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로파일렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀젼에서, 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*, 16<sup>th</sup> edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다.

[0257] 본원에 개시된 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 동 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.

[0258] 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 디슬피드 상호교환 반응을 통해 리포좀에 컨쥬게이션될 수 있다. 화학요법제는 임의로 리포좀 내에 함유된다. 문헌 [Gabizon et al. *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)]를 참조한다.

### III. 치료요법을 위한 환자의 선별

[0260] 본원에서 환자는 치료 전에 진단 시험에 임의로 적용된다. 예를 들어, 진단 시험은 HER (예, HER2 또는 EGFR) 발현 (과발현 포함), 증폭 및/또는 활성화 (인산화 또는 이량체화를 포함함)를 평가할 수 있다..

[0261] 일반적으로, 진단 시험을 수행하는 경우에, 샘플은 치료가 필요한 환자에게서 수득할 수 있다. 대상체가 암을 갖는 경우에, 샘플은 일반적으로 종양 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, 종양 샘플은 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암 또는 직장결장암 종양 샘플로부터 유래된다.

[0262] 그러나, HER 항체에 대한 다양한 다른 비-악성 치료 정후가 본원에 기재되었음이 인식된다. 환자가 비-악성 정후에 대해 치료해야 할 경우에, 적합한 샘플을 상기 환자로부터 수득하여 본원에 기재된 바와 같은 진단 분석에 적용한다.

[0263] 본원의 생물학적 샘플은 고정 샘플, 예를 들어 포르말린 고정 샘플, 파라핀-포매 (FFPE) 샘플, 또는 동결된 샘플일 수 있다.

[0264] 본원에서 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 치료요법을 위해 선택된 환자는 종양, 또는 HER (바람직하게는 HER2) 활성화를 나타내는 기타 세포 또는 조직을 갖는다. 한 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 과별현 및/또는 암 세포 내의 HER 수용체를 활성화하는데 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. 별법으로, 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.

#### (i) HER 이량체

[0265] 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.

[0267] 면역침전법 또는 ELISA와 같은 면역친화도-기재 방법은 HER 이량체를 검출하는데 이용될 수 있다. 한 실시양태에서, HER2 항체를 사용하여 HER2를 포함하는 복합체를 종양 세포로부터 면역침전시킨 후, 생성된 면역침전물을 이뮤노블로팅에 의해 EGFR 또는 HER3에 대해 프로브한다. 또 다른 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.

[0268] 다른 실시양태에서, ELISA 또는 항체 "샌드위치"-유형 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 이종 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.

[0269] 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. 한 실시양태에서, 화학적으로 가교된 종양 세포로부터의 세포 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, EGFR 및/또는 HER3에 대한 항체로 이뮤노블롯팅한다. 적절한 분자량의 수퍼쉬프트(supershifted) 밴드는 가장 가능성있게 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체를 지시하며, 이는 HER2가 EGFR 및 HER3에 대한 바람직한 이량체화 상태이기 때문이다. 상기 결과는 HER2 항체의 후속 면역블롯팅에 의해 확인될 수 있다.

[0270] 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 과장의 입사광에 의해 보다 높은 에너지 상태에 노출시킨다. 그러면, 공여자 프로브는 그의 에너지를 제2 프로브인 수용자 프로브에 투과하여 공여자의 형광 강도의 감소 및 수여자의 형광 방출의 증가를 초래한다. 에너지 전달 정도를 측정하기 위해, 공여자 및 수여자 프로브로 표지된 샘플에서의 공여자의 강도를 공여자 프로브만으로 표지된 샘플에서의 강도와 비교한다. 임의로, 수여자 강도를 공여자/수여자 및 수여자만의 샘플에서 비교한다. 적합한 프로브는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 플로오로세인 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).

[0271] 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)]). 한 실시양태에서, 문헌 [Nagy et al., *Cytometry*, 32:120-131 (1998)]에 기재된 바와 같이, pbFRET를 "현탁액 중에서" 또는 "계내에서" 세포 상에 사용하여 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체의 형성을 검출하고 측정한다. 상기 기술은 에너지 전달에 기인한 공여자의 형광 수명의 감소를 측정한다. 특정 실시양태에서, 네이기(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.

[0272] FRET는 바람직하게는 표준 면역조직화학 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 수여자로서 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.

[0273] 본 발명의 한 실시양태에서, HER2 항체 및 EGFR 또는 HER3 중 하나를 예를 들어 네이기 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.

- [0274] 다른 실시양태에서, HER2 및 HER1 또는 HER3 중 하나에 특이적인 HER 수용체 리간드를 형광 표지하고, FRET 연구에 사용한다.
- [0275] 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 주사 영상화 (LSI)를 이용하여 항체 결합, 및 HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나의 공동-위치화를 마이크로웰 플레이트와 같은 고-처리량 포맷으로 검출한다.
- [0276] 추가의 실시양태에서, EGFR-HER2 및/또는 HER2-HER3 이량체의 존재는 이량체 성분의 근접성에 의존하는 효소 활성을 확인함으로써 측정된다. HER2 항체는 하나의 효소와 컨쥬케이션되며, EGFR 또는 HER3 항체는 제2 효소와 컨쥬케이션된다. 제1 효소에 대한 제1 기질을 첨가하고, 반응은 제2 효소에 대한 제2 기질을 생성한다. 이는 또 다른 분자와의 반응을 초래하여 염료와 같은 검출가능한 화합물을 생성한다. 또 다른 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 컨쥬케이션된 HER2 항체 및 양고추냉이 퍼옥시다제와 컨쥬케이션된 HER3 또는 HER1 항체와 접촉시킨다. 글루코스를 DAB 및 카탈라제와 같은 염료 전구체와 함께 반응물에 첨가한다. 이량체의 존재를 DAB에 대한 염색시 색의 전개에 의해 측정한다.
- [0277] 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 사이언시스(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 변형제"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 변형제를 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 폴리뉴클레오티드 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.
- [0278] 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, 절단체를 도입하고/거나 활성화시키고, 연결기를 절단하여, 리포터 부분 및 이동성 변형제를 함유하는 eTag(상표명)의 일부를 방출한다. 따라서, "유리" eTag(상표명)의 존재는 표적 결합 부분의 그의 표적에의 결합을 지시한다.
- [0279] 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. 절단체는 제1 결합 화합물 및 제2 결합 화합물이 가까이 근접할 경우, 제1 결합 화합물 내의 연결기를 절단하기만 하는 것이다.
- [0280] 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, 절단체는 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, 절단체는 필요할 경우 활성화된다. EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체가 존재할 경우, 절단체는 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.
- [0281] 한 실시양태에서, 절단체는 연결기에 작용하는 활성화가능한 화학 종이다. 예를 들어, 절단체는 샘플을 광에 노출시킴으로써 활성화될 수 있다.
- [0282] 또 다른 실시양태에서, eTag(상표명)은 제1 표적 결합 부분으로서 EGFR 또는 HER3에 대한 항체를 사용하여 구축되며, 제2 결합 화합물은 HER2에 대한 항체로부터 구축된다.

- [0283] 또 다른 실시양태에서, HER 이량체는 이량체 내의 HER 수용체에 대한 그의 결합에 비교한 바와 같은 이량체에 특이적으로 또는 선호적으로 결합하는 항체 또는 다른 시약을 사용하여 검출된다.
- [0284] (ii) HER2 인산화
- [0285] 선행 섹션에서 논의된 EGFR, HER2 또는 HER3 항체를 사용한 면역침전법은 임의로 이뮤노블록팅에 대한 별법 또는 보충으로서, 이량체에 대한 기능적 분석 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, HER3 항체를 사용한 면역침전법은 면역침전물 내의 수용체 티로신 키나제 활성에 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 이뮤노블록팅에 의해 확인될 수 있다. 또 다른 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 웨티드 기질과 접촉시킨다. 웨티드의 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.
- [0286] HER 수용체의 인산화는 HER2 수용체와 같은 하나 이상의 HER 수용체의 면역침전, 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 양성은 면역침전된 HER 수용체(들) 내의 인산화된 티로신 잔기(들)을 검출하는 항-포스포티로신 항체를 사용하여, 젤 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 바이오테크놀로지(Upstate Biotechnology) (미국 뉴욕주 레이크 플라시드에 소재)로부터 시판된다. 음성은 밴드의 부재에 의해 결정된다.
- [0287] 또 다른 실시양태에서, HER (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.
- [0288] HER 수용체(들)의 인산화를 검출하는 다른 방법으로는 KIRA ELISA (미국 특허 제5,766,863호; 동 제5,891,650호; 동 제5,914,237호; 동 제6,025,145호; 및 동 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 바이오사이언시즈 (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.
- [0289] 또한, 신호 전달 단백질의 세포 샘플에서 인산화 상태를 검출하기 위해 세포 어레이에서 포스포-특이적 항체를 사용할 수 있다 (US 2003/0190689).
- [0290] (iii) 유전자 발현 프로파일
- [0291] 한 실시양태에서, 유전자 발현 분석은 HER 인산화 또는 활성화를 직접적으로 측정하기 위해 대용으로 제공될 수 있다. 이는 샘플이 HER 인산화를 확실하게 정량화하는 것이 어려울 수 있는 고정 샘플 (예, 파라핀-포매, 포르말린 고정 종양 샘플)인 경우에 특별히 유용하다. 이러한 방법에 따라, 샘플에서 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현이 평가되며, 여기서 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드는 샘플에서 양성 HER 인산화 또는 활성화를 나타낸다. 이러한 방법의 한 실시양태에서, 샘플에서 베타셀룰린 및/또는 암피레귤린의 발현을 측정할 수 있으며, 여기서 베타셀룰린 및/또는 암피레귤린 발현은 샘플에서 양성 HER 인산화 또는 활성화를 나타낸다.
- [0292] 이러한 방법에 따라, 환자로부터의 샘플은 둘 이상의 HER 수용체 (바람직하게는 EGFR, HER2 및 HER3로부터 선택됨) 및 하나 이상의 HER 리간드 (바람직하게는 베타셀룰린, 암피레귤린, 에피레귤린 및 TGF- $\alpha$ 로부터 선택됨, 가장 바람직하게는 베타셀룰린 또는 암피레귤린임)의 발현에 대해 시험된다. 예를 들어, 둘 이상의 HER 수용체는 EGFR 및 HER2, 또는 HER2 및 HER3일 수 있다. 바람직하게는, HER2 및 EGFR 또는 HER3, 뿐만 아니라 베타셀룰린 또는 암피레귤린의 발현을 측정한다. 상기 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레귤린의 발현에 대해 단독으로 시험되거나, 또는 둘 이상의 HER 수용체의 발현에 대해 조합하여 시험될 수 있다. 확인된 유전자(들)의 양성 발현은 환자가 HER 항체, 예컨대 페르투주마브를 사용하는 치료법에 후보자임을 나타낸다. 더욱이, 유전자

(들)의 양성 발현은 환자가 이러한 양성 발현을 갖지 않은 환자보다 HER 항체를 사용하는 치료법에 더 우호적으로 반응하기 쉬움을 나타낸다.

[0293] mRNA 또는 단백질의 발현의 다양한 측정 방법은 유전자 발현 프로파일링, 실시간 정량적 PCR (qRT-PCR)을 비롯한 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 마이크로어레이 분석, 유전자 발현 직렬 분석 (SAGE), 매스어레이(MassARRAY), 양적 평행 서명 서열분석에 의한 유전자 발현 분석법(Gene Expression Analysis by Massively Parallel Signature Sequencing; MPSS), 프로테오믹스, 면역조직화학 (IHC) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 mRNA를 정량한다. 이러한 mRNA 분석은 바람직하게는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술을 이용하여 또는 마이크로어레이 분석으로 수행된다. PCR을 이용하는 경우에, PCR의 바람직한 형태는 실시간 정량적 PCR (qRT-PCR)이다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 상기 나타낸 유전자의 발현이 예를 들어 동일한 종양-유형의 다른 샘플과 비교하여 중간 이상인 경우에 상기의 발현은 양성 발현으로 평가된다. 중간 발현 수준은 유전자 발현을 측정하면서 동시에 본질적으로 결정될 수 있거나, 또는 이전에 결정될 수 있다

[0294] 유전자 발현을 측정하는 다양한 예시적인 방법인, RNA 공급원으로서 고정, 파라핀-포매 조직을 이용하는 mRNA 단리, 정제, 프라이머 연장 및 증폭을 포함하는 프로파일링 유전자 발현에 대한 대표 프로토콜 단계가 다양한 공개 저널 기사로 제시되어 있다 (예를 들어: 문헌 [Godfrey et al. *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000)]; [Specht et al., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)]). 요약하면, 대표적인 방법은 파라핀-포매 종양 조직 샘플의 약 10 마이크로그램 두께 절편을 절단하여 시작한다. 이어서, RNA를 추출하고, 단백질 및 DNA를 제거한다. RNA 농도를 분석한 후에, 경우에 따라 RNA 복구 및/또는 증폭 단계를 포함할 수 있으며, 유전자 특이적 프로모터를 이용하여 PCR을 수행함으로써 RNA를 역전사한다. 상기 데이터를 분석하여 조사된 종양 샘플에서 확인된 특정적인 유전자 발현 패턴을 기초로 하여 환자에게 이용할 수 있는 최상의 치료법 선택권을 확인한다.

[0295] (iv) HER 발현 및 증폭

[0296] 암에서 HER 발현 또는 증폭을 측정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석법이 이용가능하다. 한 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.

[0297] 스코어 0 염색이 관찰되지 않거나, 막 염색이 종양 세포의 10% 미만으로 관찰된다.

[0298] 스코어 1+ 희미한/빈약하게 인식가능한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과로 검출된다. 세포는 그의 막의 일부에서만 염색된다.

[0299] 스코어 2+ 약한 내지 중간의 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.

[0300] 스코어 3+ 중간 내지 강한 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.

[0301] 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.

[0302] HER2를 과발현하는 종양은 세포당 발현된 HER2 분자의 카피의 수에 상응하는 면역조직화학 스코어에 의해 등급화될 수 있으며, 생화학적으로 측정될 수 있다.

[0303] 0 = 0 내지 10,000 카피/세포,

[0304] 1+ = 약 200,000 이상 카피/세포,

[0305] 2+ = 약 500,000 이상 카피/세포,

[0306] 3+ = 약 2,000,000 이상 카피/세포.

[0307] 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)]).

[0308] 별법으로, 또는 부가적으로, 인폼(INFORM)(상표명) (미국 아리조나주에 소재하는 벤타나(Ventana)에서 판매) 또는 파트비젼(PATHVISION)(상표명) (미국 일리노이주에 소재하는 바이시스(Vysis))과 같은 FISH 분석법을 포르말

린-고정 파라핀을 넣은 종양 조직 상에서 수행하여 종양 내의 HER2 과발현의 정도 (있다면)를 측정할 수 있다.

[0309] 한 실시양태에서, 암은 EGFR을 발현하는 (및 과발현할 수 있는) 것일 것이며, 이러한 발현은 상기 설명된 바와 같이 HER2 발현을 평가하는 방법으로 평가될 수 있다.

[0310] HER 수용체 또는 HER 리간드 과발현 또는 증폭은 또한 예를 들어 검출될 문자에 결합하는 문자 (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.

#### IV. 제약 제제

[0312] 본 발명의 조성물의 치료 제제는 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 조성물을 혼합함으로써 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)]) 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 용량 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; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 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; 폴리비닐파롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 칼레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 트ween (TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 들 수 있다. 동결건조된 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있으며, 이는 참고로 본원에 명백하게 포함된다.

[0313] 치료제 용도의 바람직한 페르투주마브 제제는 20 mM 히스티딘 아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0) 중 30 mg/mL 페르투주마브를 포함한다. 또 다른 페르투주마브 제제는 25 mg/mL 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl 완충액, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0)를 포함한다.

[0314] 본원의 제제는 또한 치료될 특정 증상에 필요한 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 보충적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. HER 항체와 결합할 수 있는 다양한 약물은 하기 치료 방법 색션에서 기재된다. 이러한 문자는 전쥬게이트시키려는 의도 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 존재한다.

[0315] 활성 성분은 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀젼에서, 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 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0316] 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 γ-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.

[0317] 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성된다.

#### V. HER 항체의 치료법 및 용량

[0319] 고정 용량의 HER 항체로 치료할 수 있는 다양한 암의 예는 상기 정의 색션에 나타나 있다. 바람직한 암 징후는 난소암; 복막암; 난관암; 전이성 유방암 (MBC)을 비롯한 유방암; 비-소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한 폐암; 전립선암; 직장결장암; 및/또는 HER 발현, 증폭 및/또는 활성화를 나타내는 암을 포함한다. 한 실시양태에서, 치료되는 암은 화학요법-내성 암 또는 백금-내성 암이다. 항체의 고정 용량의 투여는 암 징후 또는 증상에서 개

선될 것이다.

[0320]

암 이외에, 본원에서 개시되는 HER 항체의 고정 용량은 다양한 비-악성 질환 또는 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 이러한 비-악성 질환 또는 장애는 자가면역성 질환 (예, 건선; 상기 정의 참조); 자궁내막증; 피부경화증; 재협착증; 폴립, 예컨대 결장 폴립, 비강 폴립 또는 위장관 폴립; 섬유선종; 호흡기 질환 (상기 정의 참조); 담낭염; 신경섬유종증; 다낭성 신장 질환; 염증성 질환; 건선 및 피부염을 비롯한 피부 장애; 혈관 질환 (상기 정의 참조); 혈관 상피 세포의 비정상인 증식에 관련된 상태; 위장관 궤양; 메네트리에병(Menetrier's disease), 분비성 선종 또는 단백질 소실 증후군; 신 장애; 혈관형성 장애; 안구 질환, 예컨대 노화 관련 황반변성, 추정 안구 히스토플라마증 증후군, 증식성 당뇨병성 망막변증으로 인한 망막 혈관신생, 망막 혈관화, 당뇨병성 망막변증 또는 노화 관련 황반 변성; 골 관련 병리학증, 예컨대 골관절염, 구루병 및 골다공증; 대뇌 혀 혈성 사건에 따른 손상; 섬유성 또는 부종 질환, 예컨대 간 경변증, 폐 섬유증, 유암종증, 갑상선염, 전신성 고점조도 증후군, 오슬러 베버-렌두(Osler Weber-Rendu) 질환, 만성 폐색 폐 질환, 또는 화상에 따른 부종, 외상, 방사선, 뇌졸중, 저산소증 또는 혀혈; 피부의 과민성 반응; 당뇨병성 망막변증 및 당뇨병성 신장병증; 길랑-바레 증후군; 이식 편대 숙주 질환 또는 이식 거부; 파젯트병(Paget's disease); 골 또는 관절 염증; 광노화 (예, 인간 피부의 UV 방사선으로 인함); 양성 전립선 비대; 아데노바이러스, 한타바이러스, 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 예르시니아 종(*Yersinia spp.*) 및 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*)로부터 선택된 미생물 병원균을 비롯한 특정 미생물 감염; 혈소판 응집으로 인한 혈전; 재생성 상태, 예컨대 자궁내막증, 난소 과자극 증후군, 전자간증, 기능부전 자궁 출혈 또는 불규칙파다월경; 유후막염; 죽종; 급성 및 만성 신장병증 (증식성 사구체신염 및 당뇨병-유도된 신 질환을 포함함); 습진; 비후성 반흔 형성; 내독소 쇼크 및 진균 감염; 가족성 선종증 폴립증; 신경변성 질환 (예, 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 망막색소변증, 척수 근육 위축증 및 소뇌 변성); 골수이형성 증후군; 재생 불량성 빈혈; 혀혈성 손상; 폐, 신장 또는 간의 섬유증; T-세포 매개 과민성 질환; 영아 비후성 유문 협착증; 요로 폐쇄성 증후군; 건선성 관절염; 및 하시모또 갑상선염을 포함한다. 본원에서 치료를 위해 바람직한 비-악성 장후는 건선, 자궁내막증, 피부경화증, 혈관 질환 (예, 재협착증, 아테롬성 동맥 경화증, 관상 동맥 질환 또는 고혈압), 결장 폴립, 섬유선종 또는 호흡기 질환 (예, 천식, 만성 기관지염, 기관지확장증 또는 낭성 섬유증)을 포함한다.

[0321]

HER 항체는 공지된 방법에 따라, 예컨대 정맥내 투여, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 시간에 걸친 지속적인 주입에 의해, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 동맥내, 유후막내, 수막강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여한다. 상기 항체의 정맥내 투여가 바람직하다.

[0322]

질환의 예방 또는 치료를 위해, HER 항체의 고정 용량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 질환의 종류, 질환의 중증도 및 과정, 상기 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료법, 환자의 임상적 병력 및 상기 항체에 대한 반응, 및 참여하는 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0323]

고정 용량은 적합하게는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 바람직하게는 고정 용량은 HER 항체 약 20 mg 내지 약 2000 mg의 범위에 존재한다. 예를 들어, 고정 용량은 HER 항체 약 420 mg, 약 525 mg, 약 840 mg 또는 약 1050 mg일 수 있다.

[0324]

일련의 고정 용량이 투여되는 경우에, 이들은, 예를 들어 약 매주마다, 약 2주마다, 약 3주마다 또는 약 4주마다 투여할 수 있으나, 바람직하게는 약 3주마다 투여할 수 있다. 고정 용량은, 예를 들어 질환 진행, 부작용 발생 또는 의사가 결정한 다른 시간 때까지 투여를 지속할 수 있다. 예를 들어, 약 2회, 3회 또는 4회, 약 17회 이하 또는 그 이상의 고정 용량을 투여할 수 있다.

[0325]

한 실시양태에서, 상기 항체의 하나 이상의 부하 용량을 투여하고, 이어서 상기 항체의 하나 이상의 유지 용량을 투여한다. 또 다른 실시양태에서, 다수의 동일한 고정 용량을 환자에게 투여한다.

[0326]

본 발명의 한 바람직한 실시양태에 따라, HER 항체 (예, 페르투주마브)의 고정 용량 약 840 mg (부하 용량)을 투여하고, 이어서 상기 항체의 하나 이상의 용량 약 420 mg (유지 용량)을 투여한다. 유지 용량은 바람직하게는 총 2개 이상의 용량, 17개 이하 또는 그 이상의 용량에 대해 약 3주마다 투여한다.

[0327]

본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, HER 항체 (예, 페르투주마브)의 하나 이상의 고정 용량 약 1050 mg을 예를 들어 3주마다 투여한다. 상기 실시양태에 따라, 하나 또는 둘 이상의 고정 용량은 예를 들어 1년 이하 (17회) 및 경우에 따라 그 이상 동안 투여한다.

[0328]

또 다른 실시양태에서, HER2 항체 (예, 페르투주마브)의 고정 용량 약 1050 mg을 부하 용량으로 투여하고, 이어서 상기 항체의 하나 이상의 유지 용량 약 525 mg을 투여한다. 상기 실시양태에 따라 약 하나 또는 둘 이상의

유지 용량을 3주마다 환자에게 투여할 수 있다.

[0329] 따라서, 본 발명은 고정 용량이 페르투주마브 약 420 mg, 약 525 mg, 약 840 mg 또는 약 1050 mg인 하나 이상의 고정 용량의 페르투주마브를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 인간 환자에서의 암의 치료 방법을 제공한다.

[0330] 상기 질환이 암인 경우에, 환자는 바람직하게는 HER 항체와 하나 이상의 화학요법제(들)의 조합물로 치료한다. 바람직하게는 하나 이상의 화학요법제는 항대사물 화학요법제, 예컨대 겸시타빈이다. 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, 항대사물 화학요법제는 HER 항체의 투여 전에, 또는 후에 투여될 수 있다. 상기 실시양태에서, 항대사물 화학요법제의 하나 이상의 투여와 HER 항체의 하나 이상의 투여 사이의 시간은 바람직하게는 대략 1개월 이하, 가장 바람직하게는 대략 2주 이하이다. 별법으로, 항대사물 화학요법제 및 HER 항체는 단일 제제 또는 별개 제제로 환자에게 동시에 투여된다. 화학요법제 (예, 항대사물 화학요법제, 예컨대 겸시타빈)와 HER 항체 (예, 페르투주마브)의 조합은 상승적인, 또는 상가적인 것 초과의 치료 효과를 환자에게 생성시킬 수 있다.

[0331] 화학요법제가 투여될 경우, 이는 통상적으로 이를 위한 공지된 용량으로 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. 항대사물 화학요법제가 겸시타빈인 경우에, 바람직하게는 이는 약  $600 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $1250 \text{ mg}/\text{m}^2$  (예를 들어 약  $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$ )의 용량으로, 예를 들어 3주 주기의 제1일 및 제8일에 투여한다.

[0332] HER 항체 및 항대사물 화학요법제 이외에, 다른 치료 요법제가 함께 조합될 수 있다. 예를 들어 제2 (제3, 제4 등)의 화학요법제(들)이 투여될 수 있으며, 여기서 제2 화학요법제는 또 다른 상이한 항대사물 화학요법제 또는 항대사물이 아닌 화학요법제이다. 예를 들어, 제2 화학요법제는 탁산 (예컨대 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 카페시타빈 또는 백금-기재 화학요법제 (예컨대 카르보플라틴, 시스플라틴 또는 옥살리플라틴), 안트라시클린 (예컨대 리포좀 독소루비신을 비롯한 독소루비신), 토포테칸, 페메트렉세드, 빙카 알칼로이드 (예컨대 비노렐빈) 및 TLK 286일 수 있다. 상이한 화학요법제의 "각테일"을 투여할 수 있다.

[0333] HER 항체와 조합될 수 있는 다른 치료제는 제2의 상이한 HER 항체 (예를 들어, 성장 억제성 HER2 항체, 예를 들어 트리스투주마브, 또는 HER2-파발현 세포의 아폽토시스를 유도하는 HER2 항체, 예를 들어 7C2, 7F3 또는 그의 인간화 변이체); 또 다른 종양 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); 시토킨; EGFR-표적화된 약물 (예를 들어 타르세바 (TARCEVA)(등록상표), 이레사(IRESSA)(등록상표) 또는 세툭시마브); 항-헬관형성제 (특히 제넨테크에서 상표명 아바스틴(AVASTIN)(상표명)으로 판매하는 베바시주마브); 티로신 키나제 억제제; COX 억제제 (예를 들어 COX-1 또는 COX-2 억제제); 비-스테로이드성 항염증성 약물, 셀레콕시브 (셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (예를 들어, 존슨 앤드 존슨(Johnson and Johnson)에서 시판되는 티피파르니브/자르네스트라(ZARNESTRA)(등록상표) R115777 또는 쇼링-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 백(Auto Vac) 백신, 또는 덴드레온(Dendreon)의 APC8024 단백질 백신, 또는 GSK/코릭사(Corixa)의 HER2 웨პ티드 백신); 또 다른 HER 표적화 요법 (예를 들어 트리스투주마브, 세툭시마브, 게피티니브, 애를로티니브, CI1033, GW2016 등); Raf 및/또는 ras 억제제 (예를 들어, WO 2003/86467 참조); 독소루비신 HCl 리포좀 주사 (독실(DOXIL)(등록상표)); 토포이소머라제 I 억제제, 예컨대 토포테칸; 탁산; HER2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 억제제, 예컨대 라파티니브/GW572016; TLK286 (텔시타(TELCYTA)(등록상표)); EMD-7200; 구역질을 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 아세트아미노펜, 디펜히드라민 또는 메페리딘; 조혈 성장 인자 등 중 임의의 1종 이상을 포함한다.

[0334] 임의의 상기 공동투여되는 제제의 적합한 용량은 현재 사용되는 것이며, 제제 및 HER 항체의 조합된 작용 (상승 작용)에 기인하여 보다 낮아질 수 있다.

[0335] 상기 치료 처방 이외에, 환자에게 암 세포의 외과적 제거 및/또는 방사선 요법을 가할 수 있다.

[0336] 바람직하게는, 투여되는 상기 항체는 네이키드 항체이다. 그러나, 투여되는 항체는 세포독성제와 컨쥬게이션될 수 있다. 바람직하게는, 결합된 이뮤노컨쥬게이트 및/또는 항원은 세포에 의해 내재화되어 이것이 결합하는 암

세포를 사멸시키는 이뮤노컨쥬게이트의 증가된 치료 효능을 생성시킨다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포 내의 핵산을 표적화하거나 간섭한다. 이러한 세포독성제의 예는 마이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 포함한다.

[0337] 항체 단백질의 투여 이외에, 본 출원은 유전자 요법에 의한 항체 또는 단백질 억제제의 투여가 고려된다. 예를 들어, 세포내 항체를 생성시키는 유전자 요법의 이용에 관한, 1996년 3월 14일자로 공개된 WO 96/07321을 참조한다.

[0338] 생체내 및 생체외에서 핵산 (임의로 벡터내에 함유됨)을 환자 세포로 도입시키는 2가지의 주요 접근법이 존재한다. 생체내 전달을 위해, 핵산을 환자의 항체가 필요한 부위에서 직접적으로 주입한다. 생체외 치료에서, 환자 세포를 제거하고, 핵산을 상기의 단리된 세포로 도입시키고, 변형된 세포를 환자에게 직접적으로, 또는 예를 들어 환자로 이식되는 다공질 막 내에 캡슐화시켜 투여한다 (예, 미국 특히 제4,892,538호 및 동 제5,283,187호 참조). 핵산을 살아있는 세포로 도입시키는데 이용가능한 다양한 기술이 존재한다. 상기 기술은 핵산이 시험관내 또는 생체내에서 의도되는 숙주의 세포의 배양된 세포로 전달되는가에 따라 달라진다. 핵산의 시험관내 포유동물 세포로의 전달에 적합한 기술은 리포좀, 전기천공, 미세주입, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산칼슘 침전법 등의 이용을 포함한다. 유전자의 생체외 전달을 위해 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

[0339] 현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터 (예컨대, 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스 제I 바이러스 또는 아데노-관련 바이러스) 및 지질-기저 시스템 (예를 들어, 유전자의 지질-매개 전달에 유용한 지질은 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 이용하는 형질감염을 포함한다. 특정 상황에서, 표적 세포를 표적하는 작용제, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 즉 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 갖는 핵산 공급원을 제공하는 것이 바람직하다. 리포좀을 사용하는 경우에, 세포내이입에 관련되는 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정 세포 종류에 향하는 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 세포 주기 동안 내재화되는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 위치를 표적화하여 세포내 반감기를 증대시키는 단백질을 표적화하기 위해, 및/또는 흡수를 촉진시키기 위해 사용할 수 있다. 수용체-매개 세포내이입의 기술은 예를 들어 문헌 [Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)]; 및 [Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 현재 공지된 유전자 표지 및 유전자 요법 프로토콜의 개관을 위해, 문헌 [Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992)]을 참조한다. 또한, WO 93/25673 및 여기에서 인용된 문헌들을 참조한다.

## VI. 제품

[0341] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기된 암 또는 다른 장애의 치료에 유용한 물질을 함유한 제품이 제공된다. 제품은 고정 용량의 HER 항체를 함유한 바이알, 및 임의로 패키지 사용 설명서를 포함한다. 상기 바이알은 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성할 수 있으며, 시린지가 관통하는 마개로 밀봉할 수 있다. 예를 들어, 바이알은, 다이쿄 그레이(DAIKYO GREY)(상표명) 플루오로-수지 적층 마개 및 20 mm의 플립 상부 알루미늄 캡을 갖는 통상적인 유리병 제I형 유리 바이알 (예, 420 mg 고정 용량을 위한 20 cc 바이알 또는 1050 mg 고정 용량을 위한 50 cc 바이알)일 수 있다. 제품은 상업적인 사용자 입장으로부터 바람직한 다른 재료 (다른 완충액, 희석제, 여과기, 니들 및 시린지 등을 포함함)를 추가로 포함할 수 있다.

[0342] 바람직한 실시양태에서, 제품은 고정 용량이 HER 항체 약 420 mg, 약 525 mg, 약 840 mg 또는 약 1050 mg인 고정 용량의 HER 항체 (예, 페르투주마브)를 함유한 바이알을 포함한다.

[0343] 제품은 바람직하게는 패키지 사용 설명서를 추가로 포함한다. 패키지 사용 설명서는 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암, 직장결장암을 포함하나 이에 한정되지 않는 암 환자에게 고정 용량을 투여하기 위한, 및/또는 환자의 암이 HER 발현, 증폭 및/또는 인산화를 나타내는 암 환자에게 고정 용량을 투여하는 것에 대한 지시서를 제공할 수 있다.

[0344] 한 실시양태에서, 제품은 제1 바이알이 페르투주마브의 고정 용량 약 840 mg을 함유하고, 제2 바이알이 페르투주마브의 고정 용량 약 420 mg을 함유하는 것인 2개의 바이알을 포함한다.

[0345] 또 다른 실시양태에서, 제품은 제1 바이알이 페르투주마브의 고정 용량 약 1050 mg을 함유하고, 제2 바이알이 페르투주마브의 고정 용량 약 525 mg을 함유하는 것인 2개의 바이알을 포함한다.

## VII. 물질의 기탁

[0347] 하기 하이브리도마 세포주를 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불바드 10801에 소재하는 아메리

칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁하였다.

[0348] 항체 지칭 ATCC 번호 기탁일

[0349] 7C2 ATCC HB-12215 1996년 10월 17일

[0350] 7F3 ATCC HB-12216 1996년 10월 17일

[0351] 4D5 ATCC CRL 10463 1990년 5월 24일

[0352] 2C4 ATCC HB-12697 1999년 4월 8일

[0353] 본 발명의 보다 상세한 사항은 하기 비-제한적 실시예에 의해 설명된다. 본 명세서의 모든 인용문에 대한 개시는 특별히 본원에 참고로 도입된다.

#### 실시예 1

[0355] 본 실시예는 HER 항체 페르투주마브에 대한 집단 약동학 (PK) 및 예측되는 공변수를 평가하며, 고정, 신체 중량-기준 또는 BSA-기준 용량 투여 후에 항정-상태 최저 혈청 농도의 변이율을 조사하였다. 페르투주마브를 체중-기준 용량 (0.5 내지 5 mg/kg) 또는 고정 용량 (420 mg 또는 1050 mg)으로 정맥내 주입 (q3 주)으로 투여하였다. 153명의 환자 및 1458개의 농도-시간 지점을 포함하는 Ia기 및 II기 임상실험으로부터의 페르투주마브 혈청 농도 데이터 (난소 및 유방)를 상호작용 (FOCE 상호작용) 방법으로 1차 조건부 평가를 갖는 논증(NONMEM)(상표명)을 사용하는 상기 분석을 위해 통합하였다. 선형 2-구획 모델은 최상으로 데이터를 설명하였다. 체중, 혈청 알부민 및 혈청 알칼리 포스파타제는 제거율 (CL)에 영향을 미치는 유의적인 공변수이고, 신체-표면적 (BSA)은 중심 구획에서 분산 부피에 영향을 미치는 유의적인 변수이다. 최종 모델에서, CL 및 Vc는 각각 0.214 L/일 및 2.74 L였다. 체중만이 CL에 대한 환자간 변이율 8.3%를 설명하였다. 사후 예측 확인을 이용하는 최종 집단 PK 모델의 평가는 우수한 성능을 나타냈다. 고정 용량에 비해, 체중- 및 BSA-기준 용량 투여는 최종 모델을 이용한 원래 데이터세트로부터 부트스트랩된 1000명의 대상체 중에서 항정-상태 최저 농도의 집단 변이율이 단지 각각 6.2% 및 5.8%만 감소되었다. 모의치료는 또한 표적 20 mcg/mL 미만의 예측된 항정-상태 최저 농도를 갖는 대상체 비율이 고정 용량 투여, 체중-기준 용량 투여 또는 BSA-기준 용량 투여에 따라 유사한 것으로 나타났다. 인간화 항체가 전형적으로 체중에 의해 투여되지만, 본 실시예의 분석은 암을 치료하는데 고정 용량을 사용하는 HER 항체, 페르투주마브를 투여하는 것이 바람직함을 입증한 것으로 결론지었다.

#### 발명

#### 연구 및 환자

[0358] 본 발명의 분석에 사용되는 세 개의 모든 연구는 참가하는 기관의 고유 윤리 위원회의 승인을 받았다. 모든 환자로부터 문서화된 동의서를 받았다.

[0359] 제1 연구는 진행성 고형 악성 종양을 갖는 대상체에게 단독 작용제로서 정맥내로 투입한 경우의 페르투주마브의 안전성, 내성, 약동학 프로파일을 평가하는 개방형 다기관 용량-증가 연구(open-label, multicenter, dose-escalation study)이었다. 이를 환자는 페르투주마브 용량을 3주마다 제1 주기 동안 90분 정맥내 주입, 이어서 후속 주기에서 30분 주입으로 투여받았다. 3 또는 6명의 대상체로 이루어진 코호트에서, 최대 허용량 (MTD)이 정의되거나 또는 최고 복용량 수준에 도달할 때까지 용량을 증가시켰다 (0.5, 2, 5, 10 및 15 mg/kg). 치료의 제1 주기 동안 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 혈청 샘플을 일련의 시점에서 수집하였다: 투여 전, 정맥내 주입의 말미, 제1.5시간, 제4시간, 제9시간에, 제2일, 제5일, 제8일, 제15일에. 제2 치료 주기 동안, 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 투여 전, 정맥내 주입 시작 후 제29분, 및 제8일에 혈청 샘플을 수집하였다.

[0360] 제2 연구는 예전의 화학요법에 대해 불응성이었거나 재발한 진행성 난소암 환자에서 페르투주마브의 효능에 대해 전반적인 효능, 안전성, 내성과 종양-기준 HER2 활성화를 평가하는 II기 개방형 단일-아암 다기관 실험 (phase II, open-label, single-arm, multicenter trial)이었다. 이를 여성은 페르투주마브를 단독 제제로 제1 주기 동안 90분 기간에 걸쳐 고정 용량 840 mg에 이어 후속 치료 주기 동안 유지용량으로 420 mg를 30분 주입으로 전달되도록 정맥내 투여받았다. 제1 및 제2 치료 주기 동안에 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 투여 전, 주입 완료 후 제15분, 제8일 및 제15일에 혈청 샘플을 수집하였다. 후속의 치료 주기 동안에 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 추가 투여 전 및 주입 완료 후 제15분에 혈청 샘플을 수집하였다.

[0361] 제3 연구는 HER2 발현이 낮은 전이성 유방암 환자를 대상체에 대해 단독 제제로 페르투주마브를 두 가지의 상이한 용량으로 주입하는 경우의 효능 및 안전성을 평가하는 II기 개방형 단일-아암 다기관 무작위 연구(Phase II,

open label, single-arm, multicenter randomized study)이었다. 제1 코호트에서, 환자들에게 페르투주마브를 제1 주기 동안 90분간 부하 용량 840 mg, 이어서 후속 치료 주기 동안 3주마다 30분간 유지 용량 420 mg을 정맥내 투여하였다. 제2 코호트에서, 환자들에게 페르투주마브를 제1 주기 동안 90분간 1050 mg, 이어서 후속 치료 주기 동안 3주마다 30분간 1050 mg을 정맥내 투여하였다. 제3 연구에서는 처음 두 치료 주기 동안 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 투여 전, 주입 완료 후 제15분, 제8일 및 제15일에 혈청 샘플을 수집하였다. 후속 치료 주기 동안에 페르투주마브 농도를 측정하기 위해 투여 전과 주입 완료 후 제15분에 추가 혈청 샘플을 수집하였다.

### [0362] 약물 분석

[0363] 혈청 페르투주마브 농도는 수용체-결합, 효소-연결, 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 결정되었다. 분석에는 p185HER2 세포와 도메인을 이용해 혈청 샘플로부터 페르투주마브를 포획하였다. 결합된 페르투주마브는 마우스 항-인간 Fc-호스라디쉬 퍼록시다제 (HRP) (잭슨 이뮤노리서치 래보라토리즈, 인크.(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.))로 검출되었고, 혈청 페르투주마브의 정량을 위한 발색 기질로 테트라메틸 벤지딘 (TMB) (KPL, Inc.)를 이용했다. 상기 분석의 인간 혈청 내 페르투주마브의 최소 정량 농도는 0.25 mcg/mL였다.

### [0364] 집단 약동학 분석

[0365] NM-TRAN 및 PREDPP을 갖는 NONMEM(상표명)(센 프란시스코 소재의 빌크만 앤드 베얼 논멘(상표명) 유저 가이드 (Boeckmann and Beal NONMEM(상표명) User Guide): NONMEM(상표명) Project Group, University of California, San Francisco (1994)) 소프트웨어 (버전 V, 레벨 1.0), 및 콤팩 비주얼 포트란 콤팩파일러(Compaq Visual Fortran compiler; 버전 6.5)를 이용해 집단 비-선형 혼합-효과 모델링을 수행하였다. 정맥내 주입을 이용한 2개의 상이한 기본 구조 모델, 즉 1-구획 및 2-구획 선형 PK 모델을 혈청 페르투주마브 농도-시간 데이터에 맞추었다. 모델-빌딩 절차 전반에 걸쳐 1차 조건부 평가 (FOCE) 방법 및  $n - \epsilon$  상호작용을 사용했다.

[0366] PK 파라미터에 대한 개체간 변이율을 설명하기 위해 지수 오차 모델(exponential error model)을 사용하였다:

$$\hat{P}_i = \hat{P}_i \exp(\eta_{ip})$$

(1)

[0367] 승법 공변수 회귀 모델(multiplicative covariate regression model)은 하기와 같이 나타낸다:

$$\hat{P}_i = \theta_1 \left( \frac{X_i}{\text{med}(X)} \right)^{\theta_X} (1 + \theta_D D)$$

(2)

[0368]  $\eta_{ip}$ 는 i번째 개별 환자의 "참" 파라미터 ( $P_i$ ) 및 집단의 대표치 ( $\hat{P}_i$ )의 비례 차이를 나타내며, 상기 개별 환자와 같은 공변수 값으로 조절되었다.  $\eta_{ip}$ 는 평균 제로(mean zero) 및 분산  $\omega^2$ 를 갖는 무작위 효과이다.  $\theta_X$ 와  $\theta_D$ 는 각각 연속적인 (예, WT) 또는 2분법 (예, 성별 및 인종) 공변수로 평가되는 회귀 계수이다. 연속적인 변수는 이들의 중앙값 (med (X))에 중심이 있어서,  $\theta_1$ 이 중앙값 공변수를 갖는 전형적인 환자의 제거율 추정치를 나타내게 한다. 2분법 공변수는 0 또는 1로 부호화한다 (예, 성별=0은 여성, 성별=1은 남성; 인종=0은 백인, 인종=1은 기타). 잔여 변이율은 비율-부가 오차 범위로 모델링하였다:

$$C_{pij} = p_{ij} \left( \hat{C}_{pij} \left( 1 + \varepsilon_{ij,prop} \right) + \varepsilon_{ij,add} \right)$$

[0369] 여기서  $C_{pij}$  와  $\hat{C}_{pij}$ 는 i번째 사람에 대해 각각 j번째로 측정되고 모델-예측된 농도이고,  $\varepsilon_{ij,prop}$  및  $\varepsilon_{ij,add}$ 는 제로 평균 및 분산  $\sigma_{prop}^2$  및  $\sigma_{add}^2$ 로 분포된 비례적이고 부가적인 잔여 개체간 무작위 오차를 나타낸다.

[0370] PK 파라미터와 개별 공변수의 구조 모델-기준 베이지안(Bayesian) 추정치 간의 관계는 그래프적으로 조사하였다. 예비 조사 분석을 기초로 하여, PK 파라미터에 대한 각 공변수의 효과를 시험하였다. 초기에, 개별 PK 파라미터에 대한 공변수의 효과 (즉, 중심 구획의 제거율 및 부피)를 조사하였다. 따라서, 개별 PK 파라

미터에 대한 전체 공변수 모델은 유의적인 공변수를 상기 모델로 도입함으로써 작도된다. 후진 제거법을 이용하여 상기 모델에서 유의적인 공변수만을 보존함으로써 각 개별 PK 파라미터에 대한 최종 공변수 모델을 결정하였다. 고도로 상관된 공변수가 유사한 약리학적 의미 (예컨대 체중 및 BSA)를 갖는 경우에, 단지 가장 유의적인 요인만이 상기 모델에서 보존된다. 따라서, 각 PK 파라미터에 대해 수득된 이러한 최종 공변수 모델을 조합하여 신규한 완전한 모델을 형성하고, 후진 제거법을 이용하여 최종 집단 PK 모델을 정교하게 고안하였다.

[0374] 또 다른 구조 모델의 비교 및 공변수 모델의 작도는 대표적인 적합도(goodness-of-fit) 진단 플롯 및 우도비 검정(likelihood ratio test)을 기초로 하였다. 또 다른 계층형 모델과 비교하는 경우에, 객관적 함수의 값의 차이는 n 자유도 (n은 완전한 모델과 감소된 모델 사이에서 개수 또는 파라미터의 차이임)로 분포된 대략 카이-제곱법이다. 이러한 접근은 FOCE-상호작용 추정법에 대해 믿을 수 있는 것임을 나타낸다 (문헌 [Wahlby et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:231-52 (2001)]). 2가지의 계층형 모델을 구별하기 위해, 7.9 (1 자유도)초과의 객관적 함수에서의 차이 ( $p<0.005$ 의 유의적인 수준에 상응함)를 사용하였다.

[0375] 주어진 PK 파라미터 (예, CL)의 회귀 모델의 공변수에 의해 설명되는 개체간 분산 (% 분산)의 분획이 하기와 같이 계산되었다.

$$\% \text{ 변이율} = \left( \frac{\omega_{\text{CL, 기저}}^2 - \omega_{\text{CL, 최종}}^2}{\omega_{\text{CL, 기저}}^2} \right) \times 100 \quad (3)$$

[0377] ( $\omega_{\text{CL, 기저}}^2$  및  $\omega_{\text{CL, 최종}}^2$ 은 각각 기저 및 PK 모델에서 제거율의 개체간 분산을 나타냄).

### 집단 약동학 모델 평가

[0379] 상기 연구의 모델 평가는 부트스트랩 리샘플링 기술을 이용하여 최종 모델의 안정성을 평가하고 파라미터의 신뢰 구간을 평가하였다. 상기 모델 평가 기술은 논멘(상표명) (N 홀포드(N Holford), 버전 404, 2003년 6월, 뉴질랜드 오클랜드 소재)에 대하여 소프트웨어 패키지 윙즈(Wings)의 부트스트랩을 이용하여 제1 생성 데이터세트로 구성되므로 반복 데이터세트 각각에 대한 파라미터 추정치를 수득하였다. 1000개의 성공적인 실행으로부터의 결과를 수득하고, 집단 파라미터에 대한 평균 및 2.5번째 및 97.5번째 백분위수 (95% 신뢰 구간을 표시)를 측정하여 원래 데이터의 추정치와 비교하였다.

[0380] 또한, 측정 데이터를 설명하기 위하여 사후 예측 모델 확인을 이용함으로써 최종 모델의 능력을 평가하였다 (문헌 [Yano et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:171-92 (2001)]; [Gelman and Meng, Model checking and model improvement. In: Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ, eds. *Markov Chain Monte Carlo in Practice*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 189-202 (1996)]; [Gelman et al. *Bayesian Data Analysis*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC (2004)]). 이러한 분석에서, 측정 데이터의 2.5번째, 5번째, 10번째, 25번째, 50번째 (중앙값), 75번째, 90번째 및 95번째 백분위수를 컴퓨터로 계산하고 사후 예측 모델 확인에 대해 검정 통계로서 선별하였다. 최종 고정 및 무작위-효과 파라미터를 포함하는 최종 집단 PK 모델을 이용하여 측정 데이터의 1000개의 반복물을 자극하고, 이들 자극된 데이터 세트 각각으로부터 검정 통계를 컴퓨터로 계산하였다. 이어서, 모의 데이터세트로부터 검정 통계의 사후 예측 분포를 측정 검정 통계와 비교하고, 모의 데이터세트로부터의 검정 통계를 하기 식에 따라 측정한 검정 통계의 인식값을 초과하는 경우의 비율을 계산함으로써  $p$ -값 ( $p^{\text{PPC}}$ )을 평가할 수 있다 (상기 문헌 [Gelman and Meng, (1996)]).

$$p^{\text{PPC}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{1000} I(T(y_i^{\text{rep}}, \theta) \geq T(y, \theta_i)) \quad (1)$$

[0382] (상기 식에서,  $I(\cdot)$ 은 그의 독립변수가 진실이면서 0인 경우에 값 1을 갖는 지표 함수(indicator function)이고,  $T(y, \theta)$ 는 측정 데이터  $y$ 에 인식되기 때문에 측정 검정 통계의 '인식값'이고,  $T(y_i^{\text{rep}}, \theta_i)$ 는 모의 데이터세트  $i$ 로부터의 검정 통계임. (상기 문헌 [Gelman and Neng, (1996)]).

[0383] 또한, 모의 데이터의 2.5번째, 5번째, 95번째 및 97.5번째 분위수를 개별 환자에 대한 각 시점에 대해 계산하였다. 통합 모의 데이터의 2.5번째 및 95.5번째 분위수 (95% 간격), 5번째 및 95번째 분위수 (90% 간격)의 경계 내에 속한 측정한 데이터 수를 측정하였다.

[0384] 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 후의 페르투주마브 노출

[0385] 최종 집단 PK 모델을 이용하여 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 후에 항정 상태 최저 농도 및 노출을 측정하였다. 원래 PK 데이터세트를 (치환하여) 부트스트랩핑함으로써 수득된 데이터세트를 사용하여 최종 모델을 이용하는, 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 요법을 위해 1000명의 대상체에 대한 혈청 농도-시간 프로파일 및 페르투주마브의 제거를 자극시켰다. 모든 모의 대상체에게 제0일에 90분에 걸쳐 840 mg, 12.2 mg/kg 또는 485 mg/m<sup>2</sup> 정맥 주입으로 투여하고, 이어서 제21일, 제42일 및 제63일에 30분에 걸쳐 420 mg, 6.1 mg/kg 또는 242.5 mg/m<sup>2</sup> 정맥 주입으로 투여하였다. 이어서, 상이한 용량 투여 요법을 평가한 후에, 항정 상태 최저 농도 (Css<sub>최저</sub>)를 제84일에 수득하였다. 또한, 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 후의 표적 농도 (20 mcg/ml) 미만의 항정 상태 최저 농도를 갖는 대상체의 백분율을 계산하였다. 자극된 제거값을 이용하여 하기 식에 따라 항정 상태 평균 노출(AUC<sub>ss0-t</sub>)을 결정하였다:

$$AUC_{ss0-t} = \frac{\text{투여량}}{CL} \quad (4)$$

#### 결과

[0388] 인구통계학적 데이터. 이번 PK 분석에 포함된 환자들의 인구학적 특징은 표 2에 나타나 있다.

**표 2**

본 발명의 분석에 포함된 환자들의 인구학적 특징		
	중앙값	범위
연령 (년수)	56.0	32.0 - 78.0
BSA * (m <sup>2</sup> )	1.73	1.40 - 2.53
체중 (kg)	69.0	45.0 - 150.6
알부민 (g/L)	39.2	21.0 - 52.0
알칼리 포스파타제 (ALK) (IU/L)	107.0	39.0 - 367.0
	환자 수	%
성별		
남성	8	5.2
여성	145	94.8
인종		
백인	141	92.2
아프리카계 미국인	3	2.0
라틴아메리카계	4	2.6
아시아인	3	2.0
원주민 인디언	0	0
기타	2	1.3

\*BSA, 신체 표면적

[0390] 3개의 연구에서 153명의 환자로부터 총 1458개의 페르투주마브 혈청 농도 시점을 수집했다. 전체에서 환자 18명은 Ia기 실험으로부터, 60명은 II기 난소암 실험으로부터 수집하였다. 따라서, 이번 분석의 환자의 대부분분 (94.8%)이 여성되었고, 혈청 페르투주마브 농도 데이터의 1110개 (76%)를 차지했다. 모든 대상체는 FISH (형광 계내 혼성화) 분석법으로 확인된 낫은 HER2 발현 종양을 갖고 있었으며, 0 또는 1의 ECOG (동부 공동종양학 그룹; Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태에 의해 나타낸 바와 같이 우수한 신체 기능 상태를 가졌다. 공변수가 없는 환자의 수는 매우 낮았으며 (신장 및 BSA에 대해 4.6 %), 공변수가 없는 경우에는 중앙값으로 귀속시켰다. 표본 수집 일자만 기록되어 있는 384개(20.8%)의 혈청 페르투주마브 농도 샘플에서는 샘플링 시간을 12시 정오로 귀속시켰다. 이렇게 귀속시킨 시간이 집단 파라미터 예측치에 미치는 영향에 대해 평가하

기 위해 감수성 분석을 실행하였으나 상당한 영향이 나타나지 않았다.

[0391] **집단 PK 분석.** 객관적 함수의 변화 ( $\delta=-736.2$ ) 및 진단 플롯을 기준으로 2-구획 모델이 1-구획 모델 보다 데이터를 더 잘 설명했다. 1-구획 및 2-구획 모델에 적합한 대표적인 혈청 페르투주마브 농도-시간 프로파일은 9a 및 9b에 예시되어 있다. 상기  $n$  용어의 제거가 객관적 함수에서 통계적으로 유의적인 증가 ( $\delta < 7.88$ )를 초래하지 않았기 때문에 K12의 개체간 변이율 용어 ( $n$ )는 2-구획 모델에서 제거하였다. 따라서, 최종 기저 모델에는  $n_{CL}$ ,  $n_{Vc}$  및  $n_{K21}$ 만이 보존되었다.

[0392] 다음으로  $n_{CL}$ ,  $n_{Vc}$  와  $n_{K21}$ 에서 공변수 용어의 존재의 영향을 평가하였다.  $n_{CL}$ ,  $n_{Vc}$  및  $n_{K21}$ 에서 공변수 용어의 도입은 적합성 ( $\delta=-23.2$ ,  $df=3$ )을 향상시켰다. 그러나 공변수 용어는 평가가 잘 되지 않는 것으로 밝혀졌으며 ( $%CV > 100$ ), 평가되는 상호 연관성이 적으며 ( $r_{CL-Vc}=0.37$ ;  $r_{CL-K21}=0.27$ ;  $r_{Vc-K21}=0.42$ ), 파라미터 평가에 미치는 영향이 적은 것으로 나타났다 (데이터 나타내지 않음). 따라서, 공변수 영향 모델 빌링을 위해 공변수 용어를 보존시키지 않았다. 최종 기저 모델을 이용한 탐구 분석에선 잠재적인 공변수와  $n_{K21}$ 사이에 명확한 관계가 확인되지 않았다. 따라서, 공변수와 최종 모델의 진전 동안  $n_{K21}$ 에 대한 공변수 영향은 관찰되지 않았다.

[0393] 공변수가 있는 최종 모델에서 예측된 대 관찰된 혈청 페르투주마브 농도, 및 각종 잔여치 대 예측된 혈청 농도 플롯을 도 10a 내지 10b에 나타냈다. 최종 모델에서 혈청 알부민(ALB), 체중(BW) 및 혈청 알칼리 포스파타제(ALKP)이 페르투주마브 제거(CL)의 개체간 변이율을 설명해 주는 가장 중요한 공변수였다. BSA는 분포(Vc)의 페르투주마브 중심 구획 부피의 개체간 변이율을 설명하는 가장 중요한 공변수였다.  $n_{CL}$ ,  $n_{Vc}$  와  $n_{K21}$ 에서 공변수 용어의 도입은 적합성 ( $\delta=-14.0$ ,  $df=3$ )을 향상시켰다. 그러나, 평가되는 상호 연관성은 크지 않았으며 ( $r_{CL-Vc}=0.45$ ;  $r_{CL-K21}=0.28$ ;  $r_{Vc-K21}=0.39$ ), 파라미터 평가는 영향을 받지 않았다 (데이터 나타내지 않음). 따라서, 공변수 용어를 최종 모델에 포함시키지 않았다. 최종 모델은 하기와 같이 예시하였다:

$$CL = \theta_{CL} \times \left(\frac{WT}{69}\right)^{\theta_{WT\_CL}} \times \left(\frac{ALB}{39.2}\right)^{\theta_{ALB\_CL}} \times \left(\frac{ALKP}{107}\right)^{\theta_{ALKP\_CL}} \quad (4)$$

$$Vc = \theta_{Vc} \times \left(\frac{BSA}{1.72}\right)^{\theta_{BSA\_Vc}} \quad (5)$$

[0395] 최종 모델의 파라미터 추정치는 표 3에 요약되어 있다.

**표 3**

부트스트랩 유효화 절차를 이용한 최종 집단 약동학 모델 및 파라미터의 안정성의 파라미터 추정치		
	원래 데이터세트	1000 부트스트랩 복제물
	추정치 (%RSE) <sup>a</sup>	평균 (95% CI)
<b>구조 모델</b>		
CL (L/일)	0.214 (3.1)	0.214 (0.201, 0.228)
Vc (L)	2.740 (1.9)	2.739 (2.640, 2.840)
K12 (일 <sup>-1</sup> )	0.203 (16.6)	0.220 (0.159, 0.416)
K21 (일 <sup>-1</sup> )	0.258 (15.6)	0.275 (0.203, 0.480)
<b>개체간 변이율</b>		
CL %CV	31.1 (11.0)	30.6 (27.0, 34.1)
Vc %CV	16.2 (20.3)	16.0 (12.7, 19.2)
K <sub>21</sub> %CV	25.2 (37.6)	24.1 (11.4, 33.6)

공변수 모델		
CL에 대한 ALB ( $\Theta_{ALB\_CL}$ )	-1.010 (18.4)	-1.019 (-1.420, -0.632)
CL에 대한 WT ( $\Theta_{WT\_CL}$ )	0.587 (19.3)	0.589 (0.372, 0.826)
CL에 대한 ALKP ( $\Theta_{ALKP\_Vc}$ )	0.169 (29.5)	0.170 (0.067, 0.258)
Vc에 대한 BSA ( $\Theta_{BSA\_Vc}$ )	1.160 (12.2)	1.151 (0.890, 1.451)
잔여 변이율		
비례 오차 $\sigma_{prop}^2$	0.037 (19.4)	0.037 (0.030, 0.045)
부가 오차, $\sigma_{prop}$ , mcg/mL	2.265 (77.8)	2.24 (0.002, 4.160)
a. %RSE: 추정치의 백분율 상태 표준 오차 = SE/파라미터 추정치 $\times 100$		

[0398] 분석 집단의 혈청 페르투주마브의 CL은 0.214 L/일로 평가되었고 Vc는 2.74 L였다.  $K_{12}$  및  $K_{21}$ 는 각각 0.203과 0.258 일<sup>-1</sup>였다. 최종 모델의 CL과 Vc에 대한 개체간 변이율은 개체간 변이율( $\omega^2$ )의 제곱근으로 계산하며, %CV로 표현하고, 공변수가 없는 기저 모델의 38.0 % 와 20.8 %와 비교했을 때 각각 31.1% 와 16.2%이다. 따라서 최종 모델에서 ALB, WT 및 ALKP의 공변수 영향이 CL의 개체간 변이율의 약 33%에 대한 설명이 되었다. 그러나 체중만으로 CL의 개체간 변이율의 약 8.3%에 대한 설명이 되었다. 최종모델에서 BSA의 공변수 영향은 Vc의 개체간 변이율의 약 39%에 대한 설명이 되었다. 기저 모델에서 WT에 대한 CL의 의존성, 및 BSA에 대한 Vc의 의존성은 도 11a 내지 11b에서 나타낸 바와 같이 최종 모델에서 설명된다. 추정되는  $t_{1/2\alpha}$  와  $t_{1/2\beta}$ 는 각각 제1.4일 와 제17.2일이다.

[0399] 모델 평가. 원래의 데이터세트로부터 1000회의 성공적인 부트스트랩 실행을 얻어서 원래 관찰된 데이터와 비교할 수 있었다. 부트스트랩 과정을 통해 얻은 평균 집단 PK 추정치는 원래 데이터 세트의 파라미터 추정치와 유사하였으며 (표 3), 이는 개발된 모델이 안정적임을 나타냈다. 고정-효과 파라미터의 95% 신뢰도 구간은 좁았으며, 이는 정확도가 우수함을 나타냈다.

[0400] 측정된 데이터를 설명하는 능력을 평가하기 위해 사후 예측 모델 검사가 사용되었다. 1000개의 복제물을 모의 실험하기 위해 고정 및 무작위-효과 파라미터를 포함하는 최종 집단 약동학 모델 모델이 사용되었다. 1000개의 모의 데이터세트 각각에 대해 실험 통계치를 계산했다. 도 12a 내지 12f는 선택된 실험 통계의 1000개의 모의 값의 히스토그램을 보여주고 있는데, 관찰된 실험 통계의 인식된 값 수직 선에 의해 표시되었다. 사후 예측 분포는 관찰된 값에 가까웠고 추정된  $p$ -값은 각 실험 통계보다 0.05 커다. 또한, 통합 모의 데이터의 0% 및 95% 분위수 범위 내에 측정된 페르투주마브 농도의 백분율은 각각 89.3 및 94.7%였다. 이를 결과는 상기 모델이 데이터를 합리적으로 잘 설명하고 예측할 수 있음을 제시하였다.

#### 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 후의 페르투주마브 노출

[0402] 제84일의 예측된 페르투주마브 항정-상태 최저 혈청 농도 ( $C_{ss,최저}$ )는 방법 섹션에 나타난 용량 스케줄에 따라 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여를 이용하여 원래 PK 데이터세트 및 최종 모델로부터 부트스트랩된 1000명의 자극 대상체에 대해 평가하였다. 이를 데이터는 체중-기준 및 BSA-기준 용량 투여를 고정 용량 투여와 비교하는 경우에 (도 13 및 표 4),  $C_{ss,최저}$ 의 집단 변이율이 각각 6.17 및 5.76%로 감소되었음을 나타냈다.

#### 표 4

최종 모델에 따른 원래 PK 데이터세트로부터 부트스트랩된 1000명의 모의 대상체에 대한 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여 후 예측 페르투주마브 항정 상태 최저 농도 (제84일)			
	C <sub>ss</sub> 최저 (mcg/ml) 고정 용량	C <sub>ss</sub> 최저 (mcg/ml) 중량-기준 용량	C <sub>ss</sub> 최저 (mcg/ml) BSA-기준 용량
최소	2.68	2.39	2.54
5번째 백분위수	16.56	16.32	16.86
중앙값	51.87	51.81	52.48
평균	56.37	56.08	56.44
95번째 백분위수	115.38	110.46	112.14
최대값	209.67	179.06	192.00

%CV	54.05	52.62	52.40
분산	928.21	870.93	874.71
고정 용량 <sup>a</sup> 으로부터 변화된 % 분산	-	-6.17	-5.76
C <sub>ss,최저</sub> ≤ 20 mcg/ml를 갖는 대상체의 백분율	8.3	8.7	8.3
고정 용량으로부터 변화된 <sup>a</sup> 백분율 분산은 하기 식을 이용하여 계산됨:			
$\text{백분율 분산 변화율} = \frac{\text{분산 WT 또는 BSA - 기준 용량}}{\text{분산 고정 용량}} \times 100$			

[0404] 20 mcg/ml의 표적 혈청 농도 미만의 C<sub>ss,최저</sub>를 갖는 대상체 백분율은 고정 용량 투여, 체중-기준 용량 투여 및 BSA-기준 용량 투여에 대해 각각 8.3%, 8.7% 및 8.3%의 값으로 유사하였다 (표 4).

[0405] 유사한 결과가 1000명의 모의 대상체에 대한 페르투주마브 혈청 항정 상태 AUC<sub>ss0-t</sub>의 분석으로부터 수득되었으며, 고정 용량 투여와 비교하여 체중-기준 및 BSA-기준 용량 투여만이 각각 2.2 및 4.2%로 집단 변이율을 감소시켰다. 동일한 모의 데이터세트를 이용하여 고정 용량 투여, 체중-기준 용량 투여 및 BSA-기준 용량 투여 후에 극한 체중 (즉, WT ≤ 10번째 및 ≥ 90번째 백분위수) (도 14a 내지 14b)을 갖는 집단에 대하여 C<sub>ss,최저</sub>를 측정하였다. 10번째 백분위수 이하의 WT를 갖는 집단에 대한 중앙값 페르투주마브 C<sub>ss,최저</sub>는 고정 용량 투여, 체중-기준 용량 투여 및 BSA-기준 용량 투여에 대해 각각 72.3 (범위: 8.7 내지 166.5), 52.8 (범위: 6.8 내지 125.7) 및 63.2 (범위: 7.8 내지 150.1) mcg/ml였다. 20 mcg/ml의 표적 혈청 농도 미만의 C<sub>ss,최저</sub>를 갖는 집단에서 대상체의 백분율은 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여에 대해 각각 5.4%, 12.6%, 및 9.0%였다. 90번째 백분위수 이상의 WT를 갖는 집단에 대한 중앙값 페르투주마브 C<sub>ss,최저</sub>는 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여에 대해 각각 42.1 (범위: 7.0 내지 119.8), 62.8 (범위: 14.4 내지 167.3) 및 52.9 (범위: 10.2 내지 133.3) mcg/ml였다. 20 mcg/ml의 표적 혈청 농도 미만의 C<sub>ss,최저</sub>를 갖는 상기 집단에서 대상체의 백분율은 고정 용량 투여, BSA-기준 용량 투여 및 체중-기준 용량 투여에 대해 각각 7.4%, 2.8% 및 5.6%였다. 유사한 결과가 1000명의 모의 대상체로부터 이들 하위군의 페르투주마브 혈청 항정 상태 AUC<sub>ss0-t</sub>의 분석에 대해 수득되었다.

## 토의

[0407] 일반적으로, 종양학에서 인간화 IgG 모노클로날 항체와 세포독성 소분자 약물은 체중-기준 (mg/kg) 또는 BSA-기준 용량 기초로 투여되어 왔다. 페르투주마브는 클리닉에서 진행암 Ia기 환자 및 난소암, 유방암, 폐암 및 전립선암 II기 환자에게 실험하였다. 페르투주마브는 I상 실험에는 체중-기준 (mg/kg)으로 투여되었고, II기 실험에는 고정 용량을 이용하여 개시하였다. 상기 세가지 실험에서 수집된 인구통계학 및 페르투주마브 농도-시간 데이터를 이용하여 페르투주마브 PK에 대한 공변수를 갖는 집단 PK 모델을 본원에서 확립하였다. 이어서, 상기 모델을 이용하여 고정 용량 투여 및 체중-기준 용량 및 BSA-기준 용량 투여 후의 항정-상태 농도를 조사하였다.

[0408] 상기 분석으로부터 수득한 페르투주마브 PK는 종양학에서 사용되는 다른 인간화 모노클로날 IgG1 약물에 대해 보고된 것과 매우 유사하다. (문헌 [Harris et al. Proc Am Soc Clin Oncol 21:488a (2002)]; [Leyland-Jones et al. J Clin Oncol 21:3965-71 (2003)]; 및 [Lu et al. Clin Pharmacol Ther 75:91 (2004)]).

[0409] 선형 2-구획 선형 PK 모델은 자료를 가장 잘 설명하였으며 최종 페르투주마브 CL은 0.214 L/일이다. 페르투주마브의 대표적인 Vc는 2.74 L 또는 약 40 ml/kg이며, 이는 인간 혈장 부피와 동일하고 다른 모노클로날 IgG1 약물에 대해 보고된 것과 일치하였다. (상기 문헌 [Harris et al. (2002)]; 및 [Lu et al. (2004)]). 페르투주마브 CL은 체중, 및 일부 민 및 알칼리 포스파제의 농도에 의해 영향을 받는 반면에, Vc는 BSA에 의해 상당한 영향을 받는다. 페르투주마브 PK에서 성별의 영향은 분석에 포함된 남성 대상체의 수 (5.2%)가 적었기 때문에 평가할 수 없다. 부트스트랩의 절차로부터의 결과 및 사후 모델 확인은 최종 모델이 안정적이며 데이터를 합리적으로 잘 설명하여 예측하게 한다는 것을 나타냈다.

[0410] CL에 대한 체중의 영향 및 Vc에 대한 BSA의 영향은 페르투주마브가 체중 또는 BSA에 기준으로 투여될 수 있음을

나타냈다. 그러나, 체중 단독 및 BSA 단독의 공변수 효과는 각각 CL과 Vc의 개체간의 효과 약 8.3% 및 40%만을 설명하였다. 이는 체중이 CL의 예견이고 BSA는 Vc에 대한 예견이지만, 투여 후의 페르투주마브 노출에 대한 체중 및 BSA의 영향은 측정될 수 있으나 고도로 기여되지는 않았다.

[0411] 따라서, 다음 단계는 모의 실험을 이용하여 페르투주마브 노출에 대한 다양한 투여 방법의 효과를 평가하였다. 원래 데이터세트로부터 부트스트랩된 1000명의 대상체에서 체중-기준 및 BSA-기준 용량 투여는 고정 용량 투여와 비교하여 제84일에서 각각 6.2와 5.8%만이 자극된 항정 상태의 최저 혈청 농도 집단 변이율을 감소시키는 것을 발견하였다. 또한, 20 mcg/mL의 선별 표적 미만의 예측된 항정-상태 최저 혈청 농도를 갖는 대상체의 백분율은 세가지 모두의 투여 방법과 유사하였다. 유사한 결과는 극한의 체중 (즉, WT ≤ 10번째 및 ≥ 90번째 백분위수)을 가진 집단의 하위군 분석으로부터 얻을 수 있었다.

[0412] 따라서, 페르투주마브 PK는 WT 및 BSA와 관계가 있다고 결론지었다. 그러나, WT 및 BSA는 CL 및 Vc의 개체간 변이율의 적은 백분율만을 설명하였으며, WT-기준 용량 투여 및 BSA-기준 용량 투여는 페르투주마브 항정 상태 노출의 예측성을 향상시키는 것 같지 않았다. 암 환자에서 페르투주마브에 대한 고정-용량 투여 요법을 적용하는 것을 권고한다.

[0413] 본 발명은 암 환자에서 항정 상태의 약물 농도에 대한 인간화 IgG1 모노클로날 항체의 체중-기준 용량 투여 또는 BSA-기준 용량 투여의 효과의 중요한 평가를 처음으로 개시한 것으로 고려된다. 균일-고정 용량 투여의 실행은 수가지의 유의적인 환자 치유 및 경제적인 암시를 갖는다: i) 단일 단위 용량의 제조, 저장 및 선적에 있어서 보다 큰 효율성으로 인한 보다 적은 비용, ii) 환자의 개별화를 필요로 하지 않는 약국과 병원에서의 단일 용량의 효과적인 제조, iii) 단일 단위 용량의 의사 처방에 있어서의 보다 큰 효율성, iv) 용량 계산 오차로 인해 잘못된 용량을 환자가 투여받을 더 낮은 가능성. 인간화 항체는 전형적으로 체중 또는 BSA에 따라 투여되지만, 본원에서의 분석은 암 환자에서 고정 용량을 이용하여 HER 항체 페르투주마브를 투여하는 것의 실현가능성을 입증하였다.

### 수탁번호

[0414]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)

수탁번호 : HB-12215

수탁일자 : 19961017

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)

수탁번호 : HB-12216

수탁일자 : 19961017

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)

수탁번호 : CRL10463

수탁일자 : 19900524

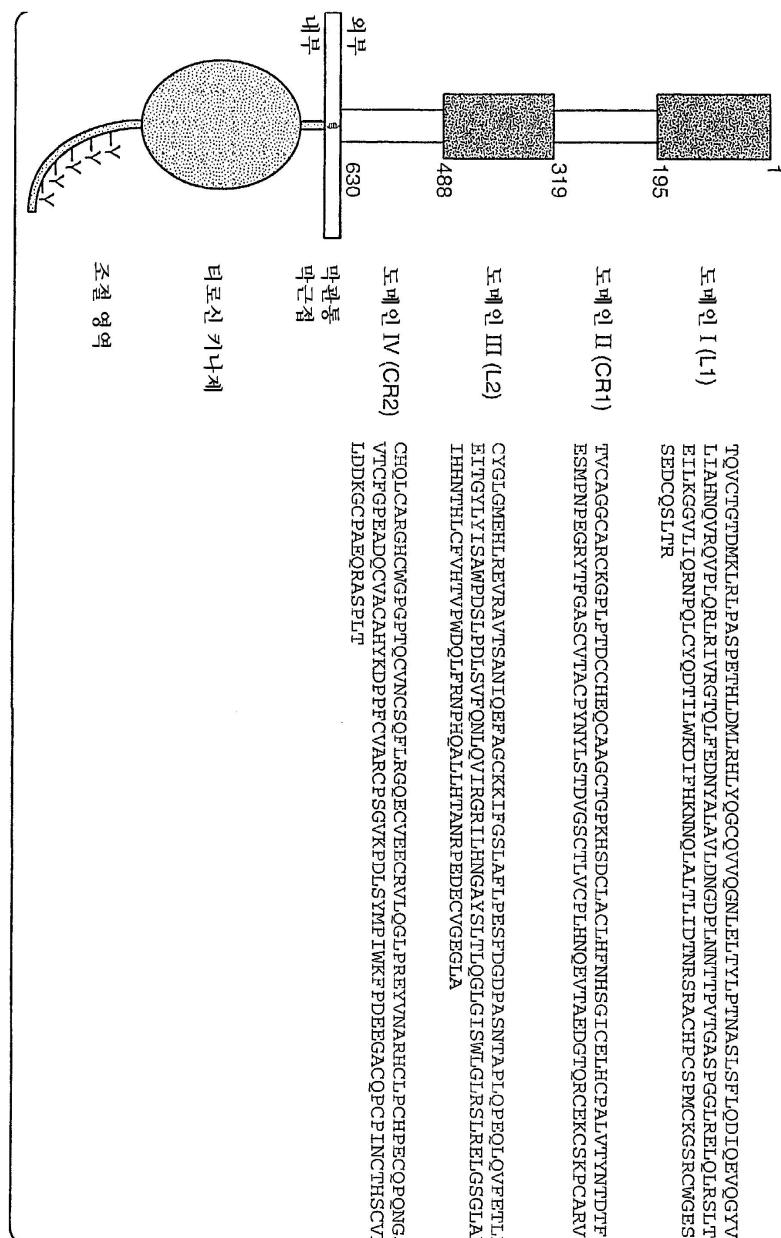
기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)

수탁번호 : HB-12697

수탁일자 : 19990408

## 도면

## 도면1



**도면2a**

## 가변 경쇄

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDV SIGVA] WYQQRP ** * * * * *			
	*			
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDV SIGVA] WYQQKP * * * *			
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSISNYLA] WYQQKP			
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSLQVA ** * * *			
574	GKAPKLLIY [SASYRYT] GPVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPA * * * * *			
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES] GPVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPA			
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]		FGGGTKLEIK (서열 1)	
	*	*	*	*
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]		FGQGTKVEIK (서열 3)	
	*** *			
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]		FGQGTKVEIK (서열 5)	

**도면2b**

## 가변 중쇄

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS ** * * * * * *			
	* *			
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA * * * *			
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA			
	50	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM * * * * *			
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL ***** *** *** * * *			
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNSKNTLYL			
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTEDETAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (서열 2) *** *			
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLTVSS (서열 4) *****			
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTLTVSS (서열 6)			

**도면3a**

## 페르투주마브 경쇄에 대한 아미노산 서열

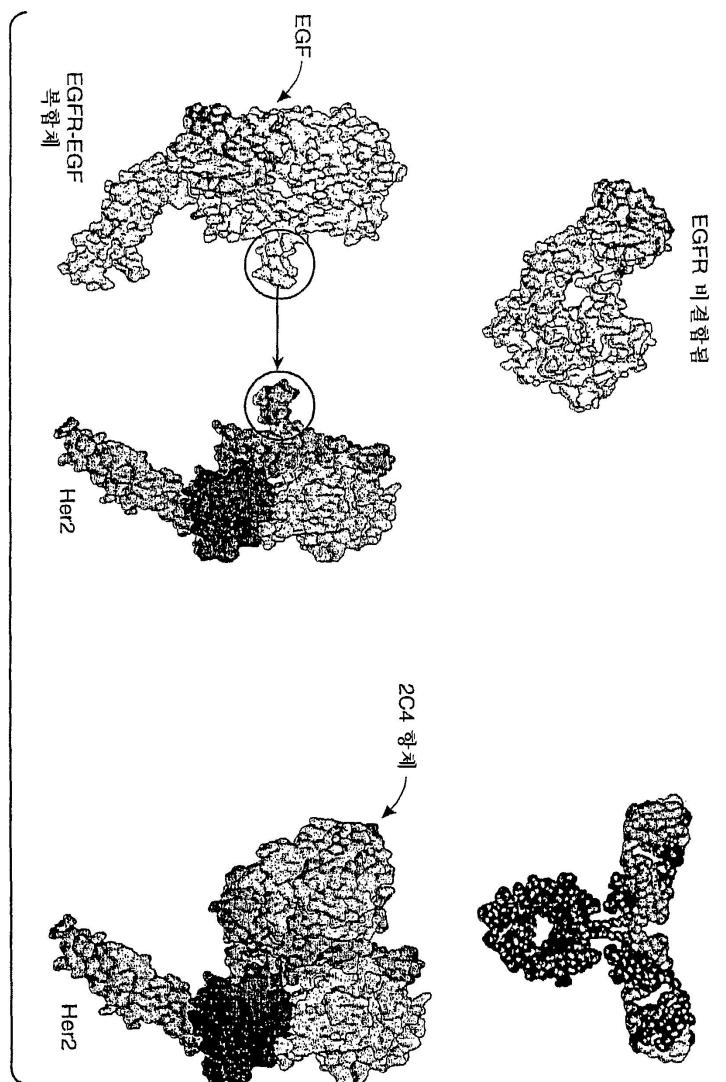
1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQDV SIGVA	WYQKPGKAPKLLIY	SASYRYTGVP			
70	80	90	100	110	120	
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQYYIYPYT	FGQGTKVEIK	RFTISRDNSKNTLYL			
130	140	150	160	170	180	
SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKV	QWKVDNALQSGNSQESVTE	QDSKDSTYSLSSTLT				
190	200	210				
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC						

## 도면3b

페르투주마브 중쇄에 대한 아미노산 서열

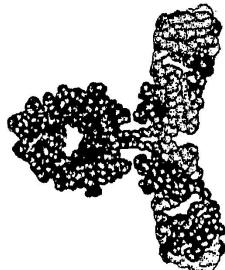
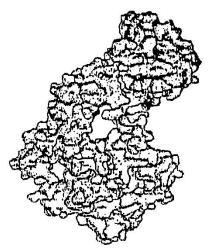
1	10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVA	DVNPNSSGGSIY					
70	80	90	100	110	120	
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA						
130	140	150	160	170	180	
STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP	PAVLQSSG					
190	200	210	220	230	240	
LYSLSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	PAPELLGGP					
250	260	270	280	290	300	
SVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN	AKTKPREEQYNS					
310	320	330	340	350	360	
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY	TLPPSREEM					
370	380	390	400	410	420	
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQ					
430	440	448				
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG						

도면4

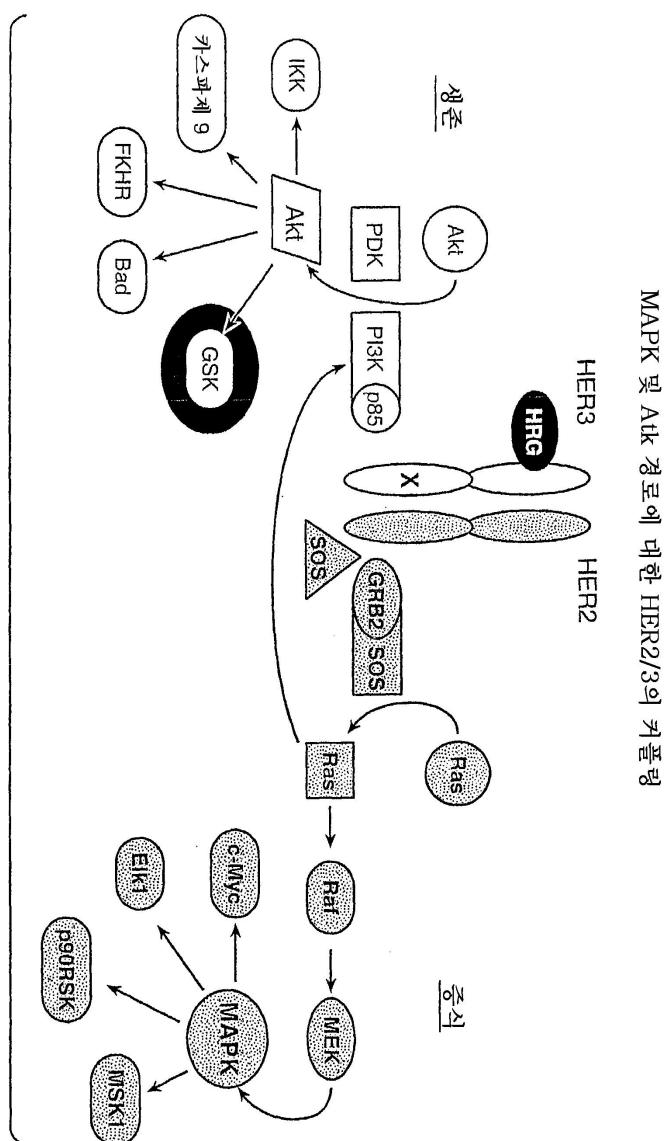


리간드-활성화된 EGFR은 이종이형체 결합 부위에서 HER2 2C4의 결합과 이종이형체화된다.

EGFR 비결합형

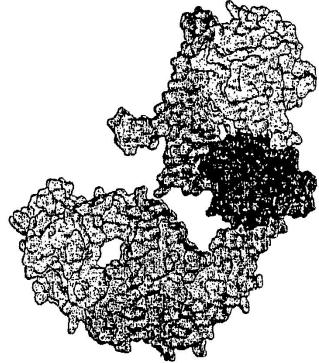


도면5



## 도면6

트라스투주마브  
헤르셉틴



페르투주마브  
온나타르그



- JM 근처에서 IV에 결합
- 수용체 탈락에 대한 보호
- 수용체 하향조절을 적당히 조절
- 조수용체로서의 HER2의 역할에 대한 약간의 효과
- 이량체화 계면에서 II에 결합
- 수용체 탈락을 방지하지 않음
- 수용체 하향조절을 적당히 조절
- 조수용체로서의 HER2의 역할에 대한 주요한 효과

### 도면7a

정식

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 Q K P G K A P K  
 15 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 Y C Q Q  
 60 75 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  
 105 120 135  
 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  
 150 165  
 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  
 195 210 214  
 180

도면7b

## 증례

1 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 F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L  
 15  
 30  
 46 E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D  
 60  
 75  
 91 T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S  
 105  
 120  
 135  
 136 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 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S  
 150  
 165  
 180  
 181 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 K P S N T K V D K K V E P K S C D K  
 195  
 210  
 225  
 226 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 T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 240  
 255  
 270  
 271 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 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D  
 285  
 300  
 315  
 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 O V Y T L P P S R E E  
 330  
 345  
 360  
 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  
 375  
 390  
 405  
 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  
 420  
 435  
 449

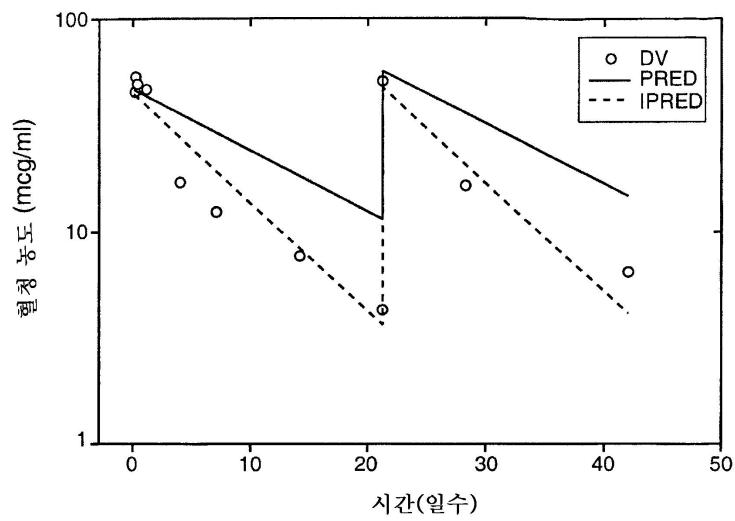
## 도면8a

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  
 15  
 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 S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y  
 60  
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T P 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 I L K S G T A S V  
 105  
 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 S  
 150  
 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  
 195  
 210  
 217

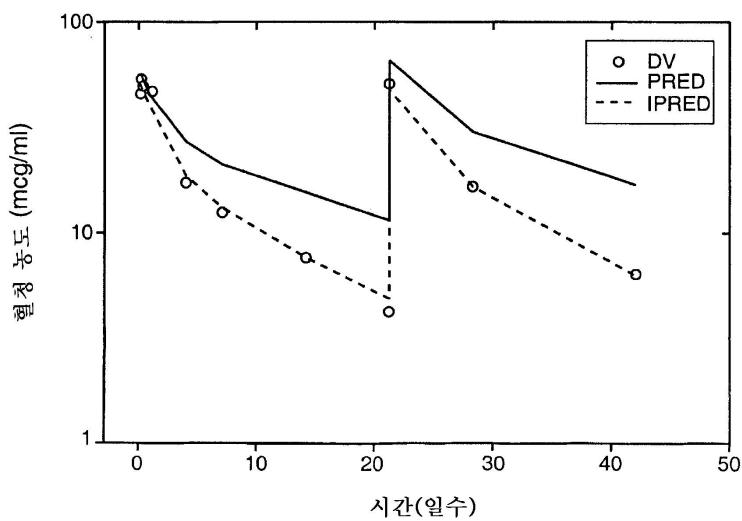
## 도면8b

1 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 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 15  
 46 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 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 60 75  
 91 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 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 105 120 135  
 136 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 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 150 165 180  
 181 L Y S L S S V V T V P S S S D 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 T 195 210 225  
 226 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 T L M I S R T P E V T C V V D V S H 240 255 270  
 271 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 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 285 300 315  
 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 330 345 360  
 361 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 E N N Y K T T P P V L D S D G S 375 390 405  
 406 F P L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F P S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 420 435 449

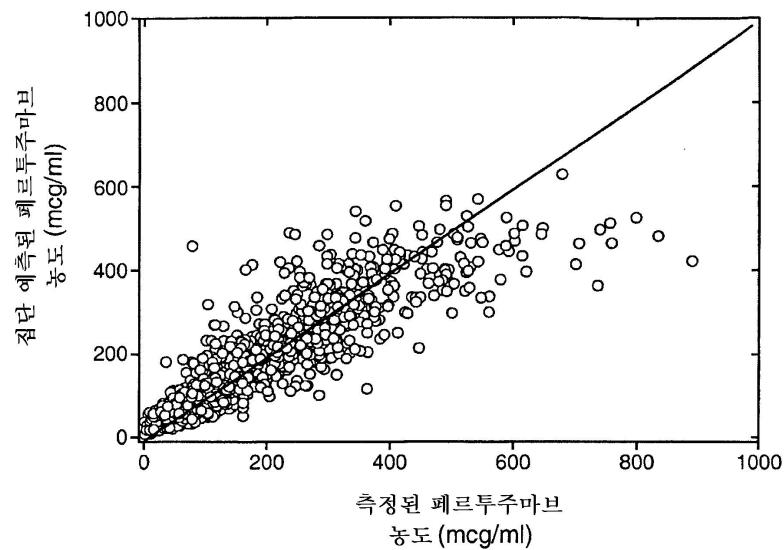
도면9a



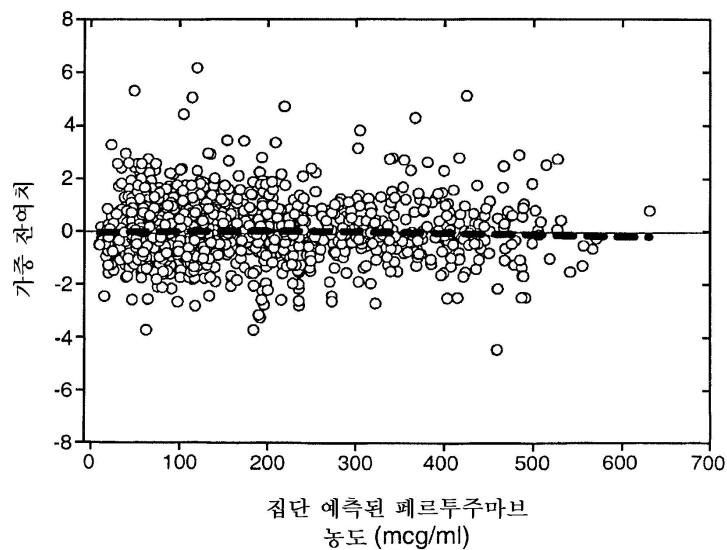
도면9b



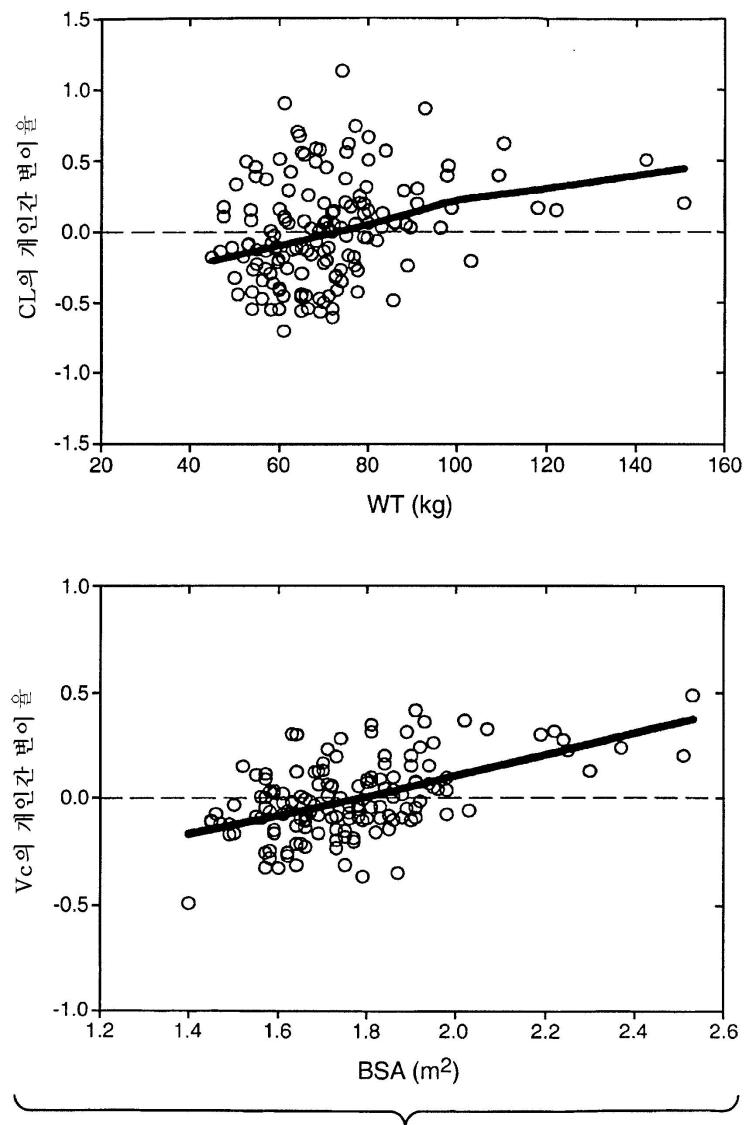
도면10a



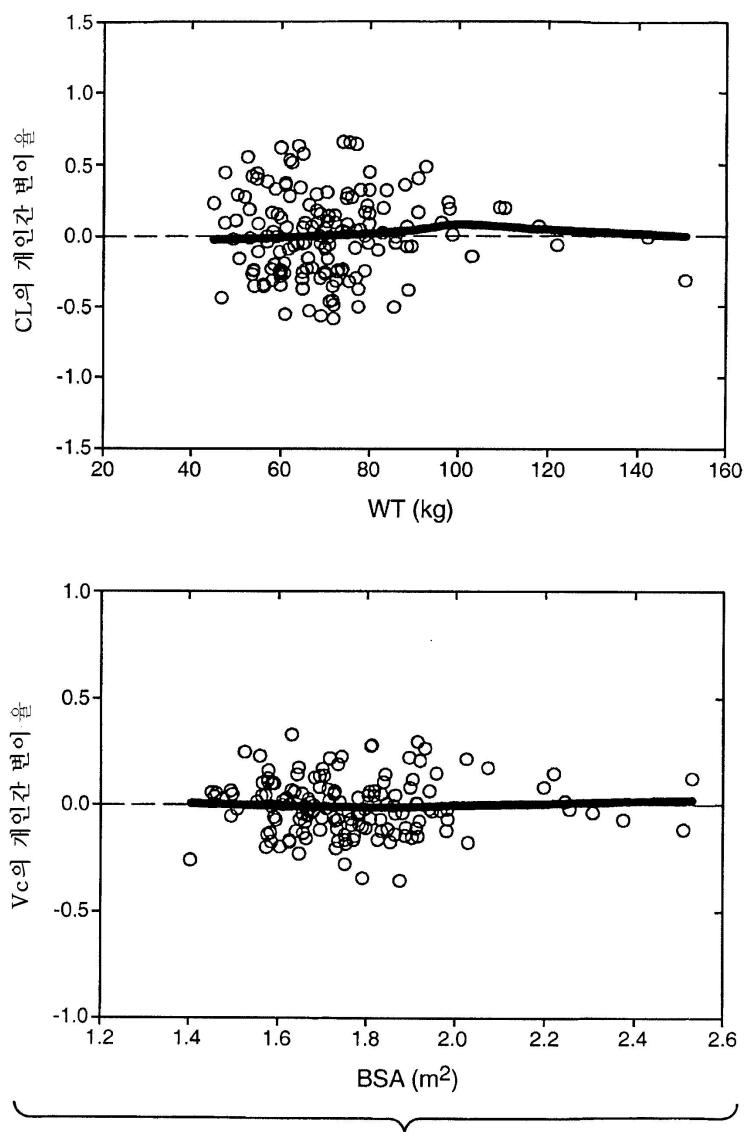
도면10b



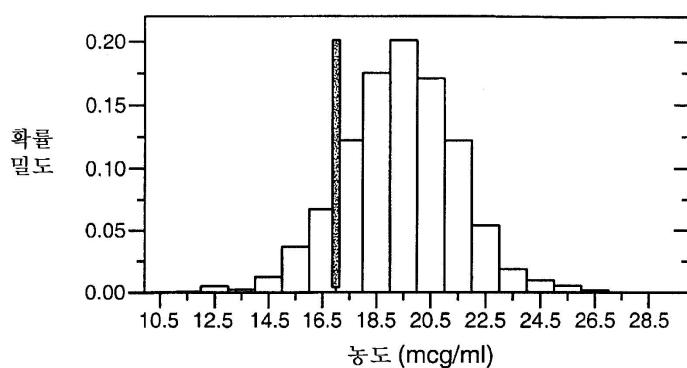
도면11a



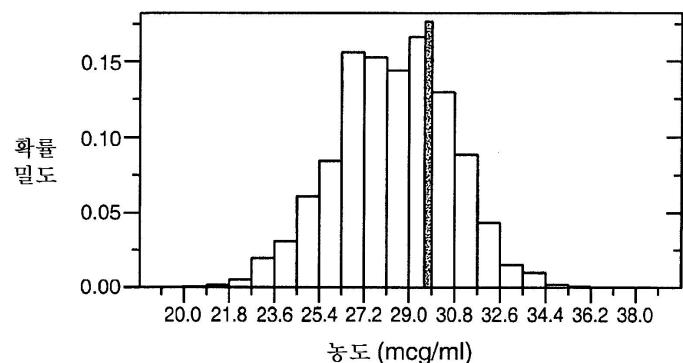
도면11b



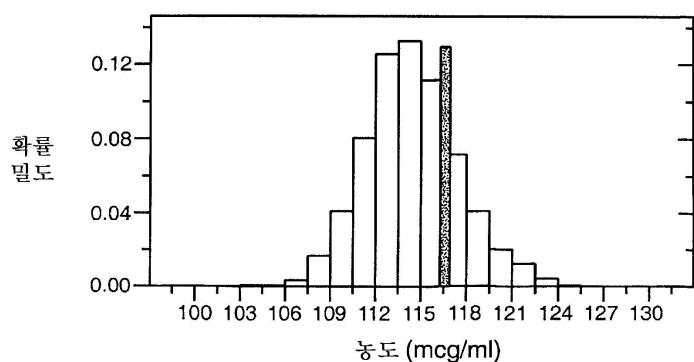
도면12a



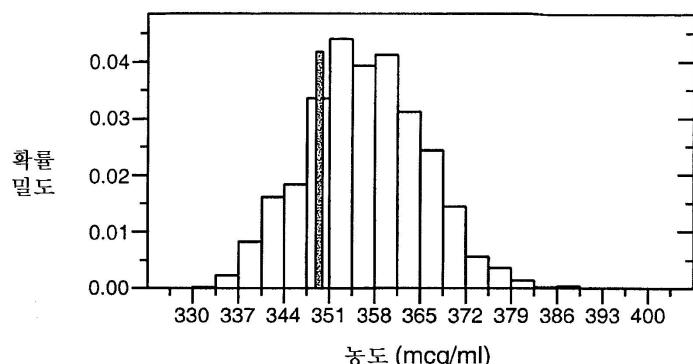
도면12b



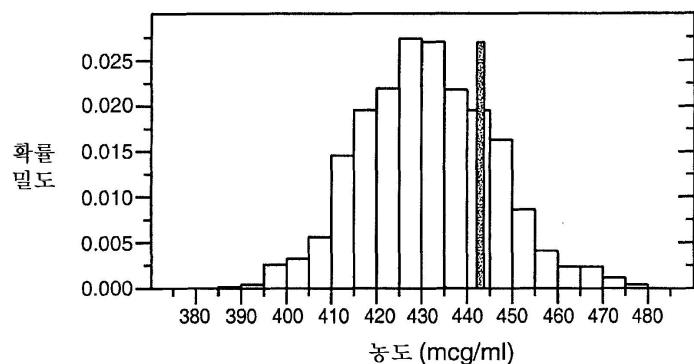
도면12c



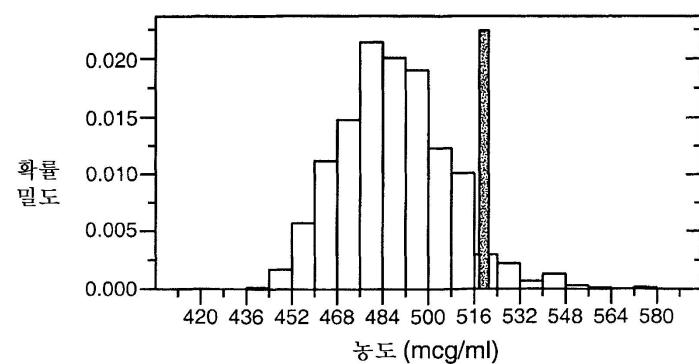
도면12d



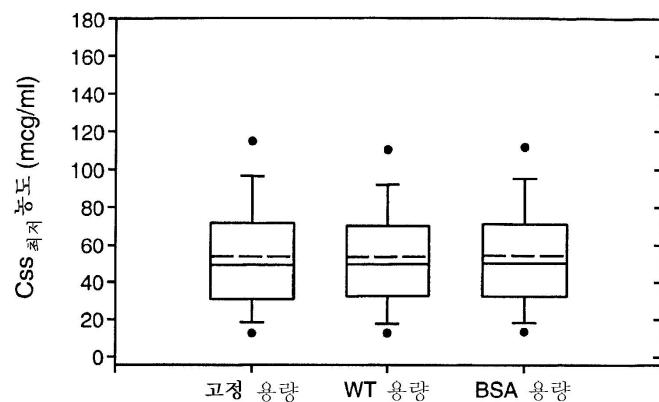
도면12e



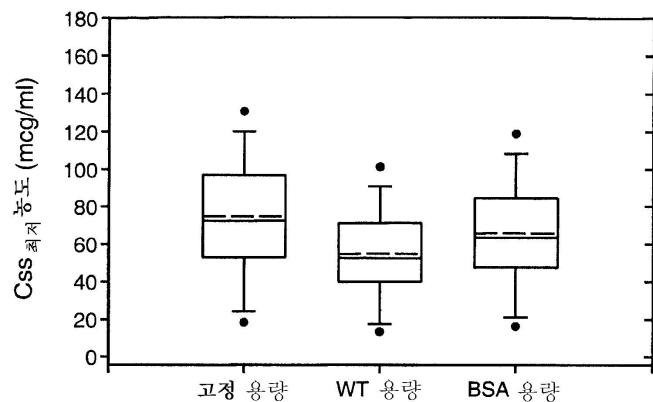
도면12f



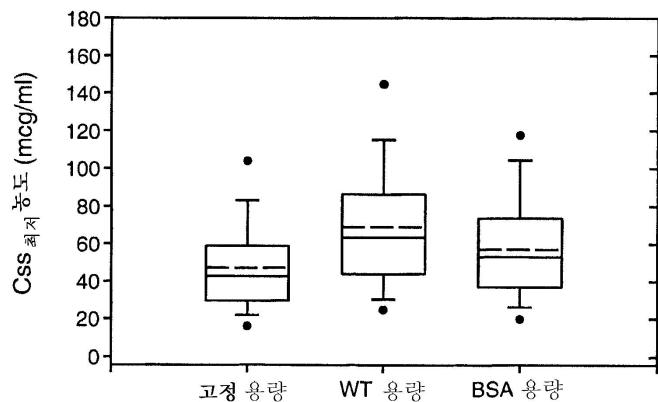
도면13



도면14a



도면14b



## 서 열 목 록

- <110> ALLISON, DAVID E.  
 BRUNO, RENE  
 LU, JIAN-FENG  
 NG, CHEE M.
- <120> FIXED DOSING OF HER ANTIBODIES
- <130> P2202R1
- <141> 2005-06-15
- <150> US 60/645,697
- <151> 2005-01-21
- <160> 22
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 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			

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; sequence is synthesized

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; sequence is synthesized

&lt;220&gt;&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 5

&lt;223&gt; Xaa is preferably R or L

&lt;220&gt;&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 6

&lt;223&gt; Xaa is preferably Y or E

&lt;220&gt;&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 7

&lt;223&gt; Xaa is preferably T or S

&lt;400&gt; 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa

5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 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 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

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 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	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
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
													80	85
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
													95	100
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala

110														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	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		
440	445	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Sequence is synthesized.

&lt;400&gt; 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 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 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro 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> 449  
 <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 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> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 17

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> 18  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223>  
Sequence is synthesized.

<400> 18  
 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	
<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
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

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 142

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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