



(12) PATENT

(19) NO

(11) 341293

(13) B1

NORGE

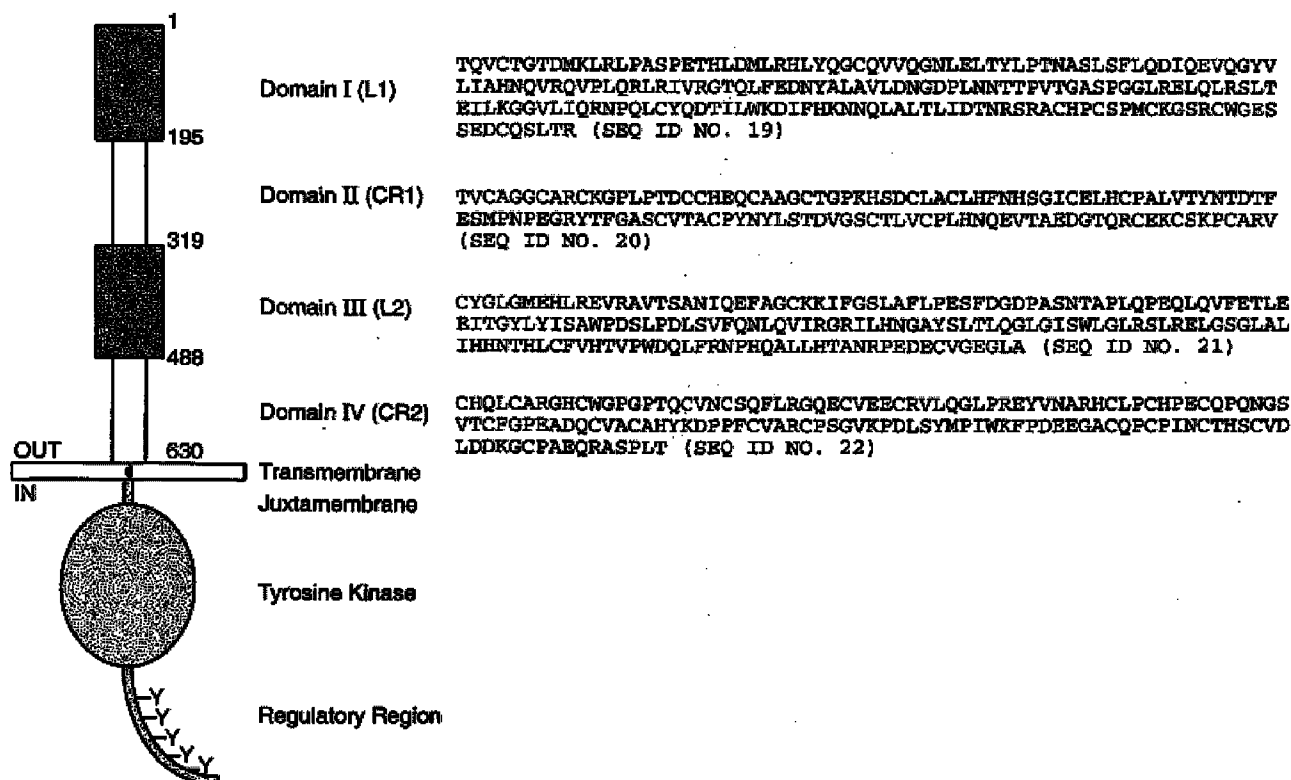
(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20070989	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.07.15 PCT/US2005/025084
(22)	Inng.dag	2007.02.21	(85)	Videreføringsdag	2007.02.21
(24)	Løpedag	2005.07.15	(30)	Prioritet	2004.07.22, US, 60/590,202
(41)	Alm.tilgj	2007.04.18			
(45)	Meddelt	2017.10.02			
(73)	Innehaver	Genentech Inc., 1 DNA Way, US-CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	Yung-Hsiang Kao, 760 Pico Avenue, US-CA94403 SAN MATEO, USA Martin Vanderlaan, 1626 14th Avenue, US-CA94122 SAN FRANCISCO, USA			
(74)	Fullmektig	Tandberg Innovation AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	HER2-antistoffsammensetning, antistoffet, en farmasøytisk formulering derav oganvendelse av sammensetningen for fremstilling av et medikament for behandling av HER2-uttrykkende kreft.
(56)	Anførte publikasjoner	VAJDOS FF. et al. Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. J Mol Biol. 2002, vol. 320, no. 2, side 415-428. WO 0100238 A NAHTA R. et al. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. Cancer Res. 2004, vol. 64, no. 7, side 2343-2346. AGUS DB. et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. Cancer Cell. 2002, vol. 2, no. 2, side 127-137 AGUS DB. et al. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2003, 22:192, Abstract 771
(57)	Sammendrag	

Et preparat som omfatter et hovedtype-HER2-antistoff som binder til domene-II på HER2 og en aminosyresekvensvariant derav som omfatter en aminoterminal lederforlengning er tilkjennegjort. Farmasøytiske formuleringer som omfatter preparatet og terapeutiske anvendelser av preparatet blir også tilkjennegjort.



Oppfinnelsens område

Foreliggende vedrører et preparat som omfatter et hovedtype-HER2-antistoff som binder til domene-II i HER2, og en aminosyresekvensvariant derav omfatter en amino-terminal lederforlengelse. Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske formuleringer som omfatter sammensetningen og terapeutiske anvendelser for sammensetningen. Oppfinnelsen er som definert i kravene.

Bakgrunn for oppfinnelsen

HER2-antistoffer

HER-familien av reseptortyrosinkinaser er viktige mediatorer av cellevekst, differensiering og overlevelse. Reseptorfamilien inkluderer fire forskjellige medlemmer inkludert epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR, ErbB1 eller HER1), HER2 (ErbB2 eller p185^{neu}), HER3 (ErbB3) og HER4 (ErbB4 eller tyro2).

EGFR, som er kodet for erbB1-genet, har blitt indikert som årsak til human malignitet. Spesielt har økt ekspresjon av EGFR blitt observert i bryst-, blære-, lunge-, hode-, nakke- og magekreft i tillegg til i gliomblastomer. Økt EGFR-reseptorekspresjon er ofte assosiert med økt produksjon av EGFR-liganden, transformerende vekstfaktor-alfa (TGF- α), i de samme tumorcellene som fører til reseptor-aktivering ved en autokrin stimulatorisk vei. Baselga og Mendelsohn, *Pharmac. Ther.*, 64:127-154 (1994). Monoklonale antistoffer som er rettet mot EGFR eller dens ligander, TGF- α og EGF, har blitt evaluert som terapeutiske midler i behandlingen av slike maligniteter. Se f. eks. Baselga og Mendelsohn, ovenfor, Masui et al., *Cancer Research*, 44:1002-1007 (1984) og Wu et al., *J. Clin. Invest.*, 95:1897-1905 (1995).

Det andre medlemmet av HER-familien, p185^{neu} ble opprinnelig identifisert som produktet av det transformerende genet fra neuroblastomer hos kjemisk behandlede rotter. Den aktiverte formen av neu-proto-onkogenet er et resultat av en punktmutasjon (valin til glutaminsyre) i transmembranregionen til det kodede proteinet. Amplifisering av den humane homologen av neu blir observert i brystkreft og ovariekreft og korrelerer med en dårlig prognose (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987), Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989) og US patentskrift nr. 4 968 603). Per i dag har ingen punktmutasjonsanaloger til den som er funnet i neu-proto-onkogenet blitt rapportert for humane tumorer. Overekspresjon av HER2 (som ofte, men ikke alltid skyldes genamplifisering) har også blitt observert ved andre karsinomer, inkludert karsinomer i magen, endometrium, spyttkjertel, lunge, nyre, kolon, tyroid, pankreas og blære. Se blant annet King et al., *Science*, 229:974 (1985), Yokota et al., *Lancet*, 1:765-767 (1986), Fukushima 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), Boerst 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) og McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 kan være overuttrykt i prostatakraft (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) og Sadasivan et al., *J. Urol.*, 150:126-31 (1993)).

Antistoffer som er rettet mot rotte-p185^{neu} og humane HER2-proteinprodukter har blitt beskrevet. Drebin og kollegaer har frembrakt antistoffer mot rotte-neu-genproduktet, p185^{neu}. Se for eksempel Drebin et al., *Cell*, 41:695-706 (1985), Myers et al., *Meth. Enzym.*, 198:277-290 (1991) og WO 94/22478. Drebin et al., *Oncogene*, 2:273-277 (1988) rapporterte at blandinger av antistoffer som er reaktive med to forskjellige regioner på p185^{neu} fører til synergistiske anti-tumoreffekter på neu-transformerte NIH-3T3-celler som var implantert i nakenmus. Se også US patentskrift nr. 5 824 311, meddelt 20. oktober, 1998.

Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9(3):1165-1172 (1989) beskriver fremstillingen av et panel av HER2-antistoffer som ble karakterisert ved å benytte den humane brysttumor cellelinjen SK-BR-3. Relativ celleproliferasjon for SK-BR-3-cellene etter eksponering ovenfor antistoffene ble bestemt ved hjelp av krystallfiolett farging av monolagene etter 72 timer. Ved å benytte denne analysen ble maksimal inhibering oppnådd med antistoffet kalt 4D5 som inhiberte cellulær proliferasjon med 56 %. Andre antistoffer i panelet reduserte cellulær proliferasjon i mindre omfang i denne analysen. Antistoffet 4D5 ble ytterligere funnet å sensitivisere HER2-overuttrykkende brysttumorcellelinjer og for de cytotoksiske effektene av TNF- α . Se også US patentskrift nr. 5 677 171, meddelt 14. oktober, 1997. HER2-antistoffene som er diskutert i Hudziak et al., er ytterligere karakterisert i Fendly et al., *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990), Kotts et al., *In vitro*, 26(3):59A (1990), Sarup et al., *Growth Regulation*, 1:72-82 (1991), Shepard et al., *J. Clin. Immunol.*, 11(3):117-127 (1991), Kumar et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11(2):979-986 (1991), Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263 (1993), Pietras et al., *Oncogene*, 9:1829-1838 (1994), Vitetta et al., *Cancer Research*, 54:5301-5309 (1994), Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994), Scott et al., *J. Biol. Chem.*, 266:14300-5 (1991), D'souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:7202-7206 (1994), Lewis et al., *Cancer Research*, 56:1457-1465 (1996) og Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997).

En rekombinant, humanisert versjon av det murine HER1-antistoffet 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb-HER2, trastuzumab eller HERCEPTIN, US patentskrift nr. 5 821 337) er klinisk aktivt hos pasienter med HER2-overuttrykkende metastatisk brystkreft som har mottatt omfattende tidligere anti-kreftterapi (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.*, 14:737-744 (1996)). Trastuzumab mottok markedsføringstillatelse fra the Food and Drug Administration den 25. september 1998 for behandlingen av pasienter med metastatisk brystkreft hvis tumorer overuttrykker HER2-proteinet.

Andre HER2-antistoffer med ulike egenskaper har blitt beskrevet i 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), 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), US patentskrift nr. 5 783 186 og Klapper et al., Oncogene, 14:2099-2109 (1997).

Homologiscreening har ført til identifiseringen av to andre HER-reseptor-familie-medlemmer, HER3 (US patentskrift nr. 5 183 884 og 5 480 968 i tillegg til Kraus et al., PNAS (USA), 86:9193-9197 (1989)) og HER4 (EP patentsøknad nr. 599 274, Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993) og Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)). Begge disse reseptorene oppviser økt ekspresjon i minst noen brystkreft-cellelinjer.

HER-reseptorene blir vanligvis funnet i ulike kombinasjoner i celler og heterodimerisering er antatt å øke diversiteten til cellulære responser ovenfor en mengde HER-ligander (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment, 35:115-132 (1995)). EGFR er bundet av seks ulike ligander, epidermal vekstfaktor (EGF), transformerende vekstfaktor-alfa (TGF- α), amfiregulin, heparinbindende epidermalvekstfaktor (HB-EGF), betacellulin og epiregulin (Groenen et al., Growth Factors, 11:235-257 (1994)). En familie av heregulin-proteiner som fremkommer ved alternativ spleising av et enkelt gen er ligander for HER3 og HER4. Heregulinfamilien inkluderer alfa-, beta- og gamma-heregulin (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992), US patentskrift nr. 5 641 869 og Schaefer et al., Oncogene, 15:1385-1394 (1997)), neu-differensieringsfaktorer (NDF), gli vekstfaktorer (GGF), acetylcholin reseptorinduserende aktivitet (ARIA), og sensorisk og motorneuron-avledet faktor (SMDF). For en gjennomgang se (Groenen et al., Growth Factors 11:235-257 (1994), Lemke, G., Molec. & Cell. Neurosci., 7:247-262 (1996) og Lee et al., Pharm. Rev., 47:51-85 (1995)). Nylig ble ytterligere tre HER-ligander identifisert, neuregulin-2 (NRG-2) som er rapportert å binde enten HER3 eller HER4 (Chang et al., Nature, 387:509-512 (1997) og Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997)), neuregulin-3 som binder HER4 (Zhang et al., PNAS (USA), 94(18):9562-7 (1997)) og neuregulin-4 som binder HER4 (Harari et al., Oncogene, 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacellulin og epiregulin binder også til HER4.

Mens EGF og TGF- α ikke binder HER2, stimulerer EGF EGFR og HER2 til å danne en heterodimer som aktiverer EGFR og fører til transfosforylering av HER2 i heterodimeren. Dimerisering og/eller transfosforylering ser ut til å aktivere HER2-tyrosinkinasen. Se Earp et al., ovenfor. Når HER3 blir uttrykt samtidig med HER2, blir likeledes et aktivt signaliseringskompleks dannet og antistoffene rettet mot HER2 er i stand til å forstyrre dette komplekset (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994)). I

tillegg blir affiniteten for HER3 for heregulin (HRG) økt til en høyere affinitetstilstand når de blir samtidig uttrykt med HER2. Se også Levi et al., *Journal of Neuroscience* 15:1329-1340 (1995), Morrissey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1431-1435 (1995) og Lewis et al., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) med hensyn på HER2-HER3-proteinkomplekset. HER4
 5 danner slik som HER3 et aktivt signaliseringskompleks med HER2 (Carraway og Cantley, *Cell*, 78:5-8 (1994)).

For å målsøke HER-signaliseringsveien ble rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG) utviklet som et humanisert antistoff som inhiberer dimeriseringen av HER2 med andre HER-reseptorer, for derved å inhibere ligandrevet fosforylering og aktivering, og nedstrøms-
 10 aktivering av RAS- og AKT-veiene. I en fase-1-utprøving av pertuzumab som et enkelt middel for å behandle faste tumorer, ble 3 individer med fremskreden ovariekreft behandlet med pertuzumab. En hadde en varig partiell respons og et ytterligere individ hadde stabil sykdom i 15 uker. Agus et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22:192, Abstract 771 (2003).

Antigensbindingssetet til et humanisert Fab2C4 er studert ved å bruke shotgun-
 15 mutagenese (Vajdos et al., *J. Mol. Biol.*, 320 (2): 415-28, (2002)). W001/00238 beskriver bruken av pertuzumab for behandling av prostatakreft. Det har blitt foreslått at pertuzumab og trastuzumab synergistisk hindrer overlevelsen av brystkreftceller (Nahta et al., *Cancer Research*, 64: 2343-2346, 2004).

20 **Antistoff variantpreparater**

US patentskrift nr. 6 339 142 beskriver et HER2-antistoffpreparat som omfatter en blanding av anti-HER2-antistoff og én eller flere syrevarianter derav, der mengden av den sure varianten er mindre enn omtrent 25 %. Trastuzumab er det eksemplifiserte HER2-antistoffet.

25 Reid et al., poster presentert på Well Characterized Biotech Pharmaceuticals konferanse (januar 2003) "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics" beskriver et humanisert IgG1-antistoffpreparat uten navn med N-terminale heterogeniteter som skyldes kombinasjoner av VHS-signalpeptid, N-terminalt glutamin og pyroglutaminsyre på den tunge kjeden.

30 Reed et al., "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" poster presentert på the IBC Antibody Production konferanse (februar 2002) rapporterer om en VHS-forlengelse på den tunge kjeden til E25, som er et humanisert anti-IgE-antistoff.

Roues et al., beskriver med en poster som er presentert på WCBP "Top Down" Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to
 35 Biopharmaceutical Development" (6.-9. januar, 2004) et monoklonalt antistoffpreparat med N-terminal heterogenitet som skyldes $^{-3}\text{AHS-}$ eller $^{-2}\text{HS-}$ signalpeptidrester i den lette kjeden.

I en presentasjon på IBC møtet (september 2000) "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals" diskuterte Jill Porter en sent-eluerende form av ZENAPAX med tre ekstra aminosyrerester på den tunge kjeden.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse vedrører en sammensetning som omfatter: (a) et hovedtype HER2-antistoff som binder til domene II i HER2 og omfatter en variabel lett aminosyresekvens ifølge SEKV ID Nr: 3 og en variabel tung aminosyresekvens ifølge SEKV ID Nr: 4; Og (b) en antistoffvariant som omfatter hovedtypen HER2-antistoff og en aminoterminal lederforlengelse som omfatter VHS- på en lettkjede av antistoffvarianten, hvor fra 5 % til rundt 15 % av antistoffmolekylene i sammensetningen omfatter den amino-terminale lederforlengelsen, som kvantifisert ved kationebytteranalyse.

Oppfinnelsen vedrører ytterligere et polypeptid som omfatter aminosyresekvensen ifølge SEKV ID Nr. 23, eller en deamidert og/eller oksidert variant derav, som er inkludert i et antistoff som omfatter (a) en lettkjede som omfatter dette polypeptidet og (b) en tungkjede som omfatter en aminosyresekvens som er valgt fra gruppen som består av SEKV ID Nr. 16, SEKV ID Nr. 24 og en deamidert og/eller oksidert variant av SEKV ID Nr. 16 eller SEKV ID Nr. 24.

Oppfinnelsen vedrører også en farmasøytisk formulering som omfatter sammensetningen i en farmasøytisk akseptabel bærer, som er anvendbar til å behandle HER2-uttrykkende kreft hos en pasient ved å administrere den farmasøytiske formuleringen til pasienten i en mengde som er effektiv til å behandle kreften.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser en skjematisk oversikt over HER2-proteinstruktur, og aminosyresekvenser for domenene I-IV (henholdsvis SEKV ID Nr.19-22) i de ekstracellulære domenene derav.

Figur 2A og 2B avbilder sammenstillinger av aminosyresekvensene for variabel lett- (V_L) (Fig. 2A) og variabel tungdomene (V_H) (Fig. 2B) for murint, monoklonalt antistoff 2C4 (henholdsvis SEKV ID Nr.1 og 2), V_L - og V_H -domenet til humanisert 2C4-versjon 574 (henholdsvis SEKV ID Nr.3 og 4) og humane V_L - og V_H -konsensusrammeverk (hum 61, lett kappa undergruppe-I, humIII, tung undergruppe-III) (henholdsvis SEKV ID Nr.5 og 6). Asterisker identifiserer forskjeller mellom humanisert 2C4-versjon 574 og murint, monoklonalt antistoff 2C4 eller mellom humanisert 2C4-versjon 574 og det humane rammeverket. Komplementaritetsbestemmende regioner (CDRer) er i parenteser.

Figurene 3A og 3B viser aminosyresekvensene for pertuzumab-lettkjede (SEkv. id. r. 15) og -tungkjede (SEKV ID Nr.16). CDRer er vist i fet skrift. Karbohydratenheten er bundet til Asn 299 på den tunge kjeden.

Figurene 4A og 4B viser aminosyresekvensene til pertuzumab-lettkjede (SEKV ID Nr.17) og -tungkjede, der hver inkluderer en intakt aminoterminal signalpeptidsekvens (SEKV ID Nr.18).

Figur 5 avbilder skjematisk binding av 2C4 på det heterodimere bindingssetet til HER2, for derved å forhindre heterodimerisering med aktivert EGFR eller HER3.

Figur 6 avbilder kobling av HER2/HER3 til MAPK- og Akt-veiene.

Figur 7 sammenligner aktiviteter for trastuzumab og pertuzumab.

Figurene 8A og 8B viser rekonstruerte massespektra for redusert pertuzumab-lettkjede (Figur 8A) og –tungkjede (Figur 8B).

Figurene 9A og 9B avbilder kationebytterkromatografianalyse av nativ pertuzumab (Figur 9A) og CPB-fordøyd pertuzumab (Figur 9B).

Figur 10 viser størrelsesekklusjonskromatografianalyse av pertuzumab.

Figurene 11A og 11B viser CE-SDS-LIF-analyse av redusert pertuzumab (Figur 11A) og intakt pertuzumab (Figur 11B).

Figurene 12A og 12B avbilder trypsinpeptidkart av pertuzumab (Figur 12A) og LYS-C-peptidkart av pertuzumab (Figur 12B).

Figur 13 viser CE-analyse av N-bundne oligosakkarider frigjort fra pertuzumab.

Figur 14a og 14b viser oligosakkaridstrukturer som vanligvis observeres i IgG-antistoffer.

Figur 15 avbilder positivt modus MALDI-TOF-massespektra for nøytrale oligosakkarider som er frigjort fra pertuzumab.

Figurene 16A og 16B viser aminosyresekvensen for trastuzumab-lettkjede (SEKV ID Nr.13) og –tungkjede (SEKV ID Nr.14).

Figurene 17A og 17B avbilder en variant-pertuzumab-lettkjedesequens (SEKV ID Nr.23) og en variant-pertuzumab-tungkjedesequens (SEKV ID Nr.24).

Detaljert beskrivelse av de foretrukne utførelsesformene

I. Definisjoner

Uttrykket "hovedtype antistoff" refererer her til antistoff aminosyresekvensstrukturen i et preparat som er det kvantitativt dominerende antistoffmolekylet i sammensetningen. Hovedtypeantistoffet er et HER2-antistoff, som binder til domene-II i HER2, og omfatter variabel lett- og tungkjede aminosyresekvensen ifølge SEKV ID Nr.3 og 4, og fortrinnsvis omfatter lettkjede- og tungkjede aminosyresekvensen ifølge SEKV ID Nr.15 og 16 (pertuzumab).

Et "aminosyresekvensvariantantistoff" er her et antistoff med en aminosyresekvens som er forskjellig fra et hovedtypeantistoff. Eksempler på aminosyresekvensvarianter inkluderer her en sur variant (f. eks. en deamidert antistoffvariant), en basisk variant, antistoffet med en aminoterminal lederforlengelse (f. eks. VHS-) på én eller to lettkjeder derav, antistoff med en C-terminal lysinrest på én eller to tungkjeder derav, antistoff med én eller flere oksiderte metioninrester osv., og inkluderer kombinasjoner av variasjoner på aminosyresekvensene på tunge og/eller lette kjeder. Antistoffvarianten av spesiell interesse her er antistoffet som omfatter en aminoterminal lederforlengelse på én eller to lettkjeder

derav, eventuelt ytterligere omfattende andre aminosyresekvens- og/eller glykosyleringsforskjeller i forhold til hovedtype antistoffet.

Et "glykosyleringsvariantantistoff" er her et antistoff med én eller flere karbohydratenheter koblet til denne som er forskjellig fra én eller flere karbohydratenheter som er bundet til et hovedtype antistoff. Eksempler på glykosyleringsvarianter her inkluderer antistoff med en G1- eller G2-oligosakkaridstruktur i stedet for en G0-oligosakkaridstruktur, bundet til en Fc-region derav, antistoff med én eller to karbohydratenheter bundet til én eller to lettkjeder derav, antistoff med ingen karbohydrater bundet til én eller to tungkjeder på antistoffet osv., i tillegg til kombinasjoner av slike glykosyleringsendringer.

Der antistoffet har en Fc-region, kan en oligosakkaridstruktur slik som den som er vist i Figur 14a og 14b her bli bundet til én eller to tungkjeder på antistoffet, f. eks. på resten 299. For pertuzumab var G0 den dominerende oligosakkaridstrukturen, med andre oligosakkaridstrukturer slik som G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) og G2 funnet i mindre mengder i pertuzumab-sammensetningen.

Hvis ikke annet er indikert, inkluderer en "G1-oligosakkaridstruktur" her G1(1-6)- og G1(1-3)-strukturer.

En "aminoterminal lederforlengelse" referer her til én eller flere aminosyrerester på den aminoterminal ledersekvensen som foreligger på aminoterminalen på enhver av én eller flere tungkjeder eller lettkjeder på et antistoff. En eksempelmessig aminoterminal lederforlengelse omfatter eller består av tre aminosyrerester, VHS, som er tilstede på en eller begge lettkjeder i en antistoffvariant.

Et "deamidert" antistoff er et der én eller flere asparaginrester derav har blitt derivatisert, f. eks. til en asparaginsyre, et suksinimid eller en iso-asparaginsyre.

"Homologi" er definert som prosentandelen av rester i aminosyresekvensvarianten som er identiske etter å ha sammenstilt sekvensene og introdusert åpninger, hvis det er nødvendig, for å oppnå den maksimale, prosentvise homologien. Femgangsmåter og dataprogrammer for sammenstilling er velkjente på fagområdet. Et slikt dataprogram er "Align 2", som er skrevet av Genentech, Inc., som ble innsendt med brukerdokumentasjon til the United States Copyright Office, Washington, DC 20559, den 10. desember 1991.

For formålene her refererer "kationebytteranalyse" til enhver fremgangsmåte ved hvilken et preparat som omfatter to eller flere forbindelser blir separert basert på ladningsforskjeller ved å benytte en kationebytter. En kationebytter omfatter vanligvis kovalent bundne, negativt ladede grupper. Fortrinnsvis er kationebytteren her en svak kationebytter og/eller omfatter en karboksylatfunksjonell gruppe slik som PROPAC WCX-10-kationebytterkolonne solgt av Dionex.

En "HER-reseptor" er en reseptorproteintyrosinkinase som tilhører HER-reseptorfamilien og inkluderer EGFR-, HER2-, HER3- og HER4-reseptorene og andre medlemmer av denne familien som kommer til å bli identifisert i fremtiden. HER-reseptoren vil vanligvis omfatte et ekstracellulært domene, som kan binde en HER-ligand, et lipofilt transmembran-

domene, et konserverv intracellulært tyrosinkinasedomene og et karboksyterminalt signaliseringsdomene som huser flere tyrosinrester som kan bli fosforylerte. Fortrinnsvis er HER-reseptoren en human nativsekvens-HER-reseptor.

Det ekstracellulære domenet til HER2 omfatter fire domener, Domene-I (aminosyrerester fra omtrent 1-195), Domene-II (aminosyrerester fra omtrent 196-319), Domene-III (aminosyrerester fra omtrent 320-488) og Domene-IV (aminosyrerester fra omtrent 489-630) (restnummerering uten signalpeptid). Se Garret 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) eller Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:1746-1750 (1993). Se også Fig. 1 her.

Uttrykkene "ErbB1", "HER1", "epidermal vekstfaktorreseptor" og "EGFR" blir benyttet om hverandre her og refererer til EGFR som for eksempel tilkjennegjort i Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem., 58:881-914 (1987), inkludert naturlig forekommende mutant-former derav (f. eks. en delesjonsmutant-EGFR som i Humphrey et al., PNAS (USA), 87: 4207-4211 (1990)). *erbB1* refererer til genet som koder for EGFR-proteinproduktet.

Uttrykkene "ErbB2" og "HER2" blir her benyttet om hverandre og refererer til humant HER2-protein som for eksempel beskrevet i Semba et al., PNAS (USA), 82:6497-6501 (1985) og Yamamoto et al., Nature, 319:230-234 (1986) (Genbank aksesjonsnr. X03363). Uttrykket "*erbB2*" refererer til genet som koder for humant ErbB2 og "*neu*" refererer til genet som koder for rotte p185^{neu}. Foretrukket HER2 er human nativsekvens-HER2.

"ErbB3" og "HER3" refererer til reseptorpolypeptidet som for eksempel tilkjennegjort i US patentskrift nr. 5 183 884 og 5 480 968 i tillegg til Kraus et al., PNAS (USA), 86:9193-9197 (1989).

Uttrykkene "ErbB4" og "HER4" refererer her til reseptorpolypeptidet som tilkjennegjort for eksempel i EP patentsøknad nr. 599 274, Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:1746-1750 (1993), og Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993), inkludert isoformer derav, f. eks. som tilkjennegjort i WO 99/19488, publisert 22. april 1999.

Med "HER-ligand" er det ment et polypeptid som binder til og/eller aktiverer en HER-reseptor. HER-liganden av spesiell interesse her er en human nativsekvens-HER-ligand slik som epidermal vekstfaktor (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem., 247:7612-7621 (1972)), transformerende vekstfaktor-alfa (TGF- α) (Marquardt et al., Science, 223:1079-1082 (1984)), amfiregulin også kjent som schwanom eller keratinocyttautokrin vekstfaktor (Shoyab et al., Science, 243:1074-1076 (1989), Kimura et al., Nature, 348:257-260 (1990) og Cook et al., Mol. Cell. Biol., 11:2547-2557 (1991)), betacellulin (Shing et al., Science, 259:1604-1607 (1993) og Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190:1173 (1993)), heparinbindende epidermalvekstfaktor (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science, 251:936-939 (1991)), epiregulin (Toyoda et al., J. Biol. Chem., 270:7495-7500 (1995), og Komurasaki et al. Oncogene, 15:2841-2848 (1997)), et heregulin (se nedenfor),

neuregulin-2 (NRG-2) (Carraway et al., *nature*, 387:512-516 (1997)), neuregulin-3 (NRG-3) (Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)), neuregulin-4 (NRG-4) (Harari et al., *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)) eller krypto (CR-1) (Kannan et al., *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)). HER-ligander som binder EGFR inkluderer EGF, TGF- α , amfiregulin, betacellulin, HB-EGF og epiregulin. HER-ligander som binder HER3 inkluderer heregulin. HER-ligander som er i stand til å binde HER4 inkluderer betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 og heregulin.

"Heregulin" (HRG) refererer når det blir benyttet her til et polypeptid kodet for av heregulin-genproduktet som tilkjennegjort i US patentskrift nr. 5 641 869 eller Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993). Eksempler på heregulin inkluderer heregulin- α , heregulin- β 1, heregulin- β 2 og heregulin- β 3 (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992), og US patentskrift nr. 5 641 869), neu-differensieringsfaktor (NDF) (Peles et al., *Cell*, 69:205-216 (1992)), acetylcholin reseptorinduserende aktivitet (ARIA) (Falls et al., *Cell*, 72:801-815 (1993)), gli vekstfaktorer (GGF) (Marchinni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)), sensoriske og motorneuronavledet faktor (SMDF) (Ho et al., *J. Biol. Chem.*, 270:14523-14532 (1995)), γ -heregulin (Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). Uttrykket inkluderer biologisk aktive fragmenter og/eller aminosyresekvensvarianter av en nativsekvens for HRG-polypeptid, slik som et EGF-lignende domenefragment derav (f. eks. HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

En "HER-dimer" er her en ikke-kovalent asosisert dimer som omfatter minst to forskjellige HER-reseptorer. Slike komplekser kan dannes når en celle som uttrykker to eller flere HER-reseptorer blir eksponert ovenfor en HER-ligand og kan bli isolert ved immunpresipitering og analysert ved SDS-PAGE som beskrevet i Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994). Eksempler på slike HER-dimerer inkluderer EGFR-HER2-, HER2-HER3- og HER3-HER4-heterodimerer. Videre kan HER-dimeren omfatte to eller flere HER2-reseptorer kombinert med en annen HER-reseptor, slik som HER3, HER4 eller EGFR. Andre proteiner, slik som en cytokinreseptorsubenheter (f. eks. gp130) kan være assosisert med dimeren.

Et "heterodimert bindingssete" på HER2 refererer til en region på det ekstracellulære domenet til HER2 som kontakter, eller som tilgrenser til, en region på det ekstracellulære domenet til EGFR, HER3 eller HER4 ved dannelsen av en dimer derav. Regionen blir funnet på Domene-II i HER2. Franklin et al., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004).

"HER-aktivering" eller "HER2-aktivering" refererer til aktivering, eller fosforylering, av en hvilken som helst av én eller flere HER-reseptorer, eller HER2-reseptorer. Vanligvis fører HER-aktivering til signaloverføring (f. eks. som forårsaket av et intracellulær kinasedomene på en HER-reseptor som fosforylerer tyrosinrester på HER-reseptoren eller et substratpolypeptid). HER-aktivering kan være mediert ved HER-ligandbinding til en HER-dimer som omfatter HER-reseptoren av interesse. HER-ligandbinding til en HER-dimer kan aktivere et kinasedomene på én eller flere av HER-reseptorer i dimeren og derved føre til

fosforylering av tyrosinrester i én eller flere av HER-reseptorene og/eller fosforylering av tyrosinrester i ytterligere substratpolypeptider, slik som Akt- eller MAPK-intracellulærkinase.

Uttrykket "antistoff" blir her benyttet i den bredeste betydning og dekker spesielt intakte, monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, multispesifikke antistoffer (f. eks. bispesifikke antistoffer) som er dannet av minst to intakte antistoffer, og antistoff-fragmenter, så lenge de oppviser den ønskede, biologiske aktiviteten.

Uttrykket "monoklonalt antistoff" refererer slik det blir benyttet her til et antistoff som er fremskaffet fra en populasjon av vesentlige homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som utgjør populasjonen er identiske og/eller binder den samme epitopen, bortsett fra mulige varianter som kan fremkomme i løpet av fremstilling av det monoklonale antistoffet, slik som variantene som er beskrevet her. I motsetning til polyklonale antistoffpreparater som typisk inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), så er hvert monoklonalt antistoff rettet mot en enkelt determinant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige ved at de ikke er forurenset av andre immunglobuliner. Endringsordet "Monoklonal" indikerer karakteren til antistoffet som å være fremskaffet fra en vesentlig homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke tolkes som å kreve produksjon av antistoffet ved noen spesiell fremgangsmåte. De monoklonale antistoffene som skal bli anvendt i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan for eksempel bli fremstilt ved hjelp av hybridomfremgangsmåten som først ble beskrevet av Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) eller kan bli fremstilt ved hjelp av rekombinant DNA-fremgangsmåter (se f. eks. US patentskrift nr. 4 816 567). De "monoklonale antistoffene", kan også bli isolert fra bakteriofage antistoffbiblioteker ved å benytte teknikkene som er beskrevet for eksempel i Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) og Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

De monoklonale antistoffene her inkluderer spesifikt "kimære" antistoffer der en del av den tunge kjeden og/eller den lette kjeden er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer som er avledet fra en spesiell art eller som tilhører en spesiell antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjeden(e) er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer som er avledet fra en annen art, eller som tilhører en annen antistoffklasse eller underklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer så lenge de oppviser den ønskede biologiske aktiviteten (US patentskrift nr. 4 816 567 og Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Kimære antistoffer av interesse her inkluderer "primatiserte" antistoffer som omfatter variabeldomene antigenbindings-sekvenser som er avledet fra en ikke-human primat (f. eks. dyreape, menneskeape osv.) og humane konstantregionsekvenser.

"Antistoff-fragmenter" omfatter en del av et intakt antistoff, og omfatter fortrinnsvis den antigenbindende eller variable regionen derav. Eksempler på antistoff-fragmenter inkluderer Fab, Fab', F(ab')₂ og Fv-fragmenter, diastoffer, lineære antistoffer,

enkeltkjede antistoffmolekyler, og multispesifikke antistoffer dannet fra antistofffragment(er).

Et "intakt antistoff" er ett som omfatter en antigenbindings variabelregion i tillegg til et lettkjede konstantdomene (C_L) og tungkjede konstantdomener C_{H1} , C_{H2} og C_{H3} .

- 5 Konstantdomene kan være nativsekvens konstantdomener (f. eks. humane nativsekvens konstantdomener) eller aminosyre sekvensvarianter derav. Fortrinnsvis har det intakte antistoffet én eller flere effektorfunksjoner, og omfatter en oligosakkaridstruktur som er bundet til én eller to tungkjeder derav.

- 10 Antistoff "effektorfunksjon" refererer til de biologiske aktivitetene som kan tilskrives Fc-regionen (en nativsekvens-Fc-region eller aminosyresekvensvariant-Fc-region) for et antistoff. Eksempler på antistoff effektorfunksjoner inkluderer C1q-binding, komplement-avhengig cytotoxiskitet, Fc-reseptorbinding, antistoffavhengig cellemediert cytotoxiskitet (ADCC), fagocytose, nedregulering av celleoverflatereseptorer (f. eks. B-cellereseptor, BCR) osv.

- 15 Avhengig av aminosyresekvensen til konstantdomenet i deres tungkjeder kan intakte antistoffer bli tilordnet i ulike "klasser". Det finnes fem hovedklasser av intakte antistoffer: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse kan ytterligere bli delt i "underklasser" (isotyper), for eksempel IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA og IgA2. Tungkjede konstantdomene tilsvarer de ulike klassene antistoffer kalt henholdsvis α , δ , γ , ϵ og μ .
- 20 Subenhetstrukturene og de tredimensjonale konfigurasjonene for ulike klasser av immunoglobuliner er velkjente.

- "Antistoffavhengig, cellemediert cytotoxiskitet" og "ADCC" refererer til en cellemediert reaksjon der ikke-spesifikke, cytotoxiske celler som uttrykker Fc-reseptorer (FcR) (f. eks. naturlige dreperceller (NK)-celler, nøytrofiler og makrofager) gjenkjenner bundet
- 25 antistoff på en målcelle og deretter forårsaker lysis av målcellen. De primære cellene for å mediere ADCC, NK-celler, uttrykker kun $Fc\gamma RIII$, men monocytter uttrykker $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ og $Fc\gamma RIII$. FcR-ekspresjon på hematopoietiske celler er oppsummert i Tabell 3 på side 464 i Ravetch og Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). For å undersøke ADCC-aktivitet for et molekyl av interesse, kan en *in vitro*-ADCC-analyse, slik som den som er beskrevet i
- 30 US patentskrift nr. 5 500 362 eller 5 821 337 bli utført. Nyttige effektorceller for slike analyser inkluderer perifere, mononukleære blodceller (PBMC) og de naturlige dreperceller (NK)-celler. Alternativt, eller i tillegg, så kan ADCC-aktivitet for molekylet av interesse bli undersøkt *in vivo*, f. eks. i en dyremodell slik som den som er tilkjennegjort i Clynes et al., PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

- 35 "Humane effektorceller" er leukocyttceller som uttrykker én eller flere FcR'er og utfører effektorfunksjoner. Fortrinnsvis uttrykker cellene minst $Fc\gamma RIII$ og utfører ADCC-effektorfunksjoner. Eksempler på humane leukocyttceller som medierer ADCC inkluderer perifere, mononukleære blodceller (PBMC), naturlige dreperceller (NK)-celler, monocytter, cyto-

toksiske T-celler og neutrofiler, der PBMC- og NK-celler er foretrukket. Effektorcellene kan bli isolert fra en nativ kilde derav, f. eks. fra blod eller PBMC'er som beskrevet her.

Uttrykket "Fc-reseptor" eller "FcR" blir benyttet for å beskrive en reseptor som binder Fc-region til et antistoff. Den foretrukne FcR er en human nativsekvens-FcR. Videre er en foretrukket FcR en som binder et IgG-antistoff (en gammareseptor) og inkluderer reseptorer av underklassene Fc γ RI, Fc γ RII og Fc γ RIII, inkludert allelevarianter og alternativt spleisede former av disse reseptorene. Fc γ RII-reseptorer inkluderer Fc γ RIIA (en "aktiverende reseptor") og Fc γ RIIB (en "inhiberende reseptor"), som har lignende aminosyresekvenser som primært er forskjellige i cytoplasmadomenene derav. Aktiverende reseptor Fc γ RIIA inneholder et immunreseptor-tyrosinbasert aktiveringsmotiv (ITAM) på sitt cytoplasmadomene. Inhiberende reseptor Fc γ RIIB inneholder et immunreseptor-tyrosinbasert inhiberingsmotiv (ITIM) på sitt cytoplasmadomene (se gjennomgang M. i Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). FcR'er er gjennomgått i Ravetch og Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991), Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994) og de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Andre FcR'er, inkludert de som kommer til å bli identifisert i fremtiden, er omfattet av uttrykket "FcR" her. Uttrykket inkluderer også den neonatale reseptoren, FcRn, som er ansvarlig for overføringen av IgG fra mor til fosteret (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) og Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

"Komplementavhengighets cytotoxisitet" eller "CDC" refererer til et molekyls evne til å lysere et mål i nærvær av komplementet. Komplementaktiveringsveien initieres ved binding av den første komponenten i komplementsystemet (C1q) til et molekyl (f. eks. et antistoff) som foreligger i kompleks med et tilhørende antigen. For å vurdere komplement-aktivering kan en CDC-analyse f. eks. som beskrevet i Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996) utføres.

"Native antistoffer" er vanligvis heteroteramere glykoproteiner på omtrent 150 000 dalton som er sammensatt av to identiske lettkjeder (L) og identiske tungkjeder (H). Hver lettkjede er bundet til en tungkjede med en kovalent disulfidbinding, mens antallet disulfidbindinger varierer blant den tunge kjedene av ulike immunglobulin isotyper. Hver tungkjede og lettkjede har også jevnt fordelte intrakjededisulfidbindinger. Hver tungkjede har på én ende et variabeldomene (V_H) etterfulgt av et antall konstantdomener. Hver lettkjede har et variabeldomene på en ende (V_L) og et konstantdomene på den andre enden. Konstant-domenet i den lette kjeden er sammenstilt med det første konstantdomenet i den tunge kjeden, og lettkjedevariabeldomenet er sammenstilt med variabeldomenet i den tunge kjeden. Spesielle aminosyrerester er antatt å danne en grenseflate mellom den lette kjedens og den tunge kjedens variable domene.

Uttrykket "variabel" refererer til det faktumet at visse deler av de variable domeneene er svært forskjellig i sekvens blant antistoffer og blir benyttet i binding og spesifisiteten til hvert spesielle antistoff for sitt spesielle antigen. Variabiliteten er likevel

ikke jevnt fordelt over det variable domenet på antistoffet. Den er konsentrert i tre segmenter kalt hypervariable regioner både på lettkjede- og tungkjede variabeldomenene. De mer høyt konserverte delen av variabeldomener blir kalt rammeverksregioner (FR). Variabeldomenene til native tungkjeder og lettkjeder omfatter hver fire FR'er, som i

5 hovedsak har tilpasset seg en β -flatekonfigurasjon, sammenbundet av tre hypervariable regioner, som danner løkker som binder dem sammen og som i noen tilfeller danner en del av β -flatestrukturen. Hypervariabelregionene i hver kjede blir holdt sammen primært ved hjelp av FR'ene og bidrar sammen med hypervariabelregionene fra andre kjeder til dannelsen av det antigenbindende sete av antistoffer (se Kabat et al., Sequence of Proteins

10 of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). De konstante domenene er ikke direkte involvert i bindingen av et antistoff til et antigen, men oppviser ulike effektorfunksjoner, slik som deltagelse for antistoffet i antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC).

Uttrykket "hypervariabelregion" refererer når det blir benyttet her til aminosyre-restene til et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter generelt aminosyrerester fra en "komplementaritetsbestemmende region" eller "CDR" (f. eks. rester 24-34 (L1), 50-56 (L2) og 89-97 (L3) i lettkjede variabeldomenet og 31-35 (H1), 50-65 (H2) og 95-102 (H3) i tungkjede variabeldomenet, Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National

20 Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) og/eller de restene fra en "hypervariabel løkke" (f. eks. rester 26-31 (L1), 50-52 (L2) og 91-96 (L3) i lettkjede variabeldomenet og 26-32 (h1), 53-55 (H2) og 96-101 (H3) i tungkjede variabeldomenet, Chothia og Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). "Rammeverksregionrester" eller "FR-rester" er de variabeldomenerestene som er forskjellig fra de hypervariabelregionrestene som er definert

25 her.

Papainspalting av antistoffer frembringer to identiske antigenbindende fragmenter kalt "Fab-fragmenter", der hvert et enkelt antigenbindende sete og et gjenværende "Fc-fragment", hvis navn reflekterer dets evne til å krystallisere lett. Pepsinbehandling gir et $F(ab')_2$ -fragment som har to antigenbindende seter og som fremdeles er i stand til å

30 kryssbinde antigen.

"Fv" er det minimale antistoff-fragmentet som inneholder et fullstendig antigen-gjenkjennings- og antigenbindingssete. Denne regionen består av en dimer av ett tungkjede- og ett lettkjedevariabeldomene i tett ikke-kovalent binding. Det er i denne konfigurasjonen at de tre hypervariabelregionene på hvert variabeldomene interagerer slik

35 at de definerer et antigenbindende sete på overflaten av V_H - V_L -dimeren. Kollektivt kreerer de seks hypervariable regionene antigenbindingsspesifisitet til antistoffet. Til og med et enkelt variabeldomene (eller halvparten av en Fv som kun omfatter tre hypervariable regioner som er spesifikke for et antigen) har likevel evnen til å gjenkjenne og binde antigen, selv om dette foregår ved en lavere affinitet enn for hele bindingssetet.

Fab-fragmentet inneholder også konstantdomenet til den lette kjeden og det første konstantdomenet (CH1) til den tunge kjeden. Fab'-fragmenter er forskjellig fra Fab-fragmenter ved tillegget av noen få rester på karboksyterminalen på tungkjede-CH1-domenet inkludert én eller flere cysteiner fra antistoff hengselregionen. Fab'-SH er her
 5 betegnelsen på Fab' der cysteinresten(e) i konstantdomene bærer minst én fri tiolgruppe. F(ab')₂-antistoff-fragmenter ble opprinnelig produsert som par av Fab'-fragmenter som har hengselcysteiner mellom seg. Andre kjemiske koblinger av antistoff-fragmenter er også kjent.

"Den lette kjedene" til antistoffer fra enhver virveldyrart kan bli tilordnet i to klart
 10 forskjellige typer, kalt kappa (κ) og lambda (λ), basert på aminosyresekvensene i deres konstantdomener.

"Enkeltkjede-Fv" eller "scFv"-antistoff-fragmenter omfatter V_H- og V_L-domenene til antistoff, der disse domenene foreligger på en enkelt polypeptidkjede. Fortrinnsvis omfatter Fv-polypeptider ytterligere en polypeptidlinker mellom V_H- og V_L-domener som gjør scFv i
 15 stand til å danne den ønskede strukturen for antigenbinding. For en gjennomgang av scFv, se Plückthun i The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg og Moore, red., Springer-Verlag, New York, s. 269-315 (1994). HER2-antistoff-scFv-fragmenter er beskrevet i WO 93/16185, US patentskrift nr. 5 571 894 og US patentskrift nr. 5 587 458.

Uttrykket "diastoffer" refererer til små antistoff-fragmenter med to antigenbindende
 20 seter, der fragmentene omfatter et variabel tungdomene (V_H) bundet sammen med et variabel lett-domene (V_L) på den samme polypeptidkjeden (V_H-V_L). Ved å anvende en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domenene på den samme kjeden, blir domenene tvunget til å pare med de komplementære domenene på en annen kjede og danne to antigenbindende seter. Diastoffer er mer inngående beskrevet for eksempel i EP
 25 404 097, WO 93/11161 og Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

"Humaniserte" former av ikke-humane (f. eks. gnager) antistoffer er kimære antistoffer som inneholder minimalt med sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottager antistoff) der
 30 rester fra en hypervariabel region fra mottakeren er erstattet med rester fra en hypervariabel region fra en ikke-human art (donorantistoff) slik som mus, rotte, kanin eller ikke-human primat som har den ønskede spesifisiteten, affiniteten og kapasiteten. I noen tilfeller blir rammeverksregion (FR)-rester fra det humane immunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Humaniserte antistoffer kan videre omfatte rester som
 35 ikke er funnet i mottagerantistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifiseringene blir gjort for ytterligere å forbedre antistoffets ytelse. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte vesentlig alt av minst ett, typisk to, variabeldomener, der alle eller vesentlig alle hypervariabelløkkene tilsvarer de fra et ikke-humant immunglobulin og/eller vesentlig alle FR'ene er de fra en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil eventuelt

også omfatte minst én del av en immunglobulin konstant region (Fc), typisk en for et humant immunglobulin. For ytterligere detaljer, se Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988) og Presta, *Cutt. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Humaniserte HER2-antistoffer inkluderer huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4d5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 og huMAb4D5-8 eller trastuzumab (HERCEPTIN) som beskrevet i Tabell 3 i US patentskrift nr. 5 821 337, humanisert 520C9 (WO 93/21319) og humaniserte 2C4-antistoffer som beskrevet her.

For formålene her refererer "Trastuzumab", "HERCEPTIN" og "huMAb4D5-8" til et antistoff som omfatter lettkjede- og tungkjede aminosyresekvensene i henholdsvis SEKV ID Nr.13 og 14.

Her refererer "Pertuzumab", "OMNITARG" og "rhuMAb2C4" til et antistoff som omfatter variabel lett- og variabel tung aminosyresekvensene i henholdsvis SEKV ID Nr.3 og 4. Der pertuzumab er et intakt antistoff omfatter det fortrinnsvis lettkjede- og tungkjede aminosyresekvensene i henholdsvis SEKV ID Nr.15 og 16.

Et "nakent antistoff" er et antistoff (som definert her) som ikke er konjugert til et heterologt molekyl, slik som en cytotoxisk enhet eller et radiomerke.

Et "isolert" antistoff er et som er blitt identifisert og separert og/eller gjenvunnet fra en komponent i sitt naturlige miljø. Kontaminerende komponenter i dets naturlige miljø er materialer som vil interferere med diagnostiske eller terapeutiske anvendelser av antistoffer, og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteininnholdende eller ikke-proteininnholdende løste stoffer. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet være rensset (1) til mer enn 95 % etter vekt av antistoff som bestemt av Lowry-fremgangsmåten, og mer foretrukket mer enn 99 % etter vekt, (2) til en grad som er tilstrekkelig til å oppnå minst 15 rester med N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en spinning-cup-sekvenator eller (3) til homogenitet ved hjelp av SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende betingelser ved å benytte Coomassieblått eller fortrinnsvis sølvfarging. Isolert antistoff inkluderer antistoffer *in situ* inne i rekombinante celler siden minst én komponent fra antistoffets naturlige miljø ikke vil være tilstede. Isolert antistoff vil likevel ordinært bli fremstilt ved hjelp av minst ett rensetrinn.

Et HER2-antistoff som "inhiberer HER-dimerisering mer effektivt enn trastuzumab" er ett som reduserer eller eliminerer HER-dimerer mer effektivt (for eksempel minst omtrent to ganger mer effektivt) enn trastuzumab. Et slikt antistoff inhiberer fortrinnsvis HER2-dimerisering minst omtrent så effektivt som et antistoff som er valgt fra gruppen som består av intakt, murint, monoklonalt antistoff 2C4, et Fab-fragment av murint, monoklonalt antistoff 2C4, intakt pertuzumab og et Fab-fragment av pertuzumab. Man kan evaluere HER-dimeriseringsinhibering ved å studere HER-dimerer direkte eller ved å evaluere HER-aktivering eller nedstrøms signalisering, som skyldes HER-dimerisering og/eller ved å evaluere antistoff-HER2-bindingssetet osv. Analyse for å screene for antistoffer med evnen

til å inhibere HER-dimerisering mer effektivt enn trastuzumab er beskrevet i Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002) og WO 01/00245 (Adams et al.). Kun for eksempelets del kan man analysere for inhibering av HER-dimerisering ved for eksempel å undersøke inhibering av HER-dimerdannelse (se f. eks. Fig. 1A-B i Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002) og WO 01/00245), reduksjon i HER-ligandaktivering av celler som uttrykker HER-dimerer (WO 01/00245 og Fig. 2A-B i for eksempel Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)), blokkere HER-ligandbinding til celler som uttrykker HER-dimerer (WO 01/00245 og Fig. 2E i for eksempel Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)), cellevekstinhibering av kreft (f. eks. MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D-celler) som uttrykker HER-dimerer i nærvær (eller fravær) av HER-ligand (WO 01/00245 og Fig. 3A-D i for eksempel Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)), inhibering av nedstrøms signalisering (for eksempel inhibering av HRG-avhengig AKT-fosforylering eller inhibering av HRG- eller TGF- α -avhengig MAPK-fosforylering) (se WO 01/00245 og Fig. 2C-D i for eksempel Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)). Man kan også undersøke hvorvidt antistoffet inhiberer HER-dimerisering ved å studere antistoff-HER-bindingssetet, for eksempel ved å evaluere en struktur eller en modell, slik som en krystallstruktur av antistoff bundet til HER2 (se for eksempel Franklin et al., Cancer Cell, 5:317-328 (2004)).

HER2-antistoffet kan "inhibere HRG-avhengig AKT-fosforylering" og/eller inhibere "HRG- eller TGF- α -avhengig MAPK-fosforylering" mer effektiv (for eksempel minst 2 ganger mer effektivt) enn trastuzumab (se Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002) og WO 01/00245) for eksempelets del).

HER2-antistoffet kan være et som "ikke inhiberer HER2-ektodomenespaltning" (Molina et al., Cancer Res., 61:4744-4749 (2001)).

Et HER2-antistoff som "binder til et heterodimert bindingssete" og HER2 binder til rester i domene-II (og binder eventuelt også til rester i andre av domenene på HER2-ekstracellulære domene, slik som domene-I og -III) og kan sterisk hindre, i det minste i noen grad, dannelse av en HER2-EGFR-, HER2-HER3-, eller HER2-HER4-heterodimer. Franklin et al., Cancer Cell, 5:317-328 (2004) karakteriserer HER2-pertuzumab-krystallstrukturen, som er deponert hos RCSB Protein Data Bank (ID kode 1S78) for å illustrere et eksemplermessig antistoff som binder til det heterodimere bindingssetet på HER2.

Et antistoff som "binder til domene-II" i HER2 binder til rester i domene-II og eventuelt rester i andre domener på HER2, slik som domener-I og -III. Fortrinnsvis binder antistoffet som binder til domene-II til overgangen mellom domene-I, -II og -III i HER2.

Et "vekstinhibitorisk middel" refererer når det blir brukt her til en forbindelse eller en sammensetning som inhiberer veksten av en celle, spesielt en HER-uttrykkende kreft-celle enten *in vitro* eller *in vivo*. Slik kan det vekstinhibitoriske middelet være ett som vesentlig reduserer prosentandelen av HER-uttrykkende celler i S-fase. Eksempler på vekstinhibitoriske midler inkluderer midler som blokkerer cellesyklusproduksjon (på et sted som er forskjellig fra S-fase), slik som midler som induserer G1-arrest og M-fasearrest.

Klassiske M-faseblokkere inkluderer vincaene (vinkristin og vinblastin), taxaner og topo-II-inhibitorer slik som doksorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposid og bleomycin. De midlene som stopper G1 går også over inn i S-fasearrest, for eksempel DNA-alkylerende midler slik som tamoksifen, prednison, dakarbazin, mekloretoamin, cisplatin, metotreksat, 5-fluoruracil og ara-C. Ytterligere informasjon kan bli funnet i *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn og Israel, red., Kap. 1, med tittel "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" av Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), spesielt s. 13.

Eksempler på "vekstinhibitoriske" antistoffer er de som binder til HER2 og inhiberer veksten av kreftceller som overuttrykker HER2. Foretrukne, vekstinhibitoriske HER2-antistoffer inhiberer vekst av SK-BR-3-brysttumorceller i cellekultur med mer enn 20 %, og fortrinnsvis med mer enn 50 % (f. eks. fra omtrent 50 % til omtrent 100 %) ved en antistoffkonsentrasjon på omtrent 0,5 til 30 g/ml, der vekstinhiberingen blir bestemt seks dager etter eksponering av SK-BR-3-cellene for antistoffet (se US patentskrift nr. 5 677 171, meddelt 14. oktober 1997). SK-BR-3-cellevekst inhiberingsanalysen er beskrevet i mer inngående detalj i dette patentet og her nedenunder. Det foretrukne, vekstinhibitoriske antistoffet er en humanisert variant av murint, monoklonalt antistoff 4D5, f. eks. trastuzumab.

Et antistoff som "induserer apoptose" er et som induserer programmert celledød som bestemt ved binding av annexin-V, fragmentering av DNA, celleinnskrumpning, utvidelse av det endoplasmatiske retikulum, cellefragmentering og/eller dannelsen av membranvesikler (kalt apoptotiske legemer). Cellen er vanligvis én som overuttrykker HER2-reseptoren. Fortrinnsvis er cellene en tumorcelle, f. eks. en bryst-, ovarie-, mage-, endometrium-, spyttkjertel-, lunge-, nyre-, kolon-, tyroid-, pankreas- eller blærecelle. *In vitro* kan cellen være en SK-BR-3-, BT474-, Calu 3-, MDA-MB-453-, MDA-MB-361- eller SKOV3-celle. Ulike fremgangsmåter er tilgjengelige for å evaluere de cellulære hendelsene som er assosiert med apoptose. For eksempel kan fosfatidylserin (PS)-translokasjon bli målt ved hjelp av anneksinbinding, DNA-fragmentering kan bli evaluert ved DNA-stige dannelsen og nuklær-/kromatinkondensering sammen med DNA-fragmentering kan bli evaluert ved enhver økning i hypolipoide celler. Fortrinnsvis er antistoffet som induserer apoptose ett som fører til omtrent 2 til 50 ganger, fortrinnsvis omtrent 5 til 50 ganger og mest foretrukket omtrent 10 til 50 ganger induksjon av anneksinbinding i forhold til ubehandlet celle i en anneksin bindingsanalyse ved å benytte BT474-celler (se nedenfor). Eksempler på HER2-antistoffer som induserer apoptose er 7C2 og 7F3.

"Epitopen 2C4" er regionen i edet kstracellulære domenet til HER2 som antistoffet 2C4 binder til. For å kunne screene etter antistoffer som binder til 2C4-epitopen, kan en rutinemessig kryssblokkerende analyse slik som den som er beskrevet i *Antibodies, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow og David Lane (1988) bli utført. Alternativt kan epitopkartlegging bli utført for å undersøke hvorvidt antistoffet binder til 2C4-epitopen på HER2 ved å benytte fremgangsmåter som er kjente på

fagområdet og/eller man kan undersøke antistoff-HER2-strukturen (Franklin et al., Cancer Cell, 5:317-328 (2004)) for å se hvilket domene(r) i HER2 som blir bundet av antistoffet. Epitop 2C4 omfatter rester fra domene-II på det ekstracellulære domenet til HER2. 2C4 og pertuzumab binder til det ekstracellulære domenet på HER2 på overgangen mellom domene-I, -II og -III. Franklin et al., Cancer Cell, 5:317-328 (2004).

"Epitopen 4D5" som er regionen på det ekstracellulære domenet til HER2 som antistoffet 4D5 (ATCC CRL 10463) og trastuzumab binder til. Epitopen ligger nær det transmembrane domenet til HER2 og innenfor Domene-IV på HER2. For å screene etter antistoffer som binder til 4D5-epitopen, kan en rutinemessig kryssblokkeringsanalyse slik som er beskrevet i Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow og David Lane (1988) bli utført. Alternativt kan epitopkartlegging bli utført for å undersøke hvorvidt antistoffet binder til 4D5-epitopen på HER2 (f. eks. en hvilken som helst av én eller flere rester i regionen fra omtrent rest 529 til omtrent rest 625, inklusive i Fig. 1).

"Epitopen 7C2/7F3" er regionen på N-terminalen, innenfor Domene-1, i det ekstracellulære domenet til HER2 som 7C2- og/eller 7F3-antistoffene (hver er deponert hos ATCC, se nedenfor) binder til. For å screene etter antistoffer som binder til 7C2/7F3-epitopen kan en rutinemessig kryssblokkeringsanalyse slik som den som er beskrevet i Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Ed Harlow og David Lane (1988) bli utført. Alternativt kan epitopkartlegging bli utført for å etablere hvorvidt antistoffet binder til 7C2/7F3-epitopen på HER2 (for eksempel enhver av én eller flere av restene i regionen fra omtrent rest 22 til omtrent rest 53 i HER2 i Fig. 1).

"Behandling" refererer til både terapeutisk behandling og profylaktiske eller preventive innsatser. De som har behov for behandling inkluderer de som allerede har sykdommen i tillegg til de som skal behandles for å forebygge sykdommen. Pasienten som skal bli behandlet her kan dermed ha blitt diagnostisert for å ha sykdommen eller kan være predisponert eller mottagelig for sykdommen.

Uttrykkene "kreft" og "kreftrammet" refererer til eller beskriver den fysiologiske tilstand hos pattedyr som typisk er karakterisert ved uregulert celledvekst. Eksempler på kreft inkluderer karsinom, lymfom, blastom (inkludert medulloblastom og retinoblastom), sarkom (inkludert liposarkom og synovialcellesarkom), neuroendokrine tumorer (inkludert karsinoide tumorer, gastrinom og øycellekreft), mesoteliom, schwannom (inkludert akustisk neurom), meningiom, adenokarsinom, melanom og leukemi eller lymfoide maligniteter. Mer spesielle eksempler på slike kreftformer inkluderer skvamøscellekreft (for eksempel epitel skvamøscellekreft), lungekreft inkludert småcellet lungekreft, ikke-småcellet lungekreft, adenokarsinom i lungen og skvamøst karsinom i lungen, kreft i peritoneum, hepatocellulær kreft, magekreft inkludert gastrointestinalkreft, pankreas kreft, glioblastom, cervixkreft, ovariekreft, leverkreft, blærekreft, hepatom, brystkreft, kolonkreft, rektalkreft, kolorektalkreft, endometriumkarsinom eller livmorkarsinom, spyttkjertelkarsinom, nyrekreft,

prostatakreft, vulvakreft, tyroidkreft, hepatisk karsinom, anal karsinom, penilt karsinom, testikkelkreft, øsofaguskreft, tumorer i gallegangen, i tillegg til hode og nakkekreft.

Uttrykket "effektiv mengde" referer til en mengde av et legemiddel som er effektivt til å behandle en sykdom hos pasienten. Der sykdommen er kreft, kan den effektive mengden av legemiddelet redusere antallet kreftceller, reduserer tumorstørrelse, inhibere (dvs. i noen grad bremse og fortrinnsvis stoppe) kreftcelleinfiltrering inn i perifere organer, inhibere (dvs. i noen grad bremse og fortrinnsvis stoppe) tumormetastase, inhibere, i noen grad, tumorvekst, og/eller lindre i noen grad et eller flere av symptomene som er assosiert med kreften. I det omfanget at legemiddelet kan forhindre vekst og/eller drepe eksisterende kreftceller kan det være cytostatisk og/eller cytotoxisk. Den effektive mengden kan forlenge progresjonsfri overlevelse, føre til en objektiv respons (inkludert en delvis respons, PR, eller fullstendig respons, CR), øke total overlevelsestid og/eller forbedre ett eller flere symptomer på kreft.

En "HER2-uttrykkende kreft" er én som omfatter celler som har HER2-protein tilstede på deres celleoverflate.

En kreft som "overuttrykker" en HER-reseptor er én som har vesentlig høyere nivåer av en HER-reseptor, slik som HER2, på celleoverflaten derav, sammenlignet med en ikke-krefttrammet celle av samme vevstype. Slik overekspresjon kan være forårsaket av genamplifisering eller ved økt transkripsjon eller translasjon. HER-reseptoroverekspresjon kan bli bestemt i en diagnostisk eller prognostisk analyse ved å evaluere økte nivåer av HER-proteinet som er tilstede på overflaten av en celle (f. eks. via en immunhistokjemi-analyse, IHC). Alternativt, eller i tillegg, så kan man måle nivåer av HER-kodende nukleinsyre i cellen, f. eks. via fluorescens-*in situ*-hybridisering (FISH, se WO 98/45479, publisert oktober 1998), southern-blotting, eller polymerasekjederaksjons (PCR)-teknikker, slik som sanntids, kvantitativ PCR (RT-PCR). Man kan også undersøke HER-reseptor-overekspresjon ved å måle fritt antigen (f. eks. HER-ekstracellulær domene) i en biologisk væske slik som serum (se f. eks. US patentskrift nr. 4 933 294, meddelt 12. juni 1990, WO 91/05264, publisert 18. april, 1991, US patentskrift nr. 5 401 638, meddelt 28. mars 1995 og Sias et al., J. Immunol. Methods, 132:73-80 (1990)). Bortsett fra analysene ovenfor er ulike *in vivo*-analyser tilgjengelige for erfarne fagfolk. Man kan for eksempel eksponere celler inne i kroppen til pasienten for et antistoff som eventuelt er merket med et påvisbart merke, f. eks. en radioaktiv isotop, og binding av antistoffet til celler i pasienten kan bli evaluert, f. eks. ved ekstern skanning av radioaktivitet eller ved å analysere en biopsi tatt fra en pasient som tidligere har blitt eksponert ovenfor antistoffet.

I motsatt fall er en kreft som "ikke overuttrykker HER2-reseptoren" én som ikke uttrykker høyere enn normale nivåer av HER2-reseptor sammenlignet med en ikke-krefttrammet celle av samme vevstype.

En kreft som «overuttrykker» en HER-ligand er én som frembringer vesentlige høyere nivåer av denne liganden sammenlignet med en ikke-krefttrammet celle av samme

vevstype. Slik overekspresjon kan være forårsaket av genamplifisering eller ved økt transkripsjon eller translasjon. Overekspresjon av HER-liganden kan bli bestemt diagnostisk ved å evaluere nivåer av liganden (eller nukleinsyren som koder for den) hos pasienten, f. eks. i en tumorbiopsi eller ved forskjellige diagnostiske analyser slik som IHC, FISH, southern-blotting, PCR eller *in vivo*-analyser som er beskrevet ovenfor.

Uttrykket "cytotoksisk middel" som anvendt her referer til et stoff som inhiberer eller forhindrer cellers funksjon og/eller forårsaker ødeleggelse av celler. Uttrykket er ment å skulle inkludere radioaktive isotoper (f. eks. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² og radioaktive isotoper av Lu), kjemoterapeutiske midler og toksiner slik som småmolekyl toksiner eller enzymatisk aktive toksiner av bakterie-, sopp-, plante- eller animalsk opprinnelse, inkludert fragmenter og/eller varianter derav.

Et "kjemoterapeutisk middel" er en kjemisk forbindelse som er nyttig ved behandling av kraft. Eksempler på kjemoterapeutiske midler inkluderer alkyliserende midler slik som tiotepa og syklofosfamid (CYTOXAN), alkylsulfonater slik som busulfan, improsulfan og piposulfan, aziridiner slik som benzodopa, karbukon, meturedopa og uredopa, etylen-iminer og metylamelaminer inkludert altretamin, trietylenmelamin, trietylenfosforamid, trietylentiofosforamid og trimetylolomelamin, acetogener (spesielt bullatacin og bullatacinon), delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL), beta-lapachon, lapachol, kolchiciner, betulinsyre, et kamptotecin (inkludert den syntetiske analogen topotekan (HYCAMTIN), CPT-11 (irinotekan, CMAPTOSAR), acetylkamptotecin, skopolektin og 9-aminokamptotecin), bryostatin, calystatin, CC-1065 (inkludert dens syntetiske analoger av adozelesin, karzelesin og bizelesin), podofyllotoksin, podofyllinsyre, teniposid, kryptofyciner (spesielt kryptofycin-1 og kryptofycin-8), dolastatin, duokarmycin (inkludert de syntetiske analogene KW-2189 og CB1-TM1), eleuterobin, pankratisatin, et sarkodiktyin, spongistatin, nitrogensennep slik som klorambucil, klornafazin, kolofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretoamin, mekloretoaminoksidhydroklorid, melfalan, novembicin, fenesterin, prednimustin, trofosfamid, uracilsennep, nitrosoureaer slik som karmustin, klorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin og ranimustin, antibiotika slik som enediyn-antibiotika (f. eks. kalcheamicin, spesielt kalcheamicin-gamm1I og kalcheamicin-omega1I (se f. eks. Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))), dynemicin, inkludert dynemicin-a, et esperamicin, i tillegg til neokarzinostatin-kromofor og beslektede kromo-protein enediyn-antibiotika kromoforer), aklacinomysiner, aktinomycin, autramycin, azaserin, bleomyciner, kaktinomycin, karabycin, karminomycin, karzinofilin, kromomycinis, daktinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-okso-L-norleucin, doksorubicin (inkludert ADIAMYCIN, morfolino-doksorubicin, cyanomorfolino-doksorubicin, 2-pyrrolino-doksorubicin, doksorubicin-HCl-liposominjeksjon (DOXIL), liposomalt doksorubicin TLC-D-99 (MYOCET), pegylert liposomalt doksorubicin (CAELYX) og deoksydoksorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomyciner slik som mitomycin-C, mykofenolsyre, nogalamycin, olivomyciner, peplomycin, potfiromycin, puromycin, kelamycin, rodorubicin, streptongrin,

streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin, anti-metabolitter slik som metotreksat, gemcitabin (GEMZAR), tegafur (UFORAL), kapecitabin (XZELODA), et epotilon og 5-fluoruracil (5-FU), folsyreanaloger slik som denopterin, metotreksat, pteropterin, trimetreksat, purinanaloger slik som fludarabin, 6-markaptopurin, tiamiprin, tioguanin, pyrimidinanaloger slik som ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, karmofur, cytarabin, dideoksyuridin, doksifluridin, enocitabin, floksuridin, anti-adrenaler slik som aminoglutetimid, mitotan, trilostan, folsyreerstatte slik som frolinsyre, aceglaton, aldofosfamidglykosid, aminolevulinsyre, eniluracil, amsakrin, bestrabucil, bisantren, edatraksat, defofamin, demekolcin, diazikon, elfornitin, elliptiniumacetat, etoglucid, galliumnitrat, hydroksyurea, lentinan, lonidainin, maytansionider slik som maytansin og ansamitociner, mitoguazon, mitoxantron, mopidanmol, nitraerin, pentostatin, fenamet, pirarubicin, losoxantron, 2-etylhydrazid, prokarbazin, PSK-polysakkaridkompleks (HJS natural Products, Eugene, OR), razoxan, rizoksin, sizofiran, spirogermanium, tenuazonsyre, triazikon, 2,2',2''-triklortrietylamin, trikotecener (spesielt T-2-toksin, verracurin-A, roridin-A og anguidin), uretan, dakarbazin, mannomustin, mitobronitol, mitolaktol, pipobroman, gacytosin, arabinosid ("Ara-C"), tiotepa, taxoid, f. eks. paclitaksel (TAXOL), albuminfremstilt nanopartikkel formulering av paclitaksel (ABRAXANE) og docetaksel (TAXOTERE), kloranbucil, 6-tioguanin, merkaptopurin, metotreksat, platinamidler slik som cisplatin, oksaliplatin og karboplatin, vinkaer som forhindrer tubulin-polymerisering fra å danne mikrotubuli, inkludert vinblastin (VELBAN), vinkristin (ONCOVIN), vindesin (ELIDISIN, FILDESIN) og vinorelbin (NAVELBIN), etoposid (VP-16), ifosfamid, mitoxantron, leukovorin, novantron, edatreksat, daunomycin, aminopterin, ibandronat, topoisomerase-inhibitor RFS 2000, difluormetylorinitin (DMFO), retionider slik som retinsyre, inkludert beksaroten (TARGRETIN), bisfosfonater slik som klodronat (for eksempel BONEFOS eller OSTAC), etidronat (DIDROCAL), NE-58095, zoledronsyre/zoledronat (ZOMETA), alendronat (FOSAMAX), pamidronat (AREDIA), tiludronat (SKELID) eller risedronat (ACTONEL), troksacitabin (en 1,3-dioksolannukleotid cytosinalog), antisensoligonukleotider, spesielt de som inhiberer ekspresjon av gener i signaliseringsveier som er implisert i feilaktig celleproliferasjon, slik som for eksempel PKC-alfa, Raf, H-Ras og epidermal vekstfaktorreseptor (EGF-R), vaksiner slik som THERATOPE-vaksine og genterapi vaksiner, for eksempel ALLOVECTIN-vaksine, LEUVECTIIN-vaksine og VAXID-vaksine, topoisomerase-1-inhibitor (f. eks. LURTOTECAN), rmRH (f. eks. ABARELIX), BAY439006 (sorafenib, Bayer), SU-11248 (Pfizer), perifosin, COX-2-inhibitor (f. eks. celecoxib eller etoricoxib), proteosominhibitor (f. eks. PS341), bortezomib (VELCADE), CCI-779, tipifarnib (R11577), orafenib, ABT510, Bcl-2-inhibitor slik som oblimersennatrium (GENA-SENSE), pixantron, GFR-inhibitorer (se definisjonen nedenfor), tyrosinkinase-inhibitorer (se definisjonen nedenfor) og farmasøytisk akseptable salter, syrer eller derivater av en hvilken som helst av de som er nevnt ovenfor, i tillegg til kombinasjoner av to eller flere av de som er nevnt ovenfor, slik som CHOP, som er en forkortelse for en kombinert terapi med syklofosfamid, doksorubicin, vinkristin og

prednisolon, og FOLFOX, som er en forkortelse for et behandlingsregime med oksaliplatin (ELOXATIN) kombinert med 5-FU og leukovorin.

Også inkludert i denne definisjonen er anti-hormonmidler som virker for å regulere eller inhibere hormonvirkning på tumorer slik som anti-østrogener med blandet

agonist/antagonist profil, inkludert tamoxifen (NOLVADEX), 4-hydroksytamoksifen, toremifen (FARESTON), idoksifen, droloksifen, raloksifen (EVISTA), trioksifen, keoksifen og selektive østrogenreseptormodulatorer (SERM) slik som SERM3, rene anti-østrogner uten agonistegenskaper slik som fulvestrant (FASLODEX) og EM800 (slike midler kan blokkere østrogenreseptor (ER)-dimerisering, inhibere DNA-binding, øke ER-omsetning og/eller

undertrykke ER-nivåer), aromataseinhibitorer, inkludert steriode aromatase-inhibitorer slik som formestan og exemestan (AROMASIN) og ikke-steriode aromatase-inhibitorer slik som anastrozol (ARIMIDEX), letrozol (FEMARA) og aminoglutetimid og andre aromatase-

inhibitorer inkludert vorozol (RIVISOR), megestrolacetat (MEGASE), fadrozol, imidazol, luteiniserende hormonfrigjørende hormonagonister, inkludert leuprolin (LUPRON og

ELIGARD), goserelin, buserelin og tripterelin, sex-steroider, inkludert progestiner slik som megesrolacetat og medroksyprogesteronacetat, østrogener slik som dietylstilbestrol og premarin og androgener/retinoider slik som fluoksymesteron, all-transretinolsyre og feretinid, onapriston, anti-progesteroner, østrogen-reseptor nedregulatorer (ERD), anti-androgener slik som flutamid, nilutamid og bikalutamid, testolakton og farmasøytisk

akseptable salter, syrer eller derivater av en hvilket som helst av de som er nevnt ovenfor, i tillegg til kombinasjoner av to eller flere av de som er nevnt ovenfor.

Som benytte her refererer uttrykket "EGFR2-målrettet legemiddel" til et terapeutisk middel som binder til EGFR og som eventuelt inhiberer EGFR-aktivering. Eksempler på slike midler inkluderer antistoffer og små molekyler som binder til EGFR. Eksempler på

antistoffer som binder til EGFR inkluderer MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (se US patentskrift nr. 4 943 533, Mendelsohn et al.) og varianter derav, slik som kimærisert 225 (C225 eller Cetuximab, ERBUTIX) og ombygd humant 225 (H225) (se WO 96/40210, Imclone Systems Inc.), IMC-11F8, et fullt humant EGFR-målrettet antistoff (Imclone), antistoffer som binder

type-II-mutant-EGFR (US patentskrift nr. 5 212 290), humaniserte og kimære antistoffer som binder EGFR som beskrevet i US patentskrift nr. 5 891 996 og humane antistoffer som binder EGFR slik som ABX-EGF eller panitumumab (se WO 98/50433, Abgenix/Amgen), EMD 55900 (Stragliotto et al., Eur. J. Cancer., 32A:636-640 (1996)), EMD7200 (matuzumab), et humanisert EGFR-antistoff som er rettet mot EGFR som konkurrerer med både EGF- og

TGF-alfa om EGFR-binding (EMD/Merck), humant EGFR-antistoff, HuMax-EGFR (GenMab), fullt humane antistoffer som er kjent som E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.2 og E7.6.3 og beskrevet i US patentskrift nr. 6 235 883, MDX-447 (Medarex Inc.) og mAb 806 eller humanisert mAb 806 (Johns et al., J. Biol., Chem., 279(29):30375-30384 (2004)).

Anti-EGFR-antistoffet kan være konjugert med et cytotoxisk middel for slik å generere et

immunkonjugat (se for eksempel EP 659 439A2, Merck Patent GmbH). EGFR-antagonister inkluderer småmolekyler slik som forbindelser beskrevet i US patentskrift nr. 5 616 582, 5 457 105, 5 475 001, 5 654 307 5 679 683, 6 084 095, 6 265410, 3 6455 534, 6 521 620, 6 596 726, 6 713 484, 5 770 599, 6 140 332, 5 866 572, 6 399 602, 6 344 459, 6 602 863, 5 6 391 874, 6 344 455, 5 760 041, 6 022 008 og 5 747 498 så vel som i de følgende PCT-publikasjoner: WO 98/14451, WO 98/50038, WO 99/09016 og WO 99/24037. Spesielle småmolekyl-EGFR-antagonister inkluderer OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA, Genentech/OSI Pharmaceuticals), PD 183805 (CI 1033, 2-propenamid, N-[4-[(3-klor-4-fluorfenyl)amino]-7-[3-(4-morfolinyl)propoksy]-6-kinazoliny]-, dihydroklorid, Pfizer Inc.), 10 ZD1839, gefitinib (IRESSA) 4-(3'-klor-4'-fluoranilino)-7-metoksy-6-(3-morfolinopropoksy)-kinazolin, AstraZeneca), ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metylfenylamino)-kinazolin, Zeneca), BIBX-1382 (N8-(3-klor-4-fluorfenyl)-N2-(1-metylpiiperidin-4-yl)-pyrimido[5,4-d]pyrimidin-2,8-diamin, Boehringer Ingelheim), PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-fenyletyl)amino]-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-yl]-fenol), (R)-6-(4-hydroksyfenyl)-4-[(1-fenyletyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin), 15 CL-387785 (N-[4-[(3-bromfenyl)amino]-6-kinazoliny]-2-butynamid), EKB-569 (N-[4-[(3-klor-4-fluorfenyl)amino]-3-cyano-7-etoksy-6-kinoliny]-4-(dimetylamino)-2-butenamid) (Wyeth), AG1478 (Sugen), AG1571 (SU 5271, Sugén), toverdig EGFR/HER2-tyrosinkinaseinhibitorer slik som lapatinib (GW 572016 eller N-[3-klor-4-(3-fluorfenyl)-metoksy]fenyl]-6-[5-[[[2-metylsulfonyl]etyl]amino]metyl]-2-furanyl]-4-kinazolinamin, 20 Glaxo-SmithKline eller cyanoguanidin-kinazolin og cyanoamidin-kinazolamin derivater.

En "tyrosinkinase-inhibitor" er et molekyl som inhiberer tyrosinkinaseaktivitet for en tyrosinkinase slik som en HER-reseptor. Eksempler på slike inhibitorer inkluderer EGFR-måltrettede legemidlene som er nevnt i det tidligere avsnittet, småmolekyl-HER2-tyrosinkinase-inhibitor slik som TAK165 som er tilgjengelig fra Takeda, CP-724 714, en oral 25 selektiv inhibitor av ErbB2-reseptor-tyrosinkinase (Pfizer og OSI), toverdige HER-inhibitorer slik som EKB-569 (tilgjengelig fra Wyeth) som fortrinnsvis binder EGFR, men inhiberer både HER2- og EGFR-overuttrykkende celler, lapatinib (GW572016, tilgjengelig fra Glaxo-SmithKline) en oral HER2- og EGFR-tyrosinkinaseinhibitor, PKI-166 (tilgjengelig fra Novartis), pan-HER-inhibitorer slik som kanertinib (CI-1033, Pharmacia), Raf-1-inhibitorer 30 slik som antisens-middel ISIS-5132 som er tilgjengelig fra ISIS Pharmaceuticals som inhiberer Raf-1-signalisering, ikke-HER-måltrettede TK-inhibitorer slik som Imatinibmesylat (GLEEVACJ) tilgjengelig fra Glaxo, MAPK-ekstracellulær regulert kinase-I-inhibitor CI-1040 (tilgjengelig fra Pharmacia), kinazoliner slik som PD 153035, 4-(3-kloranilino)kinazolin, pyridopyrimidiner, pyrimidopyrimidiner, pyrrolopyrimidiner slik som CGP 59326, CGP 60261 35 og CGP 62706, pyrazolopyrimidiner, 4-(fenylamino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidiner, kurkumin (diferuloylmetan, 4,5-bis(4-fluoranilino)ftalamid), tyrfostiner som inneholder nitrotiofen-enheter, PD-0183805 (Warner-Lambert), antisensmolekyler (for eksempel de som binder til HER-kodende nukleinsyrer), kinoksazoliner (US patentskrift nr. 5 804 396, tryfostiner (US patentskrift nr. 5 804 396, ZD6474 (AstraZeneca), PTK-787

(Novartis/Schering AG), pan-HER-inhibitorer slik som CI-1033 (Pfizer), Affinitac (ISIS 3521, Isis/Lilly), imatinibmesylat (Geevac, Novartis), PKI 166 (Novartis), GW2016 (Glaxo Smith-Kline), CI-1033 (Pfizer), EKB-569 (Wyeth), Semaxinib (Sugen), ZD6474 (AstraZeneca), PTK-787 (Novartis/Schering AG), INC-1C11 (Imclone), cyanoguanidinkinazolin og

5 cyanoamidin-kinazolamin-derivater, eller som beskrevet i enhver av de følgende patentpublikasjoner: US patentskrift nr. 5 804 396, WO 99/09016 (American Cyanamid), WO 98/43960 (American Cyanamid), WO 97/38983 (Warner Lambert), WO 99/06378 (Warner Lambert), WO 99/06396 (Warner Lambert), WO 96/30347 (Pfizer, Inc), WO 96/33978 (Zeneca), WO 96/3397 (Zeneca), WO 96/33980 (Zeneca) og US 2005/0101617.

10 Et "anti-angiogent middel" refererer til en forbindelse som blokkerer, eller i som i noen grad interfererer med, utvikling av blodkar. Den anti-angiogene faktoren kan for eksempel være et lite molekyl eller et antistoff som binder til en vekstfaktor eller vekstfaktor-reseptor som er involvert i å promotere angiogenese. Den foretrukne anti-angiogene faktoren her et antistoff som binder til en vaskulærendotel-vekstfaktor (VEGF), slik som

15 bevacizumab (AVASTIN).

Uttrykket "cytokin" er et generisk uttrykk for proteiner som frigjøres av en cellepopulasjon som virker på en annen celle som intercellulære mediatorer. Eksempler på slike cytokiner er lymfokiner, monokiner og tradisjonelle polypeptid-hormoner. Inkludert blant cytokinene er veksthormon slik som humant veksthormon, N-metionyl humant veksthormon

20 og bovint veksthormon, paratyroidhormon, tyroksin, insulin, proinsulin, relaksin, prorelaksin, glykoproteinhormoner slik som follikelstimulerende hormon (FSH), tyroidstimulerende hormon (TSH) og luteiniserende hormon (LH), hepatisk vekstfaktor, fibroblastvekstfaktor, prolaktin, placentalakto-gen, tumornekrosefaktor- α og - β , mullerianinhiberende faktor, musegonadotropinassosiert peptid, inhibin, aktivin, vaskulærendotel-vekstfaktor,

25 integrin, trombopoietin (TPO), nervekstfaktorer slik som NGF- β , platevekstfaktorer, transformerende vekstfaktorer (TGF) slik som TGF- α og TGF- β , insulinlignende vekstfaktor-I og -II, erytropoietin (EPO), osteoinduktive faktorer, interferoner slik som interferon- α , - β og - γ , kolonistimulerende faktorer (CSF) slik som makrofag-CSF (M-CSF), granulocyt-makrofag-CSF (GM-CSF) og granulocyt-CSF (G-CSF), interleukiner (IL) slik som IL-1, IL-

30 1 α , IL-2, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, en tumornekrosefaktor slik som TNF- α eller TNF- β og andre polypeptidfaktorer inkludert LIF og sett ligand (KL). Som benyttet her inkluderer uttrykket cytokin proteiner fra naturlige kilder eller fra rekombinant cellestruktur og biologisk aktive ekvivalenter av nativsekvens cytokiner.

35 II. HER2-antistoff variantpreparat

Foreliggende oppfinnelse vedrører HER2-antistoff sammensetningen som definert i kravene.

Tilstedeværelse av den aminoterminal lederforlengelsen i sammensetningen kan påvises ved hjelp av ulike analytiske teknikker inkludert N-terminal sekvensanalyse, analyse

for ladningsheterogenitet (for eksempel kationebytter kromatografi eller kapillærsone elektroforese), massespektrometri osv. Mengden av antistoffvarianter i sammensetningen ligger vanligvis i området fra en mengde som utgjør den nedre deteksjonsgrense for en hvilken som helst analyse (fortrinnsvis kationebytter analyse) som anvendes for å påvise
 5 varianten til en mengde som er mindre enn mengden av hovedtype antistoff.

Fra 5 % til omtrent 15 %, og fortrinnsvis fra omtrent 8 % til omtrent 12 % av antistoffmolekylene i sammensetningen omfatter en aminoterminal lederforlengelse. Slike prosentvise mengder blir fortrinnsvis bestemt ved å benytte kationebytter analyse.

Bortsett fra den aminoterminal lederforlengelsesvarianten er ytterligere amino-
 10 syresekvens endringer i hovedtype antistoffet og/eller varianten påtenkt, inkludert et antistoff som omfatter en C-terminal lysinrest på en eller begge den tunge kjedene derav (en slik antistoffvariant kan foreligge i en mengde fra omtrent 1 % til omtrent 20 %), en deamidert antistoffvariant (for eksempel der Asn-386 og/eller Asn-391 på en eller begge den tunge kjedene til pertuzumab er deamidert), antistoff med én eller flere oksiderte
 15 metioninrester (for eksempel pertuzumab som omfatter oksidert met-254) osv.

Videre kan hovedtype-antistoffet ytterligere omfatte glykosylerings-variasjoner, eksempler på dette inkluderer antistoff som omfatter en G1- eller G2-oligosammaridstruktur bundet Fc-regionen derav, antistoff som omfatter en karbohydratenhet bundet til en lettkjede derav (f. eks. én eller to karbohydratenheter, slik som glukose eller galaktose,
 20 bundet til én eller to lettkjeder av antistoffet, for eksempel bundet til én eller flere lysinrester), antistoff som omfatter én eller to ikke-glykosylerte tungkjeder eller antistoffer som omfatter et sialylert oligosakkarid bundet til én eller to tungkjeder derav osv.

I tillegg tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som omfatter én eller to lettkjeder, der den ene eller den andre eller begge den lette kjedene omfatter immunsyresekvensen
 25 ifølge SEKV ID Nr.23. Dette antistoffet omfatter ytterligere én eller to tungkjeder der den ene eller den andre eller begge den tunge kjedene omfatter aminosyresekvensen ifølge SEKV ID Nr.16 eller SEKV ID Nr.24 (eller deamiderte og/eller oksiderte varianter derav).

Sammensetningen kan bli gjenvunnet fra en genetisk endret cellelinje, f. eks. en kinesisk hamsterovarie (CHO)-cellelinje som uttrykker HER2-antistoffet, eller kan bli
 30 fremstilt ved hjelp av peptidsyntese.

III. Fremstilling av HER2-antistoffer

En beskrivelse følger her som gir eksempelmessige teknikker for fremstillingen av antistoffene som blir benyttet i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse. HER2-
 35 antigenet som skal bli benyttet ved fremstillingen av antistoffer kan f. eks. være en løselig form av det ekstracellulære domenet i HER2 eller en del derav, som inneholder den ønskede epitopen. Alternativt kan celler som uttrykker HER2 på sin celleoverflate (f. eks. NIH-3T3-celler transformert slik at de overuttrykker HER2, eller en karsinomcellelinje slik som SK-BR-3-celler, se Stancovski et al., PNAS (USA), 88:8691-8695 (1991)) bli benyttet for å

generere antistoffer. Andre former av HER2 som er nyttig for å generere antistoffer vil være åpenbare for fagfolk på området.

(i) *Polyklonale antistoffer*

Polyklonale antistoffer blir fortrinnsvis frembrakt i dyr ved flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigenet og en adjuvans. Det kan være nyttig å konjugere det relevante antigenet til et protein som er immunogent i arten som skal bli immunisert, f. eks. keyhole limpet hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyabønne-trypsininhibitor ved å benytte et bifunksjonelt eller derivatiserende middel, for eksempel maleimidobenzoylsulfosuksinimidester (konjugering via cysteinrester), N-hydroksysuksinimid (via lysinrester), glutaraldehyd, suksinanhydrid, SOCl_2 eller $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, der R og R^1 er ulike alkylgrupper.

Dyr blir immunisert mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved å kombinere f. eks. 100 g eller 5 g av proteinet eller konjugatet (for henholdsvis kaniner eller mus) med 3 volumer av Freund's komplette adjuvans og injisere løsningen intradermalt på flere steder. En måned senere blir dyrene boostret med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden med peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvans ved subkutan injeksjon på flere steder. 7 til 14 dager senere blir dyrene tappet og serumet blir analysert for antistofftiter. Dyr blir boostret inntil tittet når et platå. Fortrinnsvis blir dyrene boostret med konjugatet av det samme antigenet, men konjugert til et annet protein og/eller via et annet kryssbindingsreagens. Konjugater kan også bli fremstilt i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner. Også aggregerende midler slik som alum anvendes hensiktsmessig for å forsterke immunresponsen.

(ii) *Monoklonale antistoffer*

Monoklonale antistoffer blir fremskaffet fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer dvs. de individuelle antistoffene som omfatter populasjonen er identiske og/eller binder til den samme epitopen, bortsett fra mulige varianter som kan oppstå i løpet av fremstilling av de monoklonale antistoffene, slik som de variantene som er beskrevet her. Endringsordet "monoklonal" indikerer på det vis karakteren til antistoffet som ikke å være en blanding av særskilte antistoffer.

De monoklonale antistoffene kan for eksempel bli fremstilt ved å benytte hybridomteknikken som først ble beskrevet av Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) eller kan bli fremstilt ved rekombinante DNA-teknikk (US patentskrift nr. 4 816 567).

I hybridomteknikken blir en mus eller annet passende vertsdyr, slik som en hamster, immunisert som beskrevet ovenfor for å frembringe lymfocytter som produserer eller som er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt vil binde til proteinet som blir benyttet til immunisering. Alternativt kan lymfocytter bli immunisert *in vitro*. Lymfocytter blir deretter fusjonert med myelomceller ved å benytte et passende fusjoneringsmiddel, slik

som polyetylenglykol, for å danne en hybridomcelle (Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic press, 1986)).

Hybridomcellene som er fremstilt på denne måten blir sådd ut og dyrket i passende kulturmedium som fortrinnsvis inneholder ett eller flere stoffer som inhiberer veksten eller overlevelsen av ufusjonerte, opphavsmyelomceller. Hvis opphavsmyelomcellene for eksempel mangler enzymet hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HGPRT eller HPRT), vil kulturmediet for hybridomene typisk inkludere hypoxantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), der disse stoffene forhindrer veksten av HGPRT-manglende celler.

Foretrukne myelomceller er de som fusjonerer effektivt, som støtter stabil høynivå produksjon av antistoff ved de valgte antistoff-produserende cellene og som er sensitive ovenfor et medium slik som HAT-medium. Blant disse er foretrukne myelomcellelinjer murine myelomcellelinjer, slik som de som er avledet fra MOPC-21- og MPC-11-muse-tumorer som er tilgjengelige fra the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA og SP-2- eller X63-Ag8-653-celler som er tilgjengelige fra the American Type Culture collection, Rockville, Maryland, USA. Humane myelomcellelinjer og muse-humane heteromyelomcellelinjer har også blitt beskrevet for produksjon av humane, monoklonale antistoffer (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) og Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, s. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Kulturmedium i hvilket hybridomcellene vokser blir analysert for produksjon av monoklonale antistoffer som er rettet mot antigenet. Fortrinnsvis blir bindingsspesifisiteten til monoklonale antistoffer som er produsert av hybridomceller bestemt ved immunpresipitering eller ved en *in vitro*-bindingsanalyse, slik som radioimmun-analyse (RIA) eller enzym-bundet-immunabsorbent-analyse (ELISA).

Bindingsaffiniteten til det monoklonale antistoffet kan, for eksempel, bli bestemt ved Scatchard-analysen til Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Etter at hybridomceller som produserer antistoffer med den ønskede spesifisiteten, affiniteten og/eller aktiviteten er identifisert, kan klonene bli subklonet ved begrensede fortynningsprosedyrer og dyrket ved hjelp av standard fremgangsmåter (Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic Press, 1986)). Egnede kulturmedier til dette formålet inkluderer for eksempel D-MEM- eller RPMI-1640-medium. I tillegg kan hybridomcellene bli dyrket *in vivo* som ascitestumorer i et dyr.

De monoklonale antistoffene som ble utskilt av subklonene ble hensiktsmessig separert fra kulturmediet, ascitesvæsken eller serumet ved hjelp av konvensjonelle antistoffrenseprosedyrer, slik som for eksempel protein-A-sefarse, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

DNA som koder for de monoklonale antistoffene kan enkelt bli isolert og sekvensert ved å benytte konvensjonelle prosedyrer (f. eks. ved å benytte oligonukleotidprober som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for de tunge og de lette kjedene til murine antistoffer). Hybridomcellene tjener som en foretrukket kilde for slik DNA. Med en gang

det er isolert, kan DNA bli plassert i ekspresjonsvektorer, som deretter blir transfektert inn i vertsceller slik som *E. coli*-celler, ape-COS-celler, kinesisk hamsterovarie (CHO)-celler eller myelomceller som ikke ellers produserer antistoffprotein, for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. Oversiktsartikler om rekombinant ekspresjon i bakterier av DNA som koder for antistoffet inkluderer Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) og Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

I en ytterligere utførelsesform kan monoklonale antistoffer eller antistofffragmenter bli isolert fra antistoff bakteriofag biblioteker som er generert ved å benytte teknikker som er beskrevet i McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) og Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) beskriver isoleringen av henholdsvis murine og humane antistoffer, ved å benytte bakteriofag-biblioteker. Etterfølgende publikasjoner beskriver produksjonen av humane høyaffinitets antistoffer (nM-område) ved hjelp av kjedeombytting (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)) i tillegg til kombinatorisk infeksjon og *in vivo*-rekombinasjon som en strategi for å konstruere svært stor bakteriofagbiblioteker (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). På den måten er disse teknikkene levedyktige alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoff hybridometnikker for isolering av monoklonale antistoffer.

DNAet kan også bli modifisert, for eksempel ved å sette den kodende sekvensen for humane tungkjede- og lettkjede konstante domener i stedet for de homologe, murine sekvensene (US patentskrift nr. 4 816 567 og Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), eller ved kovalent å sammenføye til den immunglobulin-kodende sekvensen hele eller deler av den kodende sekvensen for et ikke-immunglobulin polypeptid.

Typisk blir slike ikke-immunglobulin polypeptider satt i stedet for konstantdomener til et antistoff, eller de blir satt i stedet for variabeldomenene til ett antigenkombinerende sete på et antistoff for å danne et kimært, bivalent antistoff, som omfatter ett antigenkombinerende sete som har spesifisitet for et antigen og et annet antigenkombinerende sete som har spesifisitet for et annet antigen.

(iii) Humaniserte antistoffer

Fremgangsmåte for humanisering av ikke-humane antistoffer har blitt beskrevet på fagområdet. Fortrinnsvis har et humanisert antistoff fått én eller flere aminosyrerester introdusert inn i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene blir ofte referert til som "importrester", som typisk er tatt fra et "import variabelomene". Humanisering kan hovedsakelig bli utført ved å følge fremgangsmåten til Winter og samarbeidspartnere (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) ved å sette hypervariabelregionsekvenser i stedet for de tilsvarende sekvensene til et humant antistoff.

Dermed er slike "humaniserte" antistoffer kimære antistoffer (US patentskrift nr. 4 816 567) der vesentlig mindre enn et intakt, humant variabeldomene har blitt erstattet med den tilsvarende sekvensen fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer typisk humane antistoffer der noen hypervariabelregionrester, og muligens noen FR-rester, er erstattet med rester fra analoge seter på gnagerantistoffet.

Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal bli benyttet for å fremstille de humaniserte antistoffene, er svært viktige for å redusere antigenisitet. Ifølge den såkalte «best-fit»-fremgangsmåten blir sekvensen til det variable domenet til et gnagerantistoff screenet mot hele biblioteket av kjente humane variabelt domene-sekvenser. Den humane sekvensen som er nærmest den fra gnageren blir deretter akseptert som den humane rammeverksregionen (FR) for det humaniserte antistoffet (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993), Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). En annen fremgangsmåte benytter en spesiell rammeverksregion som er avledet fra konsensus-sekvensen til alle humane antistoffer i en spesiell undergruppe av lette eller tunge kjeder. Det samme rammeverket kan bli benyttet til flere ulike humaniserte antistoffer (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4285 (1992), Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Det er ytterligere viktig at antistoffer blir humanisert med opprettholdelse av høy affinitet for antigenet og andre fordelaktige, biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet, fremstilles humaniserte antistoffer i henhold til en foretrukket fremgangsmåte, ved hjelp av en prosess med analyse av foreldresekvensene og forskjellige konseptuelle, humaniserte produkter ved å benytte tredimensjonale modeller av foreldre- og de humaniserte sekvensene. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er allment tilgjengelige og er kjent for fagfolk på området. Dataprogrammer er tilgjengelige som illustrerer og fremviser sannsynlige tredimensjonale, konformasjonelle strukturer for valgte kandidat immunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse fremvisningene muliggjør analyse av den sannsynlige rollen for restene i virkningen til kandidat-immunglobulinsekvensen, dvs. analysen av rester som påvirker evnen til kandidat-immunglobulinet til å binde sitt antigen. På denne måten kan FR-rester bli valgt og kombinert fra mottaker- og importsekvensene slik at de ønskede antistoffkarakteristika, slik som økt affinitet for målantigenet/antigenene blir oppnådd. Generelt er hypervariabelregionrestene direkte og mer vesentlig involvert i påvirkning av antigenbinding.

WO 01/00245 beskriver fremstilling av eksempelmessige, humaniserte HER2-antistoffer som binder HER2 og som blokkerer ligandaktivering for en HER-reseptor. Det humaniserte antistoffet av spesiell interesse her blokkerer EGF, TGF- α og/eller hERG-mediert aktivering av MAPK hovedsakelig så effektiv som intakt, murint, monoklonale antistoff 2C4 (eller et Fab-fragment derav) og/eller binder HER2 hovedsakelig like effektivt som intakt, murint, monoklonalt antistoff 2C4 (eller et Fab-fragment derav). Det humaniserte anti-stoffet her kan, for eksempel, omfatte ikke-humane

hypervariabelregionrester inkorporert inn i et humant variabelt tungdomene og kan ytterligere omfatte en rammeverksregion (FR)-substitusjon på en posisjon som er valgt fra gruppen som består av 69H, 71H og 73H ved å benytte variabeldomene nummereringssystemet som er fremlagt ifølge Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). i én utførelsesform omfatter et humanisert antistoff FR-substitusjoner på to eller alle posisjonene 69H, 71H og 73H.

Et eksempelmessig, humanisert antistoff av interesse her omfatter variabeltung komplementaritetsbestemmende rester GFTFTDXYMX, der X fortrinnsvis er D eller S (SEKV ID Nr.7), DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEKV ID Nr. 8) og/eller NLGPSFYFDY (SEKV ID Nr.9), som eventuelt omfatter aminosyremodifiseringer på disse CDR-restene, f. eks. der modifiseringene hovedsakelig opprettholder eller forbedrer affinitet til antistoffet. Antistoffvarianten av interesse kan for eksempel ha fra omtrent én til omtrent sju eller omtrent fem aminosyresubstitusjoner i de variable tung-CDR-sekvensene ovenfor. Slike antistoffvarianter kan bli fremstilt ved hjelp av affinitetsmodning, f. eks. som beskrevet nedenfor. Det mest foretrukne humaniserte antistoffet omfatter den variable tung-aminosyresekvensen ifølge SEKV ID Nr.4.

Det humaniserte antistoffet kan omfatte variabel lett komplementaritetsbestemmende rester KASQDVSIGVA (SEKV ID Nr.10), SASYX¹X²X³, der X¹ fortrinnsvis er R eller L, X² er fortrinnsvis Y eller E og X³ er fortrinnsvis T eller S (SEKV ID Nr.11) og/eller QQYYIYPYT (SEKV ID Nr.12), f. eks. i tillegg til de variable tungdomene-CDR-restene i det foregående avsnittet. Slike humaniserte antistoffer omfatter eventuelt aminosyremodifiseringer av CDR-restene ovenfor, f. eks. der modifiseringene hovedsakelig opprettholder eller forbedrer affinitet til antistoffet. Antistoffvarianten av interesse kan for eksempel ha fra omtrent en til omtrent syv eller omtrent fem aminosyresubstitusjoner i de variable lett-CDR-sekvensene ovenfor. Slike antistoffvarianter kan bli fremstilt ved affinitetsmodning, f. eks. som beskrevet nedenfor. Det mest foretrukne humaniserte antistoffet omfatter den variable lett aminosyresekvensen i SEKV ID Nr.3.

Foreliggende søknad påtenker også affinitetsmodnede antistoffer som binder HER2 og blokkerer ligandaktivering for en HER-reseptor. Foreldreantistoffet kan være et humant antistoff eller et humanisert antistoff, f. eks. ett som omfatter variabel lett- og/eller variabel tungsekvensen i henhold til SEKV ID Nr.3 og 4 (dvs. variant 574). Det affinitetsmodnede antistoffet binder fortrinnsvis til HER2-reseptoren med en affinitet som er overlegen i forhold til den for intakt, murint 2C4 eller intakt variant 574 (f. eks. fra omtrent to til omtrent fire ganger, til omtrent 100 ganger eller omtrent 1000 ganger forbedrer affinitet, f. eks. som undersøkt ved å benytte en HER2-ekstracellulærdomene-(ECD) ELISA). Eksempelmessige variable tung-CDR-rester for substitusjon inkluderer H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 eller kombinasjoner av to eller flere (f. eks. to, tre, fire, fem, seks eller syv

av disse restene). Eksempler på variable lett-CDR-rester for endring inkluderer L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 eller kombinasjoner av to eller flere (f. eks. to til tre, fire, fem eller opp til ti av disse restene).

Ulike former av det humaniserte antistoffet eller affinitetsmodnede antistoffet er påtenkt. For eksempel kan det humaniserte antistoffet eller det affinitetsmodnede antistoffet være et antistoff-fragment, slik som et Fab-fragment som eventuelt er konjugert med ett eller flere cytotoksiske midler for å generere et immunkonjugat. Alternativt kan det humaniserte antistoffet eller det affinitetsmodnede antistoffet være et intakt antistoff, slik som et intakt IgG1-antistoff.

(iv) *Humane antistoffer*

Som et alternativ til humanisering kan humane antistoffer bli fremstilt. Det er for eksempel nå mulig å fremstille transgene dyr (f. eks. mus) som ved immunisering er i stand til å produsere et fullt repertoar av humane antistoffer i fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Det har for eksempel blitt beskrevet at den homozygote delesjonen av antistoffets tungkjede sammenbindende region (J_H)-genet i kimære og kimlinjemutante mus fører til fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av den humane kimlinje immunglobulinsamlingen til slike kimlinjemutante mus vil føre til produksjon av humane antistoffer etter antigen utfordring. Se f. eks. 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) og US patentskrift nr. 5 591 669, 5 589 369 og 5 545 807.

Alternativt kan fagvisningsteknologi (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) bli benyttet for å produsere humane antistoffer og antistoff-fragmenter *in vitro*, fra immunglobulin variabelt (V)-domene genrepertoarer fra uimmuniserte donorer. Ifølge denne teknikken blir antistoff-V-domenegener klonet i ramme i enten et hoved kappeprotein gen eller et mindre kappeprotein gen for en filamentøs bakteriofag, slik som M13 eller fd, og fremvist som funksjonelle antistoff-fragmenter på overflaten av bakteriofagpartiklene. Fordi den filamentøse partikkelen inneholder en enkelttrådet DNA-kopi av bakteriofag genomet, fører seleksjoner som er basert på de funksjonelle egenskapene til antistoffet også til seleksjon av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Slik mimikerer bakteriofagen noen av egenskapene til B-cellen. Fagvisning kan bli utført i en mengde forskjellige formater, for deres gjennomgåelse se f. eks. Johnson, Kevin S. og Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology, 3:564-571 (1993). Flere kilder for V-gen segmenter kan bli benyttet til fagvisning. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) isolerte et bredt utvalgt av anti-oksazolonantistoffer fra et lite, tilfeldig kombinatorisk bibliotek av V-gener som stammer fra fra miltene til immuniserte mus. Et repertoar av V-gener fra ikke-immuniserte, humane donorer kan bli konstruert og antistoffer mot et bredt utvalg av antigener (inkludert selv-antigener) bli isolert hovedsakelig ved å følge teknikkene

som er beskrevet av Marks, et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) eller Griffith et al., EMBO J, 12:825-734 (1993). Se også US patentskrift nr. 5 565 322 og 5 573 905.

Humane antistoffer kan også bli generert av *in vitro*-aktiverede B-celler (se US patentskrift nr. 5 567 610 og 5 229 275).

- 5 Humane HER2-antistoffer er beskrevet i US patentskrift nr. 5 772 997, meddelt 30. juni 1998 og i WO 97/00271, publisert 3. januar 1997.

(v) Antistoff-fragmenter

Forskjellige teknikker har blitt utviklet for fremstillingen av antistoff-fragmenter.

- 10 Tradisjonelt ble disse fragmentene avledet via proteolytisk spalting av intakte antistoffer (se f. eks. Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical methods, 24:107-117 (1992) og Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Disse fragmentene kan imidlertid nå bli fremstilt direkte ved hjelp av rekombinante vertsceller. Antistoff-fragmentene kan for eksempel bli isolert fra antistoff bakteriofagbiblioteker som beskrevet ovenfor. Alternativt
- 15 kan Fab'-SH-fragmenter bli direkte gjenvunnet fra *E. coli* og kjemisk koblet for å danne F(ab')₂-fragmenter (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Ifølge en annen tilnærming kan F(ab')₂-fragmenter bli isolert direkte fra rekombinant vertscellekultur. Andre teknikker for fremstillingen av antistoff-fragmenter vil være åpenbare for fagfolk på området. I andre utførelsesformer er antistoffet som er valgt et enkeltkjede-Fv-fragment
- 20 (scFv). Se WO 93/16185, US patentskrift nr. 5 571 894 og US patentskrift nr. 5 587 458. Antistoff-fragmentet kan også være et "lineært antistoff", f. eks. som beskrevet i US patentskrift nr. 5 641 870. Slike lineære antistoff-fragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

25 (vi) Bispesifikke antistoffer

- Bispesifikke antistoffer er antistoffer som har bindingsspesifisiteter for minst to ulike epitoper. Eksempelmessige, bispesifikke antistoffer kan binde til to ulike epitoper på HER2-proteinet. Andre slike antistoffer kan kombinere et HER2-bindingssete med bindings-
- 30 seter for EGFR, HER3 og/eller HER4. Alternativt kan en HER2-arm bli kombinert med en arm som binder til et utløsende molekyl på en leukocyt slik som et T-cellereseptor molekyl (f. eks. CD2 eller CD3) eller Fc-reseptorer for IgG (FcγR), slik som FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) og FcγRIII (CD16) for å fokusere cellulære forsvarsmekanismer til den HER2-uttrykkende cellen. Bispesifikke antistoffer kan også bli benyttet for å lokalisere cyto-
- 35 toksiske midler til celler som uttrykker HER2. Disse antistoffene innehar en HER2-bindende arm og en arm som binder det cytotoxiske middelet (f. eks. saporin, anti-interferon-α, vinka-alkaloid, ricin-A-kjede, metotreksat eller radioaktivt isotophapten). Bispesifikke antistoffer kan bli fremstilt som fullengde antistoffer eller antistoff-fragmenter (for eksempel F(ab')₂-bispesifikke antistoffer).

WO 96/16673 beskriver et bispesifikt HER2/Fc γ RIII-antistoff og US patentskrift nr. 5 837 234 tilkjenner et bispesifikt HER2/ Fc γ RI-antistoff IDM1 (Osidem). Et bispesifikt HER2/Fc α -antistoff er vist i WO 98/02463. US patentskrift nr. 5 821 337 beskriver et bispesifikt HER2/CD3-antistoff. MDX-210 er en bispesifikk HER2-Fc γ RIII-Ab.

5 Fremgangsmåter for å fremstille bispesifikke antistoffer er kjent på fagområdet. Tradisjonell produksjon av fullengde bispesifikke antistoffer er basert på ko-ekspressjon av to immunglobulin tungkjede-lettkjede par der de to kjedene har ulik spesifisitet (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). På grunn av det tilfeldige utvalget av immunglobulin tungkjeder og lettkjeder produserer disse hybridomene (kvadromer) en potensiell blanding
10 av 10 ulike antistoffmolekyler, der kun ett har den korrekte bispesifikke strukturen. Rensing av det korrekte molekylet, som vanligvis blir utført ved affinitetskromatografitrinn, er heller arbeidskrevende og produktutbyttene er lave. Lignende prosedyrer er tilkjenngjort i WO 93/08829 og i Trauneker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Ifølge en annen tilnærming blir antistoffets variable domener med de ønskede
15 bindingsspesifisitetene (antistoff-antigenkombinerende seter) fusjonert til immunglobulin konstantdomene sekvenser. Fusjonen er fortrinnsvis med et immunglobulin tungkjede konstantdomene som omfatter i det minste en del av hengselregionene, CH2- og CH3-regionene. Det er foretrukket at den første tungkjede konstantregionen (CH1) inneholder setet som er nødvendig for lettkjede binding, tilstede i minst én av fusjonene. DNAer som
20 koder for immunglobulin tungkjede fusjonene og, hvis ønskelig, immunglobulin den lette kjeden, blir satt inn i separate ekspresjonsvektorer, og blir kotransfektet inn i en passende vertsorganisme. Dette gir stor fleksibilitet når det gjelder å justere de felles proporsjonene til de tre polypeptid-fragmentene i utførelsesformer der ulike forhold av de tre polypeptidkjedene som blir benyttet i konstruksjonen tilveiebringer de optimale utbyttene.
25 Det er imidlertid mulig å sette inn de kodende sekvensene for to eller alle tre polypeptidkjedene i en ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like forhold fører til høye utbytter, eller når forholdene ikke betyr noe spesielt.

I en foretrukket utførelsesform av denne tilnærmingen er de bispesifikke antistoffene sammensatt av en hybrid immunglobulin tungkjede med en første
30 bindingsspesifisitet på en arm og et hybrid immunglobulin tungkjede-lettkjede par (som tilveiebringer en annen bindingsspesifisitet) på den andre armen. Det har blitt funnet at denne asymmetriske strukturen fremmer separasjonen av den ønskede, bispesifikke forbindelsen fra uønskede immunglobulinkjede kombinasjoner, siden tilstedeværelsen av en immunglobulin lettkjede i kun halvparten av det bispesifikke molekylet tilveiebringer en
35 enkel måte for separasjon. Denne tilnærmingen er beskrevet i WO 94/04690. For ytterligere detaljer for generering av bispesifikke antistoffer, se for eksempel Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Ifølge en annen tilnærming som er beskrevet i US patentskrift nr. 5 731 168 kan grenseflaten mellom et par av antistoffmolekyler bli endret for å maksimere prosentandelen

av heterodimerer som blir gjenvunnet fra rekombinant cellekultur. Den foretrukne grenseflaten omfatter i det minste en del av C_H3-domenet fra et antistoff konstantdomene. I denne fremgangsmåten blir én eller flere små aminosyre-sidekjeder fra grenseflaten til det første antistoffmolekylet erstattet med større sidekjeder (f. eks. tyrosin eller tryptofan).

- 5 Kompensatoriske "hulrom" av identiske eller tilsvarende størrelse med de større sidekjedene blir dannet på grenseflaten til det andre antistoffmolekylet ved å erstatte store aminosyre sidekjeder med mindre (f. eks. alanin eller treonin). Dette gir en mekanisme for å øke utbyttet av heterodimeren i forhold til uønskede endeprodukter slik som homodimerer.

- Bispesifikke antistoffer inkluderer kryssbundne antistoffer eller «heterokonjugat» antistoffer. For eksempel kan ett av antistoffene i heterokonjugatet bli koblet til avidin, og 10 det andre til biotin. Slike antistoffer har for eksempel blitt foreslått å målstyre celler fra immunsystemet til uønskede celler (US patentskrift nr. 4 676 980) og for behandling av HIV-infeksjon (WO 91/00360, WO 92/200373 og EP 03089). Heterokonjugat antistoffer kan bli fremstilt ved å benytte enhver hensiktsmessig kryssbindingsfremgangsmåte.
- 15 Passende kryssbindingsmidler er velkjente på fagområdet og er tilkjennegjort i US patentskrift nr. 4 676 980 sammen med et antall kryssbindingsteknikker.

- Teknikker for å fremstille bispesifikke antistoffer fra antistoff-fragmenter er også blitt tilkjennegjort i litteraturen. Bispesifikke antistoffer kan for eksempel bli fremstilt ved å benytte kjemisk sammenbinding. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) beskriver en 20 prosedyre der intakte antistoffer blir proteolytisk spaltet for å fremstille F(ab')₂-fragmenter. Disse fragmentene blir redusert i nærvær av det ditiolkomplekserende middel natrium-arsenitt for å stabilisere nærliggende ditioler og forhindre intermolekylær disulfiddannelse. Fab'-fragmentene som blir generert blir deretter konvertert til tionitrobenzoat (TNB)-derivater. Ett av Fab'-TNB-derivatene blir deretter tilbake-konvertert til Fab'-tiolen ved
- 25 reduksjon med merkaptoetylamin og blir blandet med en ekvimolar mengde av det andre Fab'-TNB-derivatet for å danne det bispesifikke antistoffet. De bispesifikke antistoffene som blir fremstilt kan bli benyttet som midler for den selektive immobilisering av enzymer.

- Nyere fremskritt har fremmet den direkte gjenvinningen av Fab'-SH-fragmenter fra *E. coli*, som kan bli kjemisk koblet for å danne bispesifikke antistoffer. Shalaby et al., J. 30 Exp. Med., 175:217-225 (1992) beskriver fremstillingen av et fullt, humanisert, bispesifikt antistoff-F(ab')₂-molekyl. Hvert Fab'-fragment ble separat utskilt fra *E. coli* og utsatt for direkte kjemisk kobling *in vitro* for å danne det bispesifikke antistoffet. Det bispesifikke antistoffet som er dannet på denne måten var i stand til å binde celler som overuttrykker HER2-reseptoren og normale, humane T-celler, i tillegg til å utløse den lytiske aktiviteten til
- 35 humane, cytotoksiske lymfocytter mot humane brysttumor mål.

Forskjellige teknikker for å fremstille og isolere bispesifikke antistoff-fragmenter direkte fra rekombinant cellekultur har også blitt beskrevet. Bispesifikke antistoffer har for eksempel blitt produsert ved å benytte en leucinzipper. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Leucinzipper-peptidene fra Fos- og Jun-proteinene ble bundet til

Fab'-delene til to ulike antistoffer ved hjelp av genfusjon. Antistoff homodimerene ble redusert ved hengselregionen for å danne monomerer og deretter reoksidert for å danne antistoff heterodimerene. Denne fremgangsmåten kan også bli benyttet til fremstilling av antistoff homodimerer. "Diastoffteknologien" som er beskrevet av Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) har tilveiebrakt en alternativ mekanisme for å fremstille bispesifikke antistoff-fragmenter. Fragmentene omfatter et tungkjede variabelt domene (V_H) bundet til et lettkjede variabelt domene (V_L) med en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domenene på den samme kjeden. Dermed blir V_H - og V_L -domenene på et fragment tvunget til å pare med de komplementære V_L - og V_H -domenene på et annet fragment, for derved å danne to antigenbindende seter. En annen strategi for fremstilling av bispesifikke antistoff-fragmenter ved anvendelsen av enkeltkjede-Fv (sFv)-dimer er også blitt rapportert. Se Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Antistoffer med mer enn to valenser er påtenkt. For eksempel kan trispesifikke antistoffer bli fremstilt. Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991).

(vii) Andre aminosyresekvens modifiseringer

Aminosyresekvens modifiseringer på HER2-antistoffene som er beskrevet her er påtenkt. For eksempel kan det være ønskelig å forbedre bindingsaffiniteten og/eller andre biologiske egenskaper til antistoffet. Aminosyresekvens varianter av HER2-antistoffer blir fremstilt ved å introdusere passende nukleotidendringer inn i HER2-antistoffets nukleinsyre eller ved peptidsyntese. Slike modifiseringer inkluderer for eksempel delesjon fra og/eller insersjoner og/eller substitusjoner av rester i aminosyresekvensene til HER2-antistoffet. Enhver kombinasjon av delesjon, insersjon og substitusjon blir gjort for å komme fram til den endelige konstruksjonen, gitt at den endelige konstruksjonen innehar de ønskede karakteristika. Aminosyreendringer kan også endre post-translasjonelle prosesser for HER2-antistoffet, slik som å endre antallet av eller posisjonen til glykosyleringssetet.

En nyttig fremgangsmåte for å identifisere visse rester eller regioner i HER2-antistoffet som er foretrukne lokaliseringer for mutagenese blir kalt "alanin scanning-mutagenese" som beskrevet av Cunningham og Wells, Science, 244:1081-1085 (1989). Her blir en rest eller en gruppe av målrester identifisert (f. eks. ladede rester slik som arg, asp, his, lys og glu) og erstattet med nøytrale eller negativt ladede aminosyrer (mest foretrukket alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonen av aminosyrene med HER2-antigen. De aminosyrelokaliseringene som viser funksjonell sensitivitet for substitusjonene blir deretter raffinert ved å introdusere ytterligere andre varianter på, eller istedenfor, setene for substitusjon. Mens setet for introduksjon av en aminosyresekvens variasjon er forhåndsbestemt, behøver ikke egenskapene til mutasjonen *per se* å være forhåndsbestemt. For å analysere utøvelsen for en mutasjon på et gitt sete, blir for eksempel ala-scanning eller tilfeldig mutagenese utført på målkodonet eller regionen og de uttrykte HER2-antistoff variantene blir screenet for den ønskede aktiviteten.

Aminosyresekvens insersjoner inkluderer amino- og/eller karboksyterminale fusjoner som strekker seg i lengde fra én rest til polypeptider som inneholder 100 eller flere rester, i tillegg til intrasekvens insersjoner av enkle aminosyrerester eller flere aminosyrerester. Eksempler på terminale insersjoner inkluderer et HER2-antistoff med en N-terminal metionylrest eller antistoffet fusjonert til et cytotoxisk polypeptid. Andre insersjons-
 5 varianter av HER2-antistoff molekylet inkluderer fusjonen til N- eller C-terminalen på HER2-antistoffet til et enzym (f. eks. for ADEPT) eller et polypeptid som øker halveringstiden i serum for antistoffet.

En annen type av variant er en aminosyresubstitusjon variant. Disse variantene
 10 har fått minst én aminosyrerest i HER2-antistoffmolekylet erstattet med en annen rest. Setene med størst interesse for substitusjonsmutagenese inkluderer hypervariable regioner eller CDRe, men FR- eller Fc-regionendringer er også påtenkt. Konservative substitusjoner er vist i Tabell 1 under overskriften "foretrukne substitusjoner". Hvis slike substitusjoner fører til en endring i biologisk aktivitet, så kan mer omfattende endringer, betegnet "eksempelsubstitusjoner" i Tabell 1, eller som er ytterligere beskrevet nedenfor
 15 med referanse til aminosyreklasser, bli introdusert og produktene screenet.

Tabell 1

Opprinnelig rest	Eksempelsubstitusjoner	Foretrukne substitusjoner
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, norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin, 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, norleucin	Leu

Vesentlige modifiseringer i de biologiske egenskapene til antistoffet blir utført ved å velge substitusjoner som er vesentlig forskjellig i deres effekt på å opprettholde (a) strukturen til polypeptidets rygggrad i området med substitusjon, for eksempel som en flate eller en heliks konformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten til molekylet på målstedet eller (c) omfanget av sidekjeden. Aminosyrer kan bli gruppert i overensstemmelse med likheter i deres egenskaper i sidekjedene deres (i A.L. Lehninger, i Biochemistry, andre utg., s. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) ikke-polare: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) uladete polare: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) sure: Asp (D), glu (E)

(4) basiske: Lys (K), Arg (R), His (H).

Alternativt kan naturlig forekommende rester bli delt i grupper basert på felles sidekjede egenskaper:

(1) hydrofobe: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

(2) nøytrale hydrofile: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,

(3) sure: Asp, Glu,

(4) basiske: His, Lys, Arg,

(5) rester som påvirker kjedeorientering: Gly, Pro,

(6) aromatiske: Trp, Tyr, Phe.

Ikke-konservative substitusjoner vil medføre å bytte ett medlem av disse klassene ut med en annen klasse.

Enhver cysteinrest som ikke er involvert i å opprettholde den riktige konformasjonen for HER2-antistoffet, kan også bli substituert, vanligvis med serin, for å forbedre den oksidative stabiliteten til molekylet og forhindre feilaktig kryssbinding. Omvendt kan cysteinbinding(er) bli innført i antistoffet for å forbedre dets stabilitet (spesielt der antistoffet har et antistoff-fragment slik som et Fv-fragment).

En spesielt foretrukket type av substitusjonsvariant involverer å substituere én eller flere hypervariabel region-rester i et opphavsantistoff (f. eks. et humanisert eller humant antistoff). Vanligvis vil de(n) resulterende varianten(e) som er valgt for ytterligere utvikling ha forbedrede biologiske egenskaper i forhold til opphavsantistoffet fra hvilket de er fremstilt. En hensiktsmessig måte å generere slike substitusjonsvarianter involverer affinitetsmodning ved å benytte fagvisning. Kort fortalt blir flere hypervariable regionseter (f. eks. 6-7 seter) mutert for å generere alle mulige aminosyre substitusjoner på dette setet. Antistoffvariantene som blir generert på denne måten blir fremvist på en monovalent

måte på filamentøse fagpartikler som fusjoner til gen-III-produktet av M13 pakket inn i hver partikkel. De fagviste variantene ble deretter screenet for deres biologiske aktivitet (f. eks. bindingsaffinitet) som tilkjennegjort her. For å identifisere kandidat hypervariable regions seter for modifisering kan alanin-scanning mutagenese bli utført for å identifisere hypervariable regionrester som bidrar vesentlig til antigenbinding. Alternativt, eller i tillegg, så kan det være fordelaktig å analysere en krystallstruktur av antigen-antistoff komplekset for å identifisere kontaktpunkter mellom antistoffet og human HER2. Slike kontaktrester og tilliggende rester er kandidater for substitusjon i overensstemmelse med teknikkene som er beskrevet her. Når slike varianter er fremstilt, blir panelet av varianter underkastet screening som beskrevet her og antistoffer med overlegne egenskaper i én eller flere relevante analyser kan bli valgt til ytterligere utvikling.

En annen type aminosyrevariant av antistoffet endrer det opprinnelige glykosyleringsmønsteret til antistoffet. Med endring er det ment å fjerne én eller flere karbohydratenheter som er funnet på antistoffet og/eller å innføre et eller flere glykosylerings seter som ikke foreligger på antistoffet.

Glykosylering av antistoffer er typisk enten N-bundne eller O-bundne. N-bundet referert til koblingen av karbohydratenheten på sidekjeden av en asparaginrest. Tripeptidsekvensen asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, der X er en hvilken som helst aminosyre bortsett fra prolin, er gjenkjenningsssekvensene for enzymatisk festing av karbohydratenheten på asparagin sidekjeden. Tilstedeværelsen av en hvilken som helst av disse tripeptidsekvensene i polypeptidet danner på det vis et potensielt glykosyleringssete. O-bundet glykosylering refererer til festingen av én av sukkertypene N-acetylgalaktosamin, galaktose eller xylose på en hydroksyaminosyre, vanligst serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan bli benyttet.

Tilføyelse av glykosylerings seter på antistoffet blir hensiktsmessig oppnådd ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder én eller flere av de ovenfor beskrevne tripeptidsekvensene (for N-bundne glykosylerings seter). Endringen kan også bli gjort ved tilføyelse av, eller substitusjon av, én eller flere serin- eller treoninrester på sekvensen til det opprinnelige antistoffet (for O-bundne glykosylerings seter).

Der antistoffet omfatter en Fc-region, kan en hvilken som helst oligosakkaridstruktur bundet til denne bli endret. For eksempel er antistoffer med en moden karbohydratstruktur som mangler fukose bundet til en Fc-region på antistoffet beskrevet i US patentsøknad nr. US 2003/0157108 A1, Presta, L. Se også US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Antistoffer med et todelt N-acetylglukosamin (GlcNAc) i oligosakkaridstrukturen bundet til en Fc-region på antistoffet er referert til i WO 03/011878, Jean-Mairet et al., og US patentskrift nr. 6 602 684, Umana et al.. Antistoffer med minst én galaktoserest på en oligosakkaridstruktur bundet til en Fc-region på antistoffet er rapportert i WO 97/30087, Patel et al.. Se også WO 98/58964 (Raju, W) og WO 99/22764 (Raju, S.) som vedrører antistoffer med endret karbohydrat bundet til Fc-regionen derav. Antistoff

sammensetninger som omfatter hovedtype antistoff med slik karbohydratstruktur bundet til én eller to tungkjeder på Fc-regionen, er påtenkt her.

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvens varianter av HER2-antistoffet blir fremstilt ved hjelp av en mengde fremgangsmåter som er kjent på fagområdet. Disse fremgangsmåtene inkluderer isolering fra en naturlig kilde (i tilfellet en naturlig forekommende aminosyresekvens variant) eller fremstilling ved hjelp av oligonukleotid-mediert (eller seterettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassett-mutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variant versjon av HER2-antistoffet.

(viii) Screening for antistoffet med de ønskede egenskaper

Teknikker for å fremstille antistoffer har blitt beskrevet ovenfor. Man kan ytterligere velge antistoffer med visse biologiske karakteristika, der det er ønskelig.

For å identifisere et antistoff som blokkerer ligandaktivering av en HER-reseptor, kan antistoffets evne til å blokkere HER-ligandbinding til celler som uttrykker HER-reseptoren (f. eks. i konjugering med en annen HER-reseptor som HER-reseptoren av interesse danner en HER-hetero-oligomer) bli bestemt. Celler som naturlig uttrykker, eller som er transfektert slik at de uttrykker HER-reseptorer i HER-hetero-oligomeren kan bli inkubert med antistoffet og deretter eksponert ovenfor merket HER-ligand. Evnen for HER2-antistoffet til å blokkere ligandbindingen til HER-reseptoren i HER-hetero-oligomeren kan deretter bli evaluert.

For eksempel kan inhibering av HRG-binding til MCF7-brysttumor cellelinjer ved HER2-antistoffer bli utført ved å benytte monolags-MCF7-kulturer på is i et 24-brønners plateformat hovedsakelig som beskrevet i WO 01/00245. Monoklonale HER2-antistoffer kan bli tilsatt til hver brønn og inkubert i 30 minutter. ^{125}I -merket rHRG $\beta_{177-244}$ (25 pm) kan bli tilsatt og inkuberingen kan bli fortsatt i 4 til 16 timer. Doserresponskurver kan bli fremstilt og en IC_{50} -verdi kan bli beregnet for antistoffet av interesse. I én utførelsesform vil antistoffet som blokkerer ligandaktivering for en HER-reseptor ha en IC_{50} -verdi for inhibering av HRG-binding til MCF7-celler i denne analysen på omtrent 50 nM eller mindre, mer foretrukket 10 nM eller mindre. Der antistoffet er et antistoff-fragment slik som et Fab-fragment, kan IC_{50} -verdien for inhibering av HRG-binding til MCF7-celler i denne analysen for eksempel være 100 nM eller mindre, mer foretrukket 50 nM eller mindre.

Alternativt, eller i tillegg, så kan evnen til HER2-antistoffet til å blokkere HER-ligandstimulert tyrosinfosorylering av en HER-reseptor som er tilstede på en HER-hetero-oligomer bli undersøkt. For eksempel kan celler som endogent uttrykker HER-reseptorene eller som er transfektert slik at de uttrykker dem bli inkubert med antistoffet og deretter analysert for HER-ligandavhengig tyrosinfosoryleringsaktivitet ved å benytte et monoklonale anti-fosfotyrosinantistoff (som eventuelt er konjugert med et påvisbart merke). Kinasereseptor aktiveringsanalysen som er beskrevet i US patentskrift nr.

5 766 863 er også tilgjengelig for å bestemme HER-reseptoraktivering og blokkering av denne aktiviteten ved hjelp av et antistoff.

Man kan screene for et antistoff som inhiberer HRG-stimulering av p180-tyrosin-fosforylering i MCF7-celler hovedsakelig som beskrevet i WO 01/00245. MCF7-cellene kan
 5 for eksempel bli platet ut i 24-brønners plater og monoklonale antistoffer mot HER2 kan bli tilsatt til hver brønn og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur, deretter kan rHRG β ₁₁₇₇₋₂₄₄ bli tilsatt til hver brønn til en sluttkonsentrasjon på 0,2 nM, og inkubering kan bli fortsatt i 8 minutter. Media kan bli aspirert fra hver brønn og reaksjoner kan bli stoppet ved tilsetningen av 100:1 med SDS-prøvebuffer (5 % SDS, 25 mM DTT og 25 mM Tris-HCl, pH
 10 6,8). Hver prøve (25 μ l) kan bli elektroforesekjørt på en 4-2 % gradientgel (Novex) og deretter elektroforetisk overført til polyvinylidendifluoridmembran. Antifosfotyrosin (ved 1 μ g/ml)-immunblott kan bli utviklet og intensiteten til det dominerende, reaktive båndet ved M_r -180 000 kan bli kvantifisert ved hjelp av reflektans densitometri. Antistoffet som er valgt vil fortrinnsvis signifikant inhibere HRG-stimulering av p180-tyrosinfosforylering til
 15 omtrent 0-35 % av kontrollen i denne analysen. En doseresponskurve for inhibering av HRG-stimulering på p180-tyrosinfosforylering som bestemt ved hjelp av reflektans densitometri kan bli fremstilt og en IC_{50} -verdi for antistoffet av interesse kan bli beregnet. Eventuelt vil antistoffet som blokkerer ligandaktivering av en HER-reseptor ha en IC_{50} -verdi for inhibering av HRG-stimulering av p180-tyrosinfosforylering i denne analysen på omtrent
 20 50 nM eller mindre, mer foretrukket 10 nM eller mindre. Der antistoffet er et antistoff-fragment, slik som et Fab-fragment, så kan IC_{50} -verdien for inhibering av HRG-stimulering av p180-tyrosinfosforylering i denne analysen for eksempel være omtrent 100 nM eller mindre, mer foretrukket 50 nM eller mindre.

Man kan også undersøke den vekstinhibitoriske effekten til antistoffet på MDA-MB-
 25 175-celler, f. eks. hovedsakelig som beskrevet i Schaefer et al., Oncogene, 15:1385-1394 (1997). Ifølge denne analysen kan MDA-MB-175-celler bli behandlet med et monoklonalt HER2-antistoff (10 μ g/ml) i 4 dager og farget med krystallfiolett. Inkubering med HER2-antistoff kan vise en vekstinhibitorisk effekt på denne cellelinjen tilsvarende til den som vises av monoklonalt antistoff 2C4. Eksogent HRG vil ikke signifikant reversere denne
 30 inhiberingen. Fortrinnsvis vil antistoffet være i stand til å inhibere celleproliferasjon av MDA-MB-175-celler i større grad enn monoklonale antistoff 4D5 (og eventuelt i større grad enn monoklonalt antistoff 7F3), både i nærvær og fravær av eksogent HRG.

HER2-antistoffet av interesse kan blokkere heregulinavhengig assosiering av HER2 med HERr3 i både MCF7- og SK-BR-3-celler som bestemt i et ko-immunpresipiterings-
 35 eksperiment, slik som det som er beskrevet i WO 01/00245 vesentlig mer effektivt enn monoklonalt antistoff 4D5, og fortrinnsvis vesentlig mer effektivt enn monoklonalt antistoff 7F3.

For å identifisere vekstinhibitorisk HER2-antistoffer kan man screene for antistoffer som inhiberer veksten til kreftceller som overuttrykker HER2. Eventuelt er det vekst-

inhibitoriske antistoffet som er valgt i stand til å inhibere vekst av SK-BR-3-celler i cellekultur med omtrent 20-100 % og fortrinnsvis med omtrent 50-100 % ved en antistoffkonsentrasjon på omtrent 0,5 til 30 µg/ml. For å identifisere slike antistoffer kan SK-BR-3-analysen som er beskrevet i US patentskrift nr. 5 677 171 bli utført. Ifølge denne analysen blir SK-BR-3-celler dyrket i en 1:1-blanding av F12- og DMEM-medium tilsatt 10 % føtalt, bovin serum, glutamin og penicillinstreptomycin. SK-BR-3-celler ble platet ut ved 20 000 celler i en cellekulturskål på 35 mm (2 ml-er/36 mm skål). 0,5 til 30 µg/ml med HER2-antistoffet blir tilsatt per skål. Etter seks dager blir antallet celler, sammenlignet med ubehandlede celler, talt ved å benytte en elektronisk COULTER-celleteller. De antistoffene som inhiberer vekst av SK-BR-3-celler med omtrent 20-100 % til omtrent 50-100 % kan bli valgt som vekstinhibitoriske antistoffer. Se US patentskrift nr. 5 677 171 for analyser for screening for vekstinhibitoriske antistoffer, slik som 4D5 og 3E8.

For å kunne velge antistoffer som induserer apoptose, er en anneksinbindingsanalyse som benytter BT474-celler tilgjengelig. BT474-cellene blir dyrket og sådd ut i skåler som diskutert i avsnittet ovenfor. Mediet blir deretter fjernet og erstattet med friskt medium alene eller medium inneholdende 10 µg/ml av det monoklonale antistoffet. Etter en tre dagers inkuberingsperiode blir monolag vasket med PBS og løsnet ved trypsinering. Celler blir deretter sentrifugert, resuspendert i Ca²⁺-bindingsbuffer og aliquotert i rør som diskutert ovenfor for celledødsanalysen. Rør mottar deretter merket anneksin (f. eks. anneksin-V-FITC) (1 µg/ml). Prøver kan bli analysert ved å benytte et FACSCAN-flowcytometer og FACSCONVERT-CellQuest-programvare (Becton Dickinson). De antistoffene som induserer statistisk signifikante nivåer med anneksinbinding i forhold til kontroll blir valgt som apoptoseinduserende antistoffer. I tillegg til anneksinbindingsanalysen er en DNA-fargingsanalyse som benytter BT474-celler tilgjengelig. For å utføre denne analysen, blir BT474-celler som har blitt behandlet med antistoffet av interesse, som beskrevet i de foregående to avsnittene, inkubert med 9 µg/ml HOECHST 33342 i 2 timer ved 37 °C, og deretter analysert på EPIC ELITE-flowcytometer (Coulter Corporation) ved å benytte MODFIT LT-programvare (Verity Software House). Antistoffer som induserer en endring i prosentandelen av apoptotiske celler som er to ganger større (og fortrinnsvis 3 ganger større) enn ubehandlede celler (opp til 100 % apoptotiske celler) kan bli valgt som pro-apoptotiske antistoffer ved å benytte denne analysen. Se WO 98/17797 for analyser for å screene antistoffer som induserer apoptose, slik som 7C2 og 7F3.

For å screene etter antistoffer som binder en epitop på HER2 som er bundet av et antistoff av interesse, kan en rutinemessig kryssblokkeringsanalyse slik som den som er beskrevet i Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow og David Lane (1988) bli utført for å undersøke hvorvidt antistoffet kryssblokkerer binding av et antistoff, slik som 2C4 eller pertuzumab, til HER2. Alternativt, eller i tillegg, så kan epitopkartlegging bli utført ved hjelp av fremgangsmåtene kjent på fagområdet og/eller

man kan undersøke antistoff-HER2-strukturen (Franklin et al., Cancer Cell, 5:317-328 (2004)) for å se hvilke domener i HER2 som er bundet av antistoffet.

(ix) *Immunkonjugater*

Immunkonjugater omfatter et antistoff konjugert til et cytotoksisk middel slik som et kjemoterapeutisk middel, toksin (f. eks. et småmolekyl toksin eller et enzymatisk aktivt toksin av bakterie-, sopp-, plante- eller dyreopprindelse, inkludert fragmenter og/eller varianter derav) eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat).

Kjemoterapeutiske midler som er nyttig i fremstilling av slike immunkonjugater har blitt beskrevet ovenfor. Konjugater av et antistoff og et eller flere småmolekyl toksiner, slik som et calicheamicin, et maytansin (US patentskrift nr. 5 208 020), et trikoten og CC1065 er også påtenkt her.

Et antistoff kan være konjugert til ett eller flere maytansinmolekyler (f. eks. fra omtrent 1 til omtrent 10 maytansinmolekyler per antistoffmolekyl). Maytansin kan for eksempel bli konvertert til May-SS-Me som kan bli redusert til May-SH3 og reagert med modifisert antistoff (Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)) for å generere et maytansinoid-antistoff immunkonjugat.

Et annet immunkonjugat av interesse omfatter et HER2-antistof konjugert til ett eller flere calicheamicinmolekyler. Calicheamicinfamilien av antibiotika er i stand til å frembringe dobbelttrådede DNA-brudd ved subpikomolare konsentrasjoner. Strukturelle analoger av calicheamicin som kan bli benyttet inkluderer γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG og θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research, 53:3336-3342 (1993) og Lode et al., Cancer Research, 58:2925-2928 (1998)). Se også US patentskrift nr. 5 714 586, 5 712 374, 5 264 586 og 5 773 001.

Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan bli benyttet inkluderer difteri-A-kjede, ikke-bindende, aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin-A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin-A-kjede, abrin-A-kjede, modeccin-A-kjede, alfa-sarcin, *Aleurites fordii*-proteiner, diantinproteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitorer, kursin, krotin, sapaonaria officinalis-inhibitor, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin og trikotecener. Se for eksempel WO 93/21232, publisert 28. oktober, 1993.

Et immunkonjugat kan være dannet mellom et antistoff og en forbindelse med nukleolytisk aktivitet (f. eks. en ribonuklease eller en DNA-endonuklease slik som en deoksyribonuklease, DNase).

En rekke radioaktive isotoper er tilgjengelige for fremstilling av radiokonjugerte HER2-antistoffer. Eksempler inkluderer At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , e^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} og radioaktive isotoper av Lu.

Konjugater av antistoffet og det cytotoksiske middelet kan bli fremstilt ved å benytte en rekke bifunksjonelle proteinkoblingsmidler slik som N-suksinimidyl-3-(2-pyridyl-

ditiol)propionat (SPDP), suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat, iminotiolat (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiipimidat-HCl), aktive estere (slik som disuksinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azidoforbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som tolyen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Et ricinimmuntoksin kan for eksempel bli fremstilt som beskrevet i Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). Karbon-14-merket 1-isotiocyanatbenzyl-3-metyldietylentriaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelaterende middel til konjugering av radionuklid til antistoffet. Se WP 94/11026. Linkeren kan være en "spaltbar linker" som letter frigjøringen av det cytotoxiske legemiddelet i cellen. For eksempel kan en syrelabil linker, peptidasesensitiv linker, dimetyl linker eller disulfidholdig linker (Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)) bli benyttet.

Alternativt kan et fusjonsprotein som omfatter HER2-antistoffet og cytotoxiske middel bli fremstilt, f. eks. ved hjelp av rekombinante teknikker eller peptidsyntese.

Et antistoff kan bli konjugert til en "reseptor" (slik som streptavidin) for anvendelse i tumorforhåndsmåling der antistoff-reseptorkonjugatet blir administrert til pasienten, etterfulgt av fjerning av ubundet konjugat fra sirkulasjonen ved å benytte et klaringsmiddel og deretter administrering av en "ligand" (f. eks. avidin) som er konjugert til et cytotoxiske middel (f. eks. et radionukleotid).

(x) Andre antistoffmodifiseringer

Andre modifiseringer av antistoffet er påpekt her. Antistoffet kan for eksempel være bundet til én av en rekke ikke-proteinholdige polymerer, f. eks. polyetylglykol, polypropylenglykol, polyoksyalkylen eller kopolymerer av polyetylglykol og polypropylenglykol. Antistoffet kan også være innkapslet i mikrokapsler som for eksempel er fremstilt ved hjelp av koacerveringsteknikker eller ved grenseflate polymerisering (for eksempel henholdsvis hydroksymetylcellulose eller gelatinmikrokapsler og poly-(metylmetacrylat)-mikrokapsler) i kolloidale legemiddelleveringssystemer (for eksempel liposomer, albuminmikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er tilkjennegjort i Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. utg., Osol, A., red., (1980).

Det kan være ønskelig å modifisere antistoffet ifølge oppfinnelsen med hensyn på effektorfunksjon, f. eks. for å forsterke antigenavhengig, cellemediert cytotoxisitet (ADCC) og/eller komplementavhengig cytotoxisitet (CDC) til antistoffet. Dette kan bli oppnådd ved å introdusere én eller flere aminosyresubstitusjoner i en Fc-region av antistoffet. Alternativt, eller i tillegg, så kan cysteinrest(er) bli introdusert i Fc-regionen for derved å tillate dannelse av interkjededisulfidbinding i denne regionen. Det homodimere antistoffet som blir fremstilt på den måten kan ha forbedret internaliseringsevne og/eller økt

komplementmediert celledreping og antistoffavhengig cellulær cytotoksitet (ADCC). Se Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) og Shopes, B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Homodimere antistoffer med forbedret anti-tumoraktivitet kan også bli fremstilt ved å benytte heterobifunksjonelle kryssbindere som beskrevet i Wolff et al.,
 5 Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Alternativt kan et antistoff bli endret slik at det har to Fc-regioner og kan derved ha forbedret komplementlysis og ADCC-evner. Se Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) beskriver antistoffer med forbedret ADCC-funksjon i nærvær av humane effektorceller der antistoffene omfatter aminosyresubstitusjoner i Fc-regionen derav. Fortrinnsvis omfatter antistoffet med forbedret ADCC substitusjon på
 10 posisjonene 298, 333 og 334 i Fc-regionen. Fortrinnsvis er den endrede Fc-region en human IgG1-Fc-region som omfatter eller som består av substitusjoner på én, to eller tre av disse posisjonene.

Antistoffer med endret C1q-binding og/eller komplementavhengig cytotoksitet (CDC) er beskrevet i WO 99/51642, US patentskrift nr. 6 194 551 B1, US patentskrift nr. 6 242 195 B1, US patentskrift nr. 6 528 624 B1 og US patentskrift nr. 6 538 124 (Idusogie et al.). Antistoffene omfatter en aminosyresubstitusjon på én eller flere av aminosyre-
 15 posisjonene 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 og/eller 334 i Fc-regionen derav.

For å øke halveringstiden for antistoffet i serum, kan man inkorporere en redningsreseptorbindingsepitop i antistoffet (spesielt et antistoff-fragment) som beskrevet for eksempel i US patentskrift nr. 5 739 277. Som benyttet her, refererer uttrykket "redningsreseptorbindingsepitop" til en epitop på Fc-regionen i et IgG-molekyl (f. eks. IgG₁, IgG₂, IgG₃ eller IgG₄) som er ansvarlig for å øke halveringstiden for IgG-molekylet i serum *in vivo*. Antistoffer med substitusjoner på en Fc-region derav og økt halveringstid i serum
 25 er også beskrevet i WO 00/42072 (Presta, L.).

Konstruerte antistoffer med tre eller flere (fortrinnsvis fire) funksjonelle antigen-bindende seter er også påtenkt (US søknadsnr. US 2002/0004587 A1, Miller et al.).

HER2-antistoffene som er tilkjennegjort her kan også bli formulert som immunliposomer. Liposomer som inneholder antistoffet blir fremstilt ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent på fagområdet, slik som beskrevet i Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985), Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980), US patentskrift nr. 4 485 045 og 4 544 545 og WO 97/38731, publisert 23. oktober 1997. Liposomer med forbedret sirkulasjonstid er tilkjennegjort i US patentskrift nr. 5 013 556.
 30

Spesielt nyttige liposomer kan bli fremstilt ved hjelp av reversfase evaporeringsfremgangsmåten med en lipid sammensetning som omfatter fosfatidylcholin, kolesterol og PEG-derivatisert fosfatidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer blir tvunget gjennom filtre med definert porestørrelse for å gi liposomer med den ønskede diameteren. Fab'-fragmenter av antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelsen kan bli konjugert til liposomene som beskrevet i Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) via en disulfidutvekslingsreaksjon. Et
 35

kjemoterapeutisk middel er eventuelt inneholdt i liposomet. Se Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81 (19)1484 (1989).

IV. Farmasøytiske formuleringer

Terapeutiske formuleringer av sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse blir fremstilt for lagring ved å blande sammensetningen med eventuelt farmasøytisk akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. utgave, Osol, A., red. (1980)) i form av lyofiliserte formuleringer eller vandige løsninger.

Akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottagerne ved doseringene og konsentrasjonene som ble benyttet, og inkluderer buffere slik som fosfat, citrat og andre organiske syrer, antioksidanter inkludert askorbinsyre og metionin, konserveringsmidler (slik som oktadecyldimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, fenol, butyl- eller benzylalkohol, alkylparabener slik som metyl- eller propylparaben, katekol, resorcinol, sykloheksanol, 3-pentanol og m-kresol), lav molekylærvækt (mindre enn omtrent 10 rester) polypeptider, proteiner slik som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, aminosyrer slik som glysin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater inkludert glukose, mannose eller dekstriner, chelaterende midler slik som EDTA, sukkertyper slik som sukkrose, mannitol, trehalose eller sorbitol, saltdannende motioner slik som natrium, metallkomplekser (f. eks. Zn-proteinkomplekser) og/eller ikke-ioniske overflateaktive stoffer slik som TWEEN, PLURONICS eller polyetylglykol (PEG). Lyofiliserte HER2-antistoff-formuleringer er beskrevet i WO 97/04801.

Formuleringen her kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse som nødvendig for den spesielle indikasjon som blir behandlet, fortrinnsvis de med komplementære aktiviteter og ikke skadelig påvirker hverandre. Det kan for eksempel være ønskelig å ytterligere tilveiebringe antistoffer som binder til EGFR, HER2 (f. eks. et antistoff som binder en annen epitop på HER2), HER3, HER4 eller vaskulærendotelvektsfaktor (VEGF) i en formulering. Alternativt, eller i tillegg, så kan sammensetningen ytterligere omfatte et kjemoterapeutisk middel, cytotoxisk middel, cytokin, veksthemmerisk middel, anti-hormonmiddel, EGFR-måltrettet legemiddel, anti-angiogen middel, tyrosinkinasehemmer og/eller kardioprotector. Slike molekyler er passende tilstede i kombinasjon i mengder som er effektive for formålet som er påtenkt.

De aktive ingrediensene kan også være innkapslet i mikrokapsler som for eksempel er fremstilt ved hjelp av koacerveringsteknikker eller ved hjelp av grenseflatepolymerisering, for eksempel hydroksymetylcellulose eller gelatin-mikrokapsler og poly(metylmecylat) mikrokapsler, i kolloidale legemiddelleveringssystemer (for eksempel liposomer, albuminmikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i

makroemulsjoner. Slike teknikker er tilkjennegjort i Remington's Pharamceutical Sciences, 16. utgave, Osol, A. red, (1980).

Preparater med vedvarende frigjøring kan bli fremstilt. Passende eksempler på preparater i vedvarende frigjøring inkluderer halvgjennomtrengelige matriser av faste, hydrofobe polymerer inneholdende antistoffet, der matrisene foreligger i form av formgitte artikler, f. eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matriser med vedvarende frigjøring inkluderer polyestere, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US patentskrift nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og (etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylenvinylacetat, nedbrytbare melkesyre-glykolsyre kopolymerer slik som LUPRON DEPOT (injiserbare mikrokuler sammensatt av melkesyre-glykolsyrekopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre.

Formuleringene som skal bli benyttet til *in vivo*-administrering må være sterile. Dette er enkelt oppnådd ved hjelp av filtrering gjennom sterilfiltreringsmembraner.

V. Screening av pasienter for terapi

En pasient valgt til terapi har en tumor, eller annen celle eller vev, som viser HER (og fortrinnsvis HER2)-aktivering. Omfanget av HER- (eller HER2)-aktivering i kreftceller eller andre testede celler overskrider signifikant nivået av aktivering for denne reseptoren i ikke-krafttrammede eller normale celler av samme vevstype. Slik overdreven aktivering kan skyldes overekspresjon av HER-reseptoren og/eller høyere enn normale nivåer av en HER-ligand tilgjengelig for å aktivere HER-reseptoren i kreftcellene. Slik overdreven aktivering kan forårsake og/eller være forårsaket av den maligne tilstand til en kreftcelle. Eventuelt vil kreften være utsatt for en diagnostisk eller prognostisk analyse for å bestemme hvorvidt amplifisering og/eller overekspresjon av en HER-reseptor forekommer som fører til slik overdreven aktivering av HER-reseptoren. Alternativt, eller i tillegg, så kan kreften bli utsatt for en diagnostisk eller prognostisk analyse for å bestemme hvorvidt amplifisering og/eller overekspresjon av en HER-ligand forekommer i kreften som bidrar til overdreven aktivering av reseptoren. I en undergruppe av slike kreftformer kan overdreven aktivering av reseptoren være et resultat av en autokrin, stimulatorisk vei. Forskjellige eksempel-

(i) HER-dimerer

Prøver kan bli undersøkt for tilstedeværelsen av HER-dimerer, som indikerer HER- eller HER2-aktivering. EN hvilken som helst kjent fremgangsmåte på fagområdet kan bli benyttet for å påvise HER2-dimerer, slik som EGFR-HER2, HER2-HER3. Flere foretrukne fremgangsmåter er beskrevet nedenfor. Disse fremgangsmåtene påviser ikke-kovalente protein-protein interaksjoner eller indikerer på annen måte nærhet mellom proteiner av interesse.

Immunaffinitetsbaserte fremgangsmåter, slik som immunpresipitering eller ELISA, kan bli benyttet til å påvise HER-dimerer. I én utførelsesform blir HER2-antistoffer benyttet for å immunpresipitere komplekser som omfatter HER2 fra tumorceller, og den resulterende immunpresipitanten blir deretter probet for tilstedeværelsen av EGFR eller HER3 ved hjelp av immunblotting. I en annen utførelsesform kan EGFR- eller HER3-antistoffer bli benyttet til immunpresipiteringstrinnet og immunpresipitanten kan deretter bli probet med HER2-antistoffer. I en ytterligere utførelsesform kan HER-ligander som er spesifikke for EGFR, HER3, EGFR-HER2-komplekser eller HER2-HER3-komplekser bli benyttet for å presipitere komplekser, som deretter blir probet for tilstedeværelsen av HER2. Ligander kan for eksempel være konjugert til avidin og komplekser kan være renses på en biotinkolonne.

I andre utførelsesformer, slik som i ELISA eller i "sandwich-type» antistoffanalyser blir antistoffer mot HER2 immobilisert på en fast bærer, kontaktet med tumor-celler eller tumorcellelysat, vasket og deretter eksponert for antistoffet mot EGFR eller HER3. Binding av det siste antistoffet, som kan bli påvist direkte eller ved hjelp av et sekundært antistoff konjugert til et påvisbart merke, indikerte tilstedeværelsen av hetero-dimerer. I visse utførelsesformer er EGFR- eller HER3-antistoffer immobilisert og HER2-antistoff ble benyttet i påvisningstrinnet. I andre utførelsesformer kan HER-ligander bli benyttet istedenfor eller i kombinasjon med, HER-antistoffer.

Kjemisk- eller UV-kryssbinding kan så bli benyttet for kovalent å binde sammen dimerer på overflaten av levende celler. Hunter et al., Biochem. J., 320:847-53. Eksempler på kjemiske kryssbindere inkluderer ditiobis(suksinimidyl)propionat (DSP) og 3,3'-ditiobis-(sulfosuksinimidyl)propionat (DTSSP). I én utførelsesform blir celleekstraktet fra kjemisk kryssbundne tumorceller analysert ved hjelp av SDS-PAGE og immunblottet med antistoffer mot EGFR og/eller HER3. Et superskiftet bånd med den passende molekylvekten representerer mest sannsynlig EGFR-HER2- eller HER2-HER3-dimerer, siden HER2 er den foretrukne dimeriseringspartneren for EGFR og HER3. Dette resultatet kan bli bekreftet ved påfølgende immunblotting med HER2-antistoffer.

Fluorescensresonans energioverføring (FRET) kan også bli benyttet for å påvise EGFR-HER2- eller HER-HER3-dimerer. FRET påviser proteinkonformasjonsdringer og protein-protein-interaksjoner *in vivo* og *in vitro* basert på overføringen av energi fra en donorfluorofor til en akseptorfluorofor. Selvin, Nat. Struct. Biol., 7:730-34 (2000). Energi-overføring finner sted kun hvis donorfluoroforen er i tilstrekkelig nærhet til akseptorfluoroforen. I et typisk FRET-eksperiment blir to proteiner eller to seter på et enkelt protein merket med ulike fluorescerende prober. En av probene, donorproben, blir eksitert til en høyere energitilstand med innkommende lys med en spesifisert bølgelengde. Donorproben sender dermed ut sin energi til den andre proben, akseptorproben, noe som fører til en reduksjon i donorens fluorescensintensitet og en økning i akseptorens fluorescensemisjon. For å måle omfanget av energioverføring, blir donorens intensitet i en prøve som er merket med donor- og akseptorprober sammenlignet med dens intensitet i en prøve som er merket

med kun donorprobe. Eventuelt blir akseptorintensiteten sammenlignet i donor/akseptor og bare akseptorprøve. Passende prober er kjent på fagområdet og inkluderer for eksempel membrangjennomtrengelige fargestoffer slik som fluorescein og rodamin, organiske fargestoffer slik som cyaninfargestoffer og lantanidatomer. Selvin, ovenfor. Fremgangsmåter og instrumentering for å påvise og måle energioverføring er også kjent på fagområdet. Selvin, ovenfor.

FRET-baserte teknikker som er passende for å påvise og måle protein-protein-interaksjoner i individuelle celler er også kjent på fagområdet. For eksempel kan donorfotoblekings-fluorescens resonansenergioverførings (pbFRET)-mikroskopi og fluorescenslevetid-billedmikroskopi (FLIM) bli benyttet for å påvise dimeriseringen av celleoverflate-reseptorer. Selvin, ovenfor, Gadella & Jovin, J. Cell Biol., 129:1543-58 (1995). i én utførelsesform blir pbFRET benyttet på celler enten "i suspensjon" eller "*in situ*" for å påvise og måle dannelsen av EGFR-HER2- eller HER2-HER3-dimerer, som beskrevet i Nagy et al., Cytometry, 32:120-131 (1998). Disse teknikkene måler reduksjonen i en donors fluorescenslevetid som skyldes energioverføring.

En flowcytometrisk Foerster-type FRET-teknikk (FCET) kan bli benyttet for å undersøke EGFR-HER2- og HER2-HER3-dimerisering, som beskrevet i Nagy et al., ovenfor, og i Brockhoff et al., Cytometry, 44:338-48 (2001).

FRET blir fortrinnsvis benyttet i sammenheng med standard immunhistokjemiske merketeknikker. Kenworthy, Methods, 24:289-96 (2001). For eksempel kan antistoffer som er konjugert med passende fluorescerende fargestoffer bli benyttet som prober for å merke to ulike proteiner. Hvis proteinene er i nærheten av hverandre, virker de fluorescerende fargestoffene som donorer og akseptorer for FRET. Energioverføring blir påvist ved hjelp av standard midler. Energioverføring kan bli påvist ved hjelp av flowcytometriske midler eller ved digitale mikroskopsystemer, slik som konfokal mikroskopi eller bredfelts fluorescensmikroskopi koblet til et kamera med ladetilkoblet enhet (CCD).

Eventuelt blir HER2-antistoffer og enten EGFR- eller HER3-antistoffer direkte merket med to forskjellige fluoroforer, for eksempel som beskrevet i Nagy et al., ovenfor. Tumorceller eller tumorcellelysater blir kontaktet med forskjellig merkede antistoffer, som virker som donorer og akseptorer for FRET i nærvær av EGFR-HER2- eller HER2-HER3-dimerer. Alternativt blir umerkede antistoffer mot HER2 og enten EGFR eller HER3 benyttet sammen med forskjellig merkede sekundære antistoffer som virker som donorer og akseptorer. Se for eksempel Brockhoff et al., ovenfor. Energioverføring blir påvist og nærværet av dimerer blir bestemt hvis merkene blir funnet å ligge nær hverandre.

HER-reseptorligander som er spesifikke for HER2 og enten EGFR eller HER2 kan bli fluorescensen merket og benyttet i FRET-undersøkelser.

Tilstedeværelsen av dimerer på overflaten av tumorceller kan bli påvist ved hjelp av kolokalisering av HER2 med enten EGFR eller HER3 ved å benytte standard direkte eller indirekte immunfluorescensmetoder og konfokal laserskanning mikroskopi. Alternativt blir

laserskanning avbildning (LSI) benyttet for å påvise antistoffbinding og kolokalisering av HER2 med enten EGFR eller HER3 i et høygjennomføringsformat, slik som en mikrobrønn plate, som beskrevet i Zuck et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:11122-27 (1999).

Tilstedeværelsen av EGFR-HER2 og/eller HER2-HER3-dimerer kan bli bestemt ved å identifisere en enzymatisk aktivitet som er avhengig av nærheten av dimerkomponentene. ET HER2-antistoff blir konjugert med et enzym og et EGFR- eller HER3-antistoff blir konjugert med et annet enzym. Et første substrat for det første enzym blir tilsatt og reaksjonen frembringer et andre substrat for det andre enzymet. Dette fører til en reaksjon med et annet molekyl for å frembringe en påvisbar forbindelse, slik som et fargestoff.

Tilstedeværelsen av et annet kjemikalium bryter ned det andre substratet, slik at reaksjonen med et andre enzymet blir forhindret hvis ikke det første og det andre enzymet, og følgelig de to antistoffene, ligger nær hverandre. I en spesiell utførelsesform blir tumor-celler eller cellelysater kontaktet med et HER2-antistoff som er konjugert med glukose-oksidasen og et HER3- eller HER1-antistoff som er konjugert med pepperrotperoksidase. Glukose ble tilsatt til reaksjonen, sammen med en fargestoffforløper slik som DAB og katalase. Tilstedeværelsen av dimerer blir bestemt ved utvikling av farge ved farging for DAB.

Dimerer kan også bli påvist ved å benytte fremgangsmåter som er basert på eTag-analysesystemet (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), som beskrevet for eksempel i US patentsøknad nr. 2001/0049105, publisert 6. desember 2001. En eTag eller "elektroforesemerke", omfatter en påvisbar reporterenhet, slik som en fluorescerende gruppe. Den kan også omfatte en "mobilitetsmodifiserer", som hovedsakelig består av en enhet som har en unik, elektroforetisk mobilitet. Disse enhetene tillater separasjon og påvisning av eTag fra en kompleksblanding ved definerte elektroforesebetingelser, slik som kapillær elektroforese (CE). Delen av eTag som inneholder reporterenheten og eventuelt mobilitetsmodifiserer blir bundet til en første målbindingsenhet med en kløyvbar linker-gruppe for å frembringe en første bindingsforbindelse. Den første målbindingsenheten gjenkjenner spesifikt et spesielt første mål, slik som en nukleinsyre eller et protein. Den første målbindingsenheten er ikke begrenset på noen måte og kan for eksempel være et polynukleotid eller et polypeptid. Fortrinnsvis er den første målbindingsenheten et antistoff eller antistoff-fragment. Alternativt kan den første målbindingsenheten være en HER-reseptorligand eller bindingskompetent fragment derav.

Linkergruppen omfatter fortrinnsvis en kløyvbar enhet, slik som et enzymsubstrat, eller enhver kjemisk binding som kan bli kløyd under definerte betingelser. Når den første målbindingsenheten binder til sitt mål, blir kløyvingsmiddelet introdusert og/eller aktivert, og linkergruppen blir kløyd, for slik å frigjøre delen av eTag som inneholder reporter-enheten og mobilitetsmodifisereren. På det vis indikerer tilstedeværelsen av en "fri" eTag bindingen av målbindingsenheten til sitt mål.

Fortrinnsvis omfatter en andre bindingsforbindelse kløyvingsmiddelet og en andre målbindingsenhet som spesifikt gjenkjenner et annet mål. Den andre målbindingsenheten er heller ikke begrenset på noen måte og kan for eksempel være et antistoff eller antistoff-fragment eller en HER-reseptorligand eller et bindingskompetent ligandfragment.

- 5 Kløyvingsmiddelet er slik at det kun vil kløyve linkergruppen i den første bindingsforbindelsen hvis den første bindingsforbindelsen og den andre bindingsforbindelsen ligger nær hverandre.

Eventuelt omfatter en første bindingsforbindelse en eTag der et antistoff mot HER2 virker som den første målbindingsenheten. En andre bindingsforbindelse omfatter et
 10 antistoff mot EGFR eller HER3 bundet til et kløyvingsmiddel som er i stand til å kløyve linkergruppen på eTag. Kløyvingsmiddelet må fortrinnsvis bli aktivert i rekkefølge for å være i stand til å kløyve linkergruppen. Tumorceller eller tumorcellelysater blir kontaktet med eTag, som binder til HER2, og med det modifiserte EGFR- eller HER3-antistoffet, som binder til EGFR eller HER3 på celleoverflaten. Ubundet bindingsforbindelse blir fortrinnsvis
 15 fjernet, og kløyvingsmiddelet blir aktivert, hvis det er nødvendig. Hvis EGFR-HER2- eller HER2-HER3-dimerer er tilstede, vil kløyvingsmiddelet kløyve linkergruppen og frigjøre eTag på grunn av nærheten til kløyvingsmiddelet med linkergruppen. Fri eTag kan deretter bli påvist ved enhver kjent fremgangsmåte på fagområdet, slik som kapillær elektroforese.

Eventuelt er kløyvingsgruppen en aktiverbar, kjemisk enhet som virker på linker-
 20 gruppen. Kløyvingsmiddelet kan for eksempel bli aktivert ved å eksponere prøven for lys.

Eventuelt blir eTag konstruert ved å benytte et antistoff mot EGFR eller HER3 som den første målbindingsenheten, og den andre bindingsforbindelsen bli konstruert fra et antistoff mot HER2.

Eventuelt blir HER-dimeren påvist ved å benytte et antistoff eller antigen som
 25 spesifikt eller fortrinnsvis binder til dimeren sammenlignet med binding av denne til en hvilken som helst av HER-reseptor i dimeren.

(ii) HER2-fosforylering

Immunpresipitering med EGFR-, HER2- eller HER3-antistoff som diskutert i det
 30 tidligere avsnittet kan eventuelt bli etterfulgt av en funksjonell analyse for dimerer, som et alternativ eller et tillegg til immunblotting. Eventuelt blir immunpresipitering med HER3-antistoff etterfulgt av en analyse for reseptortyrosinkinaseaktivitet i immunpresipitanten. Fordi HER3 ikke har iboende tyrosinkinaseaktivitet, tyder tilstedeværelsen på tyrosinkinaseaktivitet i immunpresipitanten på at HER3 mest sannsynlig er assosiert med HER2. Graus-
 35 Porta et al., EMBO J., 16:1467-55 (1997), Klapper et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:4995-5000 (1999). Dette resultatet kan bli bekreftet ved hjelp av immunblotting med HER2-antistoffet. Eventuelt blir immunpresipitering med HER2-antistoffet etterfulgt av en analyse for EGFR-reseptor tyrosinkinaseaktivitet. I denne analysen blir immunpresipitanten kontaktet med radioaktivt ATP og et peptidsubstrat som mimikerer *in vivo*-sete for trans-

fosforylering av HER2 ved EGFR. Fosforylering av peptidet indikerer ko-immunpresipitering og dermed dimerisering av EGFR med HER2. Reseptortyrosinkinase-aktivitetsanalyser er velkjente på fagområdet og inkluderer analyser som påviser fosforylering av målsubstrater, for eksempel ved fosfotyrosinantistoff, og aktivering av tilhørende signaloverføringsveier, slik som MAPK-veien.

Fosforylering av HER-reseptor kan bli undersøkt ved immunpresipitering av én eller flere HER-reseptorer, slik som HER2 (HER2)-reseptor og Western-blott-analyse. For eksempel blir positivitet bestemt ved tilstedeværelsen av et fosfo-HER2-bånd på gelen, ved å benytte et anti-fosfotyrosinantistoff for å påvise fosforylerte tyrosinrest(er) i den immunpresipiterte HER-reseptoren. Anti-fosfotyrosinantistoffer er kommersielt tilgjengelige fra PanVera (Madison, WI), et datterselskap av Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA) eller Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Negativitet blir bestemt ved fravær av båndet.

Eventuelt blir fosforylering av HER2 (HER2)-reseptor undersøkt ved immunhistokjemi ved å benytte et fosfospesifikt HER2-antistoff (klon PN2A; Thor et al., J. Clin. Oncol., 18(18):3230-3239 (2000)).

Andre fremgangsmåter for å påvise fosforylering av HER-reseptor/reseptorer inkluderer KIRA ELISA (US patentskrift nr. 5 766 863, 5 891 650, 5 914 237, 6 025 145 og 6 287 784), massespektrometri (sammenligne størrelsen på fosforylert og ikke-fosforylert HER2) og e-tag-nærhetsanalyse med både et HER (f. eks. HER2)-antistoff og fosfospesifikt eller fosfotyrosinspesifikt antistoff (f. eks. ved å benytte eTag-analysesettet som er tilgjengelig fra Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Detaljer av eTag-analysen er beskrevet her ovenfor.

Man kan også benytte fosfospesifikke antistoffer i cellulær oppstilling for å påvise fosforyleringsstatus i en cellulær prøve med signaltransduksjonsprotein (US 2003/0190689).

(iii) HER2-ligander

Nivåer av en HER-ligand, slik som TGF- α , i eller assosiert med tumoren kan bli bestemt ifølge kjente prosedyrer. Slike analyser kan påvise protein og/eller nukleinsyre som koder for det i prøven som skal bli testet. I én utførelsesform kan HER-ligandnivåer i tumoren bli bestemt ved å benytte immunhistokjemi (IHC), se for eksempel Scher et al., Clin. Cancer Research, 1:545-550 (1995). Alternativt, eller i tillegg kan man evaluere nivåer av HER-ligandkodende nukleinsyre i prøven som skal bli testet, f. eks. via FISH, southern-blotting eller PCR-teknikker.

(iv) Ikke-HER2-overuttrykkende kreft

Mens kreften kan bli karakterisert ved overekspresjon av HER2-reseptoren, vedrører foreliggende søknad en fremgangsmåte for å behandle kreft som ikke er ansett for å være en HER2-overuttrykkende kreftform.

For å bestemme HER2-ekspresjon i kreften, er forskjellige diagnostiske/-
 5 prognostiske analyser tilgjengelige. I én utførelsesform blir HER2-overekspresjon analysert ved hjelp av IHC, f. eks. ved å benytte HERCEPTEST (Dako). Parafininnleirede vevs-seksjoner fra en tumorbiopsi kan bli utsatt for IHC-analysen og tillagt et HER2-protein-fargingsintensitetskriterium som følger:

Skår 0 ingen farging er observert eller membranfarging er observert i mindre enn
 10 10 % av tumorcellene.

Skår 1+ en svak/så vidt synlig membranfarging er påvist i mer enn 10 % av tumorcellene. Cellene er bare farget i deler av deres membran.

Skår 2+ en svak til moderat fullstendig membranfarging er observert i mer enn 10 % av tumorcellene.

15 Skår 3+ en moderat til sterk fullstendig membranfarging er observert i mer enn 10 % av tumorcellene.

De tumorene med 0 eller 1+ skår for HER2-overekspresjonsvurdering kan bli karakterisert som ikke å overuttrykke HER2, mens de tumorene med 2+ eller 3+ skår kan bli karakterisert som å overuttrykke HER2.

20 Tumorer som overuttrykker HER2 kan bli gradert ved immunhistokjemiske skår som tilsvarer antall kopier av HER2-molekyler som blir uttrykt per celle og kan bli bestemt biokjemisk:

0 = 0 – 10 000 kopier/celle

1+ = minst omtrent 200 000 kopier/celle,

25 2+ = minst omtrent 500 000 kopier/celle,

3+ = minst omtrent 2 000 000 kopier/celle.

Overekspresjon av HER2 ved 3+ nivået, som fører til en liganduavhengig aktivering av tyrosinkinase (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:7159-7163 (1987)), forekommer i omtrent 30 % av brystkrefttyper, og hos disse pasientene blir tilbakefallsfri
 30 overlevelse og total overlevelse minsket (Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989), Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987)). Alternativt, eller i tillegg, så kan FISH-analyser slik som INFORM (solgt av Ventana, Arizona) eller PATHVISION (Vysis, Illinois) bli utført på formalinfiksert, parafininnleiret tumorvev for å bestemme omfanget av (hvis noe) HER2-overekspresjon i tumoren.

35 Eventuelt vil kreftformen være én som uttrykker (og kan overuttrykke) EGFR, og slik ekspresjon kan bli evaluert med fremgangsmåtene for å evaluere HER2-ekspresjon som påpekt ovenfor.

HER-reseptor eller HER-ligandoverekspresjon eller amplifisering kan også bli evaluert ved å benytte en diagnostisk *in vivo*-analyse, f. eks. ved å administrere et molekyl

(slik som et antistoff) som binder til molekylet som skal bli påvist og som er merket med et påvisbart merke (f. eks. en radioaktiv isotop) og eksternt skanne pasienten for lokalisering av merke.

5 VI. Behandling med HER2-antistoffsammensetningen

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det påtenkt at HER2-antistoffet kan bli benyttet til å behandle kreft. Kreften vil vanligvis omfatte HER2-uttrykkende celler, slik at HER2-antistoffet her er i stand til å binde til kreftcellene. Forskjellige kreftformer som kan bli behandlet med sammensetningen er fremlagt i definisjonsavsnittet ovenfor.

10 Det er også påtenkt at HER2-antistoffet kan bli benyttet til å behandle forskjellige ikke-maligne sykdommer eller forstyrrelser, slik som autoimmun sykdom (f. eks. psoriasis), endometriose, skleroderma, restenose, polypper slik som kolonpolypper, nesepolypper eller gastrointestinal polypper, fibroadenom, respiratorisk sykdom, kolecystitt, neurofibromatose, polycystisk nyresykdom, inflammatoriske sykdommer, hudforstyrrelser inkludert psoriasis
15 og dermatitt, vaskulær sykdom, tilstander som involverer unormal proliferasjon av vaskulære epitelceller, ganstrointestinalsår, Mentrers sykdom, utskillende adenomer eller proteintapssyndrom, nyreforstyrrelser, angiogene forstyrrelser, okkulær sykdom slik som aldersrelatert, makulær degenerasjon, antatt okkulær histoplasmose syndrom, retina neovaskularisering fra proliferativ diabetes retinopati, retinavaskularisering, diabetisk
20 retinopati eller aldersrelatert, makulær degenerering, benassosierte patologier slik som osteoartritt, rakitt og osteoporose, skade som følge av en cerebral iskemisk hendelse, fibrotiske sykdommer eller ødemsykdommer slik som hepatisk skrumplever, lungefibrose, karcinose, troiditt, hyperviskositetssyndrom, systemisk, Osler Weber-Rendu-sykdom, kronisk okklusiv pulmonal sykdom eller ødem som følge av brannskader, traume, stråling,
25 slag, hypoksi eller iskemi, hypersensitivitetreaksjon i huden, diabetes retinopati og diabetes neuropati, Guillain-Barre syndrom, transplantat-versus-vertssykdom eller transplantat-avvisning, Pagets sykdom, ben- eller leddinflammasjon, fotoaldring (f. eks. forårsaket av UV-stråling av human hud), godartet prostata hypertrofi, visse mikrobielle infeksjoner inkludert mikrobielle patogener som er valgt fra adenovirus, hantavirus, Borrelia
30 burgdorferi, Yersinia spp. og Bordetella pertussis, tromber forårsaket av plateaggregering, reproduktive tilstander slik som endometrioser, ovariehyperstimulering syndrom, preeklampsi, dysfunksjonell livmorblødning eller menometroragi, synovitt, aterom, akutte og kroniske neuropatier (inkludert proliferativ glomerulonefritt og diabetesindusert nyresykdom), eksem, hypertrofisk arrdannelse, endotoksisk sjokk og soppinfeksjon,
35 familiær adenomatosepolypose, neurodegenerative sykdommer (f. eks. Alzheimers sykdom, AIDS-relatert demens, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, retinitis pigmentosa, ryggmargs muskulær atrofi og cerebellær degenerering), myelodysplastiske syndromer, aplastisk anemi, iskemisk skade, fibrose i lungen, nyren eller leveren, T-celle mediert hypersensitivitetssykdom, barnehypertrofisk pylorisk stenose, urinveisobstruktivt

syndrom, psoriasisartritt og Hashimoto's tyroiditt. Foretrukne ikke-maligne indikasjoner for terapi her inkluderer psoriasis, endometriose, skleroderma, vaskulær sykdom (f. eks. restenose, arteriosklerose, koronar arteriesykdom eller hypertensjon), kolonpolypper, fibroadenom eller respiratorisk sykdom (f. eks. astma, kronisk bronkitt, bronkieastase eller

5 cystisk fibrose).

Behandling med HER2-antistoffet vil føre til en forbedring i tegnene eller symptomene på sykdom. Der sykdommen som blir behandlet er kreft, kan for eksempel slik terapi føre til en forbedring i overlevelse (total overlevelse og/eller progresjonsfri overlevelse) og/eller føre til en objektiv, klinisk respons (delvis eller fullstendig).

10 HER2-antistoffet i sammensetningen som blir administrert er fortrinnsvis et nakent antistoff. HER2-antistoffet som blir administrert kan likevel være konjugert til et cytotoxisk middel. Immunkonjugatet og/eller HER2-proteinet som det er bundet til blir fortrinnsvis internalisert av cellen, noe som fører til økt terapeutisk virkning av immunkonjugatet i å drepe kreftcellen som det er bundet til. Eventuelt målsøker eller interfererer

15 det cytotoxiske middelet med nukleinsyre i kreftcellen. Eksempler på slike cytotoxiske midler inkluderer maytansinoider, kalicheamiciner, ribonukleaser og DNA-endonukleaser. HER2-antistoffet kan bli administrert til en human pasient i overensstemmelse med kjente fremgangsmåter, slik som intravenøs administrering, f. eks. som en bolus eller ved

20 kontinuerlig infusjon over en tidsperiode, ved intramuskulær, intraperitoneal, intracerebrospinal, subkutan, intraartikulær, intrasynovial, intratekal, oral, topisk eller inhalerende administrering. Intravenøs administrering av antistoffsammensetningen er foretrukket.

For forebygging eller behandling av sykdom vil den passende doseringen av HER2-antistoffet avhenge av typen av sykdom som blir behandlet, som definert ovenfor, alvorlighetsgraden og utviklingen av sykdommen, hvorvidt HER2-antistoffet blir administrert

25 for preventive eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons ovenfor HER2-antistoffet, og vurderingen til ansvarlig lege. HER2-antistoffet blir passende administrert til pasienten på et tidspunkt eller over en serie med behandlinger. Avhengig av typen og alvorlighetsgraden av sykdommen, er omtrent 1 µg/kg til 50 mg/kg (f. eks. 0,1-20 mg/kg) av HER2-antistoffet en innledende kandidatdosering for

30 administrering til pasienten, uansett om dette for eksempel er ved én eller flere separate administreringer, eller ved kontinuerlig infusjon. Den første infusjonstiden for HER2-antistoffet kan være lengre enn påfølgende infusjonstider, for eksempel omtrent 90 minutter for den første infusjon, og omtrent 30 minutter for påfølgende infusjoner (hvis den første infusjonen blir godt tolerert). Den foretrukne doseringen av HER2-antistoffet vil ligge i

35 området fra omtrent 0,05 mg/kg til omtrent 10 mg/kg. Én eller flere doser på omtrent 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg eller 10 mg/kg (eller enhver kombinasjon derav) kan slik bli administrert til pasienten. Slike doser kan bli administrert periodisk, f. eks. hver uke eller hver tredje uke (f. eks. slik at pasienten mottar fra omtrent to til omtrent tyve, f. eks. omtrent seks doser av HER2-antistoffet). En innledende høyere dose, etterfulgt av én eller

flere daglige doser kan bli administrert. HER2-antistoffet kan bli administrert som en dose på omtrent 840 mg etterfulgt av omtrent 420 mg omtrent hver 3. uke. HER2-antistoffet kan bli administrert ved en dose på omtrent 1050 mg, administrert omtrent hver 3. uke.

Andre terapeutiske midler kan bli kombinert med HER2-antistoffet. Slik kombinert administrering inkluderer koadministrering eller samtidig administrering, ved å benytte separate formuleringer eller en enkel, farmasøytisk formulering, og påfølgende administrering i en hvilken som helst rekkefølge, der det fortrinnsvis er en tidsperiode mens begge (eller alle) aktive midler samtidig utøver deres biologiske aktiviteter. Det andre terapeutiske middelet kan dermed bli administrert før eller etter administrering av HER2-antistoffet. Timingen mellom minst én administrering av det andre terapeutiske middelet og minst én administrering av HER2-antistoffet er fortrinnsvis omtrent 1 måned eller mindre, og mest foretrukket omtrent 2 uker eller mindre. Alternativt blir det andre terapeutiske middelet og HER2-antistoffet administrert samtidig til pasienten, i en enkelt formulering eller i separate formuleringer.

Eksempler på andre terapeutiske midler som kan bli kombinert med HER2-antistoffet inkluderer en hvilken som helst eller flere av: et kjemoterapeutisk middel slik som en anti-metabolitt, f. eks. gemcitabin, en annet forskjellig HER2-antistoff (for eksempel et vekstinhibitorisk HER2-antistoff slik som trastuzumab, eller et HER2-antistoff som induserer apoptose for en HER2-overuttrykkende celle, slik som 7C2, 7F3 eller humaniserte varianter derav), et annet antistoff som er rettet mot et annet tumorassosiert antigen, slik som EGFR, HER3, HER4, anti-hormonforbindelse, f. eks. en anti-østrogenforbindelse slik som tamoxifen eller en aromataseinhibitor, en kardiobeskytter (for å forhindre eller redusere enhver myokarddysfunksjon som er assosiert med terapien), et cytokin, et EGFR-måltrettet legemiddel (slik som TARCEVA, IRESSA eller Cetuximab), et anti-angiogent middel (spesielt bevacizumab solgt av Genentech under varemerket AVASTIN), en tyrosinkinase-inhibitor, en COX-inhibitor (for eksempel en COX-1- eller COX-2-inhibitor), ikke-steroid anti-inflammatorisk legemiddel, celecoxib (CELEBREX), farnesyltransferaseinhibitor (for eksempel tipifarnib/ZARNESTRA R11577, som er tilgjengelig fra Johnson and Johnson eller lonafarnib SCH66336 som er tilgjengelig fra Schering-Plough), antistoff som binder onkoføtalprotein C1 125 slik som oregovomab (MoAb B43.13), HER2-vaksine (slik som HER2-AutoVac-vaksine fra Pharmexia eller APC8024-proteinvaksine fra dendreon eller HER2-peptidvaksine fra GSK/Corixa), en annen HER-målsøkende terapi (f. eks. trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 osv.), Raf- og/eller ras-inhibitorer (se for eksempel WO 2003/86467), doksil, topotekan, taxan, GW572016, TLK286, EMD-7200, et medikament som behandler kvalme slik som en seretoningantagonist, steroid eller benzodiazepin, et medikament som forebygger eller behandler hudutslett eller standard akneterapier, inkludert topisk eller oralt antibiotika, et kroppstemperaturreducerende medikament slik som acetaminofen, difenhydramin eller meperidin, hematopoietisk vekstfaktor osv.

Egnede doseringer av en hvilket som helst av de ovenfor koadministrerte midlene er de som per i dag blir benyttet og kan bli senket på grunn av den kombinerte virkningen (synergien) til middelet og HER2-antistoffet. Behandling med kombinasjonen av HER2-antistoffsammensetningen og annet terapeutisk middel kan føre til en synergistisk, eller

5 større enn additiv, terapeutisk fordel for pasienten.

Hvis et kjemoterapeutisk middel blir administrert, blir det vanligvis administrert ved doseringer som er kjent for dette, eller eventuelt senket på grunn av den kombinerte virkningen av legemidlene eller negative bivirkninger som er tilskrivbar til administrering av det kjemoterapeutiske middel. Klargjørings- og doseringsskjemaer for slike kjemo-

10 terapeutiske midler kan bli benyttet ifølge produsentens instruksjoner eller som bestemt empirisk av erfarne fagfolk. Klargjørings- og doseringsskjema for slik kjemoterapi er også beskrevet i Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

I tillegg til de terapeutiske regimene ovenfor kan pasienten bli utsatt for kirurgisk

15 fjerning av kreftceller og/eller strålingsterapi.

VII. Deponering av materialer

De følgende hybridomcellelinjene har blitt deponert hos the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

20

Antistoff betegnelse	ATCC nr.	Deponeringsdato
7C2	ATCC HB-12215	17. oktober, 1996
7F3	ATCC HB-12216	17. oktober, 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24. mai, 1990
25 2C4	ATCC HB-12697	8. april, 1999

Ytterligere detaljer omkring oppfinnelsen er illustrert ved de følgende eksemplene.

EKSEMPEL

30 Karakterisering av pertuzumab preparater

Pertuzumab er et rekombinant, humanisert, monoklonalt antistoff som er generert basert på humant IgG1(κ)-rammeverk. Det omfatter to tunge kjeder (448 rester) og to lett kjeder (214 rester). De to tunge kjedene er bundet sammen med to interkjededisulfider og hver lette kjede er bundet til en tung kjede via ett interkjededisulfid. Det foreligger et N-

35 bundet glykosyleringssete på Fc-regionen på pertuzumab på Asn-299 på de to tunge kjedene. Pertuzumab er forskjellig fra HERCEPTIN (trastuzumab) i epitopbindingsregionene på den lette kjeden (12 aminosyrer i forskjell) og den tunge kjeden (30 aminosyrer i forskjell). Som et resultat av disse forskjellene binder pertuzumab til en fullstendig forskjellig epitop på HER2-reseptoren. Binding av pertuzumab på HER2-reseptoren på

humane epitelceller forhindrer det fra å danne komplekser med andre medlemmer av HER-reseptorfamilien (Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)). Ved å blokkere kompleksdannelse forhindrer pertuzumab de vekststimulatoriske effektene av ligander for kompleksene (f. eks. EGF og heregulin). *In vitro*-eksperimenter viser at både pertuzumab og pertuzumab-Fab inhiberer bindingen av heregulin (HRG) til MCF7-celler og at HRG-stimulert fosforylering av HER2-HER3-komplekset kan bli inhibert ved både pertuzumab og pertuzumab-Fab (Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)). *In vivo*-inhibering av tumorvekst av pertuzumab og en polyetylen glykolderivatisert Fab av pertuzumab ble videre funnet å være sammenlignbar i en murin prostatakraft-xenograftmodell (Agus et al., Cancer Cell, 2:127-137 (2002)). Disse dataene tyder på at Fc-regionen til antistoffet ikke er nødvendig for inhiberingen av tumorvekst, og videre er ikke bivalens- og Fc-medierte effektorfunksjoner nødvendige for *in vivo*- eller *in vitro*-biologisk aktivitet.

De følgende prøvene som er uttrykt av rekombinant konstruerte Kinesisk Hamster Ovarie (CHO)-celler ble analysert:

Prøve	Fremstillingsprosess	Skala
Referansemateriale	Fase-I	400 L
Lot nr. S9802A	Fase-II	2000 L
Prosessutviklingsmaterialer	Klinisk utviklingsprogram	
(kjøring 1, 2, 3, 5 og 6)	inkludert Fase-III	400 L
Bemerk: 400 L, kjøring 4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L innokulumkulturen på Dag 2.		

N-terminal sekvensanalyse

N-terminal sekvensanalyse blir utført ved å benytte standard Edman-degraderingsfremgangsmåter og resultatene er vist i Tabell 2A, Tabell 2B og Tabell 2C for henholdsvis referanse-materiale, Lot nr. S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmateriale. De forventede N-terminale sekvensene (Figur 3A og Figur 3B) til de lette og tunge kjedene ble observert i alle prøver. I tillegg ble en mindre sekvens som svarer til den lette kjeden med tre ytterligere aminosyrer Val-His-Ser (VHS) som ligger foran den forventede N-terminalsekvensen også påvist i de fem prøvene. VHS-sekvensen er en del av signalpeptidet som blir fjernet fra proteinet når det blir utskilt. En alternativ kløyving av signalpeptidet fører til VHS-forlengelse på den N-terminale enden av pertuzumab. I materialene som tidligere er fremstilt for Fase-I/II kliniske studier, har omtrent 2-4 % av pertuzumabmolekylene den N-terminal-VHS-sekvensen på en av de to lette kjedene. Nivået av lette kjeder med N-terminal VHS-sekvens i disse materialene (1-2 % av hver lette kjede) var imidlertid for lavt til å bli påvist i den N-terminale sekvensanalysen. I de fem prosessutviklingsprøvene er nivået av denne lette kjedetyper noe over deteksjonsgrense for den N-terminale analysen ved omtrent 4-5 %. De N-terminale sekvensdataene for de fem

prosessutviklingsprøvene er i overensstemmelse med kationebytterkromatografiresultatene, som viser at de fem prosessutviklingsprøvene har omtrent 9 % av pertuzumabmolekylene med en lett kjede som inneholder VHS-forlengelsen (se kationebytterkromatografi (CEC) nedenfor).

- 5 Ingen andre sekvenser ble påvist (grense for påvisning estimert til 3 %), noe som tyder på fraværet av interne kløyvings seter.

Massespektrometrianalyse

- Pertuzumabprøvene ble redusert med ditiotreitol og analysert ved hjelp av
10 elektrospray ionisering massespektrometri (ESI-MS) ved å benytte et PE SCIEX API 3000 massespektrometer for å bekrefte at massene til de tunge og lette kjedene er i overensstemmelse med deres forventede sekvenser. De rekonstruerte massespektra for referansemateriale, lot S9802A, og 400 L skala kjøring-1-prosess utviklingsmateriale blir sammenlignet i Figur 8A og Figur 8B. Den observerte massen til den lette kjeden (23 524 Da) er i
15 overensstemmelse med verdien som er beregnet fra dens sekvens for alle tre materialene. To ytterligere mindre topper på 23 685 Da og 23 847 Da (henholdsvis 161 og 323 Da høyere enn massen til den lette kjeden) ble observert. Den første toppen (23 685 Da) skyldes sannsynligvis glykosylering på den lette kjeden. Den andre toppen (23 847 Da) blir observert mer klart i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene. Denne toppen stammer
20 sannsynligvis fra den lette kjeden med Val-His-Ser-forlengelsen (se den N-terminale sekvensanalysen ovenfor og kationebytter kromatografianalysen) eller den lette kjeden med to glyserings seter.

- Flere masser som tilsvarer ulike former av den tunge kjeden ble observert. Den dominerende typen av den tunge kjeden har en masse på 50 532 Da som fremkommer fra
25 den tunge kjeden som består av restene 1-448 med en G0-oligosakkaridstruktur. Andre observerte former inkluderer den tunge kjeden som inneholder restene 1-448 med en G1- eller G2-oligosakkaridstruktur (Figur 8B).

Ladningsheterogenisitet med kationebytterkromatografi og kapillærsone- 30 elektroforese

- Kationebytter kromatografi (CEC) ble benyttet for å undersøke ladningsheterogeniteten i pertuzumab. Prøver før og etter behandling med karboksypeptidase-B (CPB) ble analysert med DIONEX-kationebytterkolonne (PROPAC WCX-10, 4 mm x 250 mm) ved å benytte en 20 mM MES-buffer med pH 6,0 og grunn NaCl-gradient. Sammen-
35 ligningen av kromatogrammer er vist i Figur 9A (før CPB-behandling) og Figur 9B (etter CPB-behandling). Flere topper ble observert i alle tre loter. For karakteriseringsformål ble kromatogrammet delt i seks regioner (merket A til F i Figur 9A og 9B). Relative topparealer for de seks regionene er oppgitt i Tabell 3A og Tabell 3B. Mengden av sur variant (i region A) er høyere i lot S9802A og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene enn i referanse-

materialet. De basiske variantene i region C og D, som har blitt vist å inneholde pertuzumab med en C-terminal lysinrest på én (region C) eller begge (region D) av de tunge kjedene, er redusert i lot S9802A og i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene sammenlignet med referansematerialet. Etter CPB-behandling ble pertuzumabmolekylene med én eller to tung kjede-C-terminale lysiner konvertert til hovedtype i region B og ikke lenger påvist i region C og D. Kun en liten topp, hvis identitet ennå ikke er bestemt, forble i region C etter CPB-behandling. Den basiske varianten i region E, som er vist å fremkomme fra pertuzumab-molekylet med en lett kjede inneholdende VHS-forlengelsen, er høyere i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene (9-10 %) enn i referansematerialet og i lot S9802A (4 %). Den basiske varianten i region F ble vist å være pertuzumab inneholdende N-terminal VHS-forlengelse på en lett kjede og et C-terminalt lysin på en tung kjede. Som et resultat av høyere nivåer av sure og basiske varianter er hovedtypene i region B lavere i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene enn i referansematerialet eller lot S9802A.

I tillegg til kationebytter kromatografi ble kapillærsone elektroforese (CZE) benyttet for å undersøke ladningsheterogenisiteten i pertuzumab. CZE-toppene ble identifisert og korrelerer med toppene som er observert ved CEC-analyse ved å analysere individuelt samlede CEC-fraksjoner med CZE. De relative mengdene av ladningsvarianter bestemt ved CZE og CEC er sammenlignbare for alle materialene som er analysert.

De biologiske aktivitetene til pertuzumab-ladningsvarianter i ulike CEC-fraksjoner ser ut til å være de samme basert på en cellebasert anti-proliferasjonsanalyse. Ladningsheterogeniteten i pertuzumab er dermed ikke forventet å påvirke dens styrke. De biologiske aktivitetene for 400 L prosessutviklingsmaterialene er sammenlignbare med de for referansematerialet og Lot S9802A (se biologisk aktivitet og Tabell 4).

Størrelseseksklusjonskromatografi

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) ble benyttet for å bestemme omfanget av aggregering i pertuzumab. Prøver ble analysert på en TOSHAAS TSK G3000SWXL-kolonne (7,8 mm x 300 mm). Isokratisk eluering ble benyttet (100 mM kaliumfosfat, pH 6,8, 0,5 ml/minutt) med ultrafiolett (UV) absorbans overvåket ved 280 nm. SEC-data for referansematerialet, Lot S9802A og de 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmaterialet er vist i Figur 10. Monomeren er konsekvent større enn 99,6 % etter toppareal og aggregatet er under 0,3 % i alle materialer som ble analysert.

CE-SDS-LIF-analyse

Kapillærelektroforese-natriumdodecylsulfatanalyse med laserindusert fluorescens (CE-SDS-LIF) ble også benyttet for å undersøke renheten til pertuzumab-prøver. Lignende elektroferogrammer ble observert for referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmaterialet med og uten reduksjon (Figur. 11A og 11B). Nivåene av ikke-glykosylert tung kjede bestemt fra elektroferogrammene av reduserte materialer er

på mellom 2,6 % og 4,3 % (med hensyn til total tung kjede). Mengdene av aggregater i disse prøvene (ikke-redusert) bestemt ved CE-SDS-LIF-analyse er i overensstemmelse med SEC-resultatene. Ikke noe bevis på signifikante produktfragmenter eller andre urenheter ble funnet i CE-SDS-LIF-analysene av disse prøvene. CE-SDS-LIF-dataene tyder på at urenhetsprofilen til 400 L skala prosessutviklingsmaterialene er tilsvarende de for referansematerialet og lot S9802A.

SDS-PAGE-analyse

SDS-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)-analysen (4-20 % T-gel (Daiichi Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan) med SYPRORUBY-farging) ble utført for å sammenligne de reduserte og de intakte prøvene i referansematerialet, Lot S9802A og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene. Ingen nye bånd ble observert i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene, noe som igjen tyder på at den totale urenhetsprofilen i 400 L skala prosessutviklingsmaterialene er lik som for referansematerialet og lot S9802A.

Tryptiske og Lys-C-peptidkartanalyser

Tryptiske og Lys-C-peptidkartanalyser blir utført for å undersøke og sammenligne den primære strukturen til pertuzumab i referansematerialet, Lot S9802A og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene. Alikvoter av redusert og s-karboksymetylerert pertuzumab ble fordøyd med trypsin, og alikvoter av redusert og sulfitolysert pertuzumab ble fordøyd med endoproteinase-Lys-C. Trypsinfordøyningen ble separert ved hjelp av reversfase kromatografi ved å benytte en VYDAC C-18-kolonne (4,6 mm x 250 mm) med en acetonitrilgradient på 0-60 %. Absorbans ble overvåket ved 214 nm og peptidmasser ble bestemt ved hjelp av ESI-MS ved å benytte en THERMO FINNIGAN LCQ. Lys-C-fordøyningen ble separert ved hjelp av reversfasekromatografi ved å benytte en ZORBAX C-8-kolonne (4,6 mm x 150 mm) med en isopropylalkoholgradient (IPA) på 0-100 %. Absorbans ble overvåket ved 214 nm og peptidmasser ble bestemt ved hjelp av ESI-MS ved å benytte en THERMO FINNIGAN LCQ.

De tryptiske og Lys-C-peptidkartene for referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmateriale ble sammenlignet i Figur 12A og Figur 12B. Både tryptisk og Lys-C-kart for alle tre materialene er hovedsakelig identiske. Hoveddelene av peptidene ble identifisert ved hjelp av LC-MS og matchet til en forventet peptidmasse. De observerte, tryptiske peptidene identifiserte 97,1 % (436/449) av de tunge kjederestene og 95,8 % (205/214) av de lette kjede restene. Sekvensdekningen er 98,4 % (442/449) og 70,6 % (151/214) for henholdsvis den tunge og den lette kjeden, i Lys-C-kartet. Det N-terminale peptidet som inneholder VHS-forlengelsen ble funnet å eluere sammen med det N-terminale peptidet uten VHS-forlengelsen i det tryptiske peptidkartet ved LC-MS. Ingen vesentlige mengder av deamiderte eller oksiderte peptider ble påvist i peptidkartene.

Biologisk aktivitet

Den biologiske aktiviteten til pertuzumab ble bestemt ved å måle dets evne til å inhibere proliferasjon av den humane brystkreft cellelinjen MDA-MB-175-VII. De prosentvise, spesifikke aktivitetene som ble oppnådd for fem 400 L skala prosess-utviklingsprøver (Tabell 4) ligger i området på 90-96 % og er tilsvarende aktivitetene for referansematerialet (100 % ved definisjon) og lot S9802A (98 % rapportert i Analyse-sertifikatet). Som forventet påvirker ikke ladningsheterogeniteten styrken til pertuzumab. Alle materialer har sammenlignbare antiproliferative aktiviteter.

N-bundet oligosakkaridanalyse

En del av masseheterogeniteten i den tunge kjeden fremkommer fra glykosyleringer på Asn-299. For å undersøke heterogeniteten til oligosakkaridene, ble pertuzumab-prøver fordøyd over natten med PNGase-F for å frigjøre de N-bundne glykanene. De frigjorte oligosakkaridene ble deretter derivatisert med fluoroforen 9-amino-1,4,6-trisulfonat (APTS). Individuelle glykanformer ble separert ved hjelp av kapillær elektroforese (CE) (Beckman P/ACE 5500 CE utstyrt med Beckman-belagt kapillær) og kvantifisert med fluorescenspåvisning.

Elektroferogrammene fra CE-analyse av de frigjorte, naturlige oligosakkaridene fra referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmaterialet er vist i Figur 13. For referanse er oligosakkaridstrukturene som vanligvis blir funnet hos humane IgG1-antistoffer, og en oppsummering av nomenklaturen som er benyttet, inkludert i Figur 14a og 14b. Relative mengder av oligosakkarider i alle materialer er oppsummert i Tabell 5.

Oligosakkarider med G0- og 1-strukturer er de dominerende glykaner. Topper som fremkommer fra andre oligosakkaridstrukturer ble også observert i elektroferogrammene. Disse strukturene inkluderer G2, G0-F, G-1, Man5 og G1-1 (eller Man6)-glykoformer. I tillegg blir isoformene løst. Fordelingen av observerte glykaner er tilsvarende i alle materialer (Tabell 5). Sammenlignet med referansematerialene og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene har likevel Fase-II-materialet (lot S9802A) en mindre mengde med glykaner med en G0-struktur og flere glykaner med G1-struktur. Til tross for forskjellene i glykanfordeling, har alle materialene lignende biologiske aktiviteter. I tillegg hadde ikke endringen i glykanheterogenitet noen signifikant påvirkning på bindingsaktiviteten til pertuzumab for RcRn (Tabell 6) eller Fc-gamma-reseptorer (Tabell 7) (se FcRn-reseptor og Fc-gamma-reseptor bindingsanalyse).

De frigjorte, nøytrale oligosakkaridene ble også analysert ved hjelp av MALDI-TOF-massespektrometri (MALDI-TOF/MS). MALDI-TOF-spektra for de frigjorte, nøytrale oligosakkaridene fra referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklingsmaterialet ble sammenlignet i Figur 15. Glykanstrukturen og fordelingen som er fremskaffet ved hjelp av MALDI-TOF/MS-analyse er i overensstemmelse med CE-resultatene.

Kapillærisoelektrisk fokuseringsanalyse

Kapillærisoelektrisk fokusering (cIEF) ble benyttet til å bestemme pI for pertuzumab i referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala kjøring-1-prosessutviklings-
 5 materialet. Selv om de relative mengdene av de ulike, ladede enhetene i disse materialene var noe forskjellig, som observert i CEC-analysen, ble pI for hovedtypen funnet å være 8,7 i alle prøver.

Fri sulfhydrylanalyse

10 Referansemateriale, lot S9802A og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene ble testet for fri tiol (uparet cysteinrest) ved å benytte Ellmans analysen. Fritt tiolnivå var under deteksjonsgrensen (omtrent 0,05 mol fri tiol per mol protein) i alle materialene som ble testet.

15 FcRn-reseptorbindingsanalyse

FcRn-reseptorbindingsaffinitetene til pertuzumab fra referansematerialet, lot S9802A og 400 L skala prosessutviklingsmaterialene ble sammenlignet ved å benytte en ELISA-analyse tilsvarende den som er beskrevet i Shields et al., J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (1002). Referansematerialet ble benyttet som en standard i denne analysen.

20 MAXISORP 96-brønners mikrobrønnplater (Nunc, Roskilde, Danmark) ble først belagt med NEUTRAVIDIN (Pierce, Rockford, IL) ved 4 °C over natten. Biotinyllert, humant FcRn ble deretter tilsatt til platene ved 2 µg/ml og inkubert i én time. Elleve to-gangers serielle fortyntninger av pertuzumabprøver (3,1-3200 ng/ml) ble tilsatt til platene og inkubert i to timer. Bundet pertuzumab ble påvist ved å tilsette peroksidasermerket geit-
 25 F(ab')₂-anti-humant IgG-F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) og ved å benytte 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) som substratet. Absorbans ble avlest ved 450 nm på en TITERTEK MULTISKAN (MCC/340)-avleser (ICN, Costa Mesa, CA). FcRn-bindingsaffiniteten til pertuzumab ble også evaluert i et annet ELISA-format der platene ble belagt med HER2-ECD. Seriellt fortynnede
 30 pertuzumab-prøver ble tilsatt til platene og inkubert i to timer. Platene ble vasket og 2 mg/ml biotinyllert, humant FcRn ble tilsatt. Bundet FcRn ble påvist ved å benytte streptavidin-HRP med TMB som substratet.

Absorbansen på midtpunktet av titreringskurven (mid-OD) til standarden (dvs. referansemateriale) og de tilsvarende konsentrasjonene for standard og prøver på denne
 35 mid-OD ble bestemt. Den relative bindingsaffiniteten ble beregnet ved å dele mid-OD-konsentrasjonen for standard med den for prøven.

De relative FcRn-bindingsaffinitetene som ble oppnådd fra begge ELISA-formatene er fremlagt i Tabell 6. Data fra de to forskjellige ELISA-formatene er sammenlignbare. Selv om glykanfordelingen i forskjellige pertuzumabmaterialer ikke er identiske, så er FcRn-

bindingsaffinitene til disse materialene sammenlignbare, noe som indikerer at glykanheterogeniteten i pertuzumab ikke har noen åpenbar innvirkning på dens FcRn-bindingsaffinitet.

5 Fc-gamma reseptorbindingsanalyse

Binding av pertuzumab til den humane Fc-gammareseptoren (FcγR) ble undersøkt ved hjelp av en ELISA-analyse ifølge Shields et al., J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (2001) med modifiseringer.

Monomert IgG kan binde til høy-affinitets-FcγRIa (CD64), mens lav-affinitetsreseptorene (FcγRIIa (CD32A), FcγRIIb (CD32B) og FcγRIIIa (CD16)) imidlertid krever multimerert IgG for signifikant binding. For lav-affinitetsreseptorbindingsanalysene ble derfor multimerer av pertuzumab dannet før analyse ved å blande hver prøve (200 mg/ml) med geit-anti-human kappakjede (400 mg/ml, ICN Biomedical, Irvine, CA9. Det humane FcγRI ble uttrykt som rekombinante fusjonsproteiner av det ekstracellulære domenet til reseptoralfakjedene med Gly/His6/GST (glysin/6-histidiner/glutathion-s-transferase). Anti-GST-belagte, bovint serumalbumin (BSA)-blokkerte analyserplater ble benyttet for å fange FcγR. Reseptorene (100 ml ved 0,25 mg/ml) ble tilsatt til platene og inkubert i 1 time. Serielle fortynninger av pertuzumab-prøver (100 ml) ble tilsatt som monomerer for FcγRIa og som multimerer for lav-affinitet-FcγRI, og platene ble inkubert i to timer. Det bundne pertuzumab ble påvist ved å tilsette pepperrotperoksidase-konjugert geit-anti-humant F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), og ved å benytte tMB som substrat. ED₅₀-verdier for binding av pertuzumab til FcγRI ble bestemt ved hjelp av ikke-lineær regresjonsanalyse med en fireparameter modell (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, PA). RITUXAN (lot C2B81298-2) ble benyttet som kontrollantistoffet.

EC₅₀-verdiene for binding av pertuzumab til FcγR er oppsummert i Tabell 7. Resultatene viser at referansematerialene, lot S9802A og 400 L skala prosessutvikling-materialene har sammenlignbare bindingsaffiniteter for FcγR. Disse resultatene antyder at glykanheterogeniteten i pertuzumab ikke har noen signifikant effekt på dets FcγR-bindingsaffiniteter.

Tabell 2A
N-terminal sekvensanalyse av pertuzumab
Referansemateriale (nmol av rest observert i hver syklus)

Residue	Syklus											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.02	0.04	0.04	0.05	0.05	0.07	0.08	0.08	0.10	0.11
ARG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
ASN	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.07
ASP	<u>0.48</u>	<u>0.08</u>	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.07	0.07	0.05	0.08	0.10
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	<u>0.02</u>	0.13	0.04	<u>0.08</u>	0.13	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08
GLU	<u>0.48</u>	0.05	0.13	0.03	0.03	0.01	0.12	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08
GLY	0.01	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.08	0.08	0.08	0.13	0.08
HIS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
ILE	0.00	<u>0.48</u>	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
LEU	0.00	0.03	0.04	0.43	0.11	0.08	0.09	0.11	0.12	0.13	<u>0.02</u>	0.25
LYS	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.12
MET	0.00	0.00	0.00	<u>0.53</u>	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
PHE	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.08
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	<u>0.32</u>	0.13	0.08	0.08	0.10
SER	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.07	<u>0.05</u>	0.16	<u>0.30</u>	<u>0.30</u>	0.18	<u>0.20</u>
THR	0.00	0.01	0.00	0.04	<u>0.33</u>	0.12	0.07	0.07	0.05	0.08	0.10	0.10
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
TYR	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.11	0.13
VAL	0.01	0.01	0.08	0.10	0.03	0.15	0.11	0.12	0.14	0.15	0.15	0.01
Lettkjede	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
Tungkjede	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Note: The percentage of phenylthiohydantoin amino acid residues observed in each cycle is given.

Bemerk: Nanomol med fenyltiohydantoin aminosyrerester som er observert i hver syklus er gitt. Rester fra den tunge kjeden er gitt i fete typer og rester fra den lette kjedene er understreket. Omtrent 0,5 nmol med protein ble påsatt, ekvivalent til 1,0 nmol med hver av de lette og tunge kjedene. Cystein (CYS) er ikke observert i sekvensanalysen.

Tabell 2B
N-terminal sekvensanlayse av pertuzumab
Lot S9802A (nmol av rest observert i hver syklus)

Residue	Syklus											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.05	0.08	0.08	0.11	0.12	0.14	0.14
ARG	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.04	0.05	0.05	0.07	0.08	0.09
ASP	<u>0.81</u>	0.12	0.04	0.05	0.05	0.05	0.07	0.08	0.08	0.10	0.11	0.13
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	<u>1.11</u>	0.22	0.08	<u>0.05</u>	0.19	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12
GLU	0.81	0.08	0.18	0.05	0.04	0.01	0.18	0.10	0.05	0.10	0.10	0.11
GLY	0.01	0.01	0.04	0.04	0.05	0.05	0.07	0.07	0.44	0.46	0.19	0.13
HIS	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
ILE	0.00	<u>0.55</u>	0.10	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
LEU	0.00	0.04	0.05	0.01	0.17	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	<u>0.75</u>	0.37
LYS	0.00	0.00	0.04	0.00	0.05	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.00	0.16
MET	0.00	0.00	0.01	<u>0.51</u>	0.12	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.07	0.05	0.08	0.08	0.10
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.05	0.05	0.05	<u>0.37</u>	0.18	0.12	0.12	0.13
SER	0.01	0.02	0.04	0.05	0.05	0.05	<u>0.83</u>	0.24	<u>0.36</u>	<u>0.41</u>	0.24	<u>0.25</u>
THR	0.00	0.01	0.00	0.05	<u>0.38</u>	0.17	0.10	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
TYR	0.16	0.07	0.05	0.05	0.07	0.08	0.10	0.10	0.12	0.13	0.14	0.16
VAL	0.02	0.00	0.13	0.12	0.02	0.22	0.15	0.16	0.18	0.20	0.21	0.02
Lettkjede	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
Tungkjede	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Bemerk: Nanomol med fenyltiohydantoin aminosyrerester observert i hver syklus er gitt. Rester fra den tunge kjeden er gitt i fet type og rester fra den lette kjeden er understreket. Omtrent 0,5 nmol med protein ble påsatt, ekvivalent med 1,0 nmol av

hver av de lette og tunge kjedene. Cystein (CYS) er ikke observert i sekvensanalysen.

Tabell 2C
N-terminal sekvensanalyse av pertuzumab
400 L skala kjøring-1 (nmol av rest observert i hver syklus)

Residue	Syklus											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.06	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.14
ARG	0.03	0.05	0.07	0.09	0.17	0.15	0.20	0.23	0.24	0.29	0.30	0.33
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09
ASP	0.09	0.08	0.05	0.11	0.08	0.09	0.11	0.15	0.14	0.16	0.18	0.19
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	1.17	0.11	0.05	0.02	0.12	0.08	0.14	0.12	0.11	0.12
GLU	0.09	0.05	0.19	0.04	0.04	0.03	0.15	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12
GLY	0.01	0.01	0.05	0.04	0.06	0.07	0.07	0.37	0.42	0.44	0.16	0.13
HIS	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03
ILE	0.00	0.00	0.03	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.06	0.08	0.05	0.09
LEU	0.00	0.04	0.05	0.04	0.15	0.12	0.13	0.15	0.16	0.16	0.78	0.31
LYS	0.00	0.00	0.04	0.05	0.08	0.09	0.10	0.12	0.14	0.15	0.17	0.19
MET	0.00	0.00	0.01	0.05	0.04	0.02	0.06	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.07	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11
PRO	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.41	0.14	0.11	0.13	0.14
SER	0.01	0.02	0.07	0.06	0.08	0.10	0.78	0.21	0.43	0.48	0.23	0.42
THR	0.00	0.01	0.00	0.06	0.57	0.19	0.12	0.16	0.18	0.17	0.18	0.18
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
TYR	0.00	0.02	0.04	0.06	0.07	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.15	0.17
VAL	0.04	0.06	0.10	0.13	0.02	0.15	0.15	0.17	0.19	0.21	0.22	0.02
Letkjede	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
Tungkjede	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL
VHS-letkjede	VAL	HIS	SER	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER

Bemerk: Nanomol med fenyltiohydantoinaminosyrerester observert i hver syklus er gitt. Rester fra den tunge kjeden er gitt i fet type og rester fra den lette kjeden er understreket. Rester fra den ytterligere VHS-lette kjedesequensen er vist i skrå skrift. Omtrent 0,5 nmol med protein ble påsatt, ekvivalent med 1,0 nmol med hver av de lette og tunge kjedene. Cystein (CYS) er ikke observert i sekvensanalysen.

Tabell 3
Kationebytter kromatografianalyse av nativt pertuzumab (% toppareal)

Prøve	Ionebyttervarianttopp					
	A	B	C	D	E	F
Referansemateriale	10	73	10	3	33	0,4
S9802A	20	68	5	2	4	0,2
400 L skala kjøring-1	16	65	5	2	10	0,9
400 L skala kjøring-2	15	67	5	2	9	0,6
400 L skala kjøring-3	15	67	6	2	10	0,6
400 L skala kjøring-5	15	67	5	2	9	0,5
400 L skala kjøring-6	13	63	9	3	9	0,6

Bemerk: 400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulum-kulturen på Dag 2.

Tabell 3B**Kationebytterkromatografianalyse av CPB-fordøyd pertuzumab (% toppareal)**

Prøve	Ionebyttervarianttopp					
	A	B	C	D	E	F
Referansematerial	11	78	4	ND	4	ND
S9802A	20	71	3	ND	4	ND
400 L skala kjøring-1	17	68	3	ND	10	ND
400 L skala kjøring-2	15	71	3	ND	9	ND
400 L skala kjøring 3	15	71	3	ND	10	ND
400 L skala kjøring 5	17	70	3	ND	9	ND
400 L skala kjøring 6	16	71	3	ND	9	ND

Bemerk: Fraksjoner A til F er definert i Figur 9B. Alle verdier er rundet av til to signifikante tall. Totaler i en hvilken som helst rekke blir ikke nødvendigvis 100 % til sammen på grunn av rounding. 400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulumkultur på Dag 2.

ND = ikke påvist eller kan ikke bli integrert.

Tabell 4

**Spesifikke aktiviteter for pertuzumab ved hjelp av en
Cellebasert anti-proliferasjonsanalyse**

Materiale	Spesifikk aktivitet	%CV
Referansematerial	100 ^a	-----
S9802A	98 ^b	10
400 L skala kjøring-1	96 ^c	18
400 L skala kjøring-2	90 ^c	11
400 L skala kjøring 3	96 ^c	17
400 L skala kjøring 5	96 ^c	3
400 L skala kjøring 6	95 ^c	3

Bemerk: 400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulumkultur på Dag 2.

^a Ved definisjon, spesifikk aktivitet av referansematerialet er 100 %

^b Verdi rapportert for Lot S9802A.

^c Verdi representerer gjennomsnitt av tre analyser.

Tabell 5**Fordeling av oligosakkaridstrukturer i pertuzumab bestemt ved hjelp av CE**

Prøve	%G0-F	%G-1	%Man5	%G0	%Man6 +%G1-1	%G1 ^a	%G2
Referansematerial	1	4	1	71	2	19	2
S9802A	1	4	1	62	2	27	3
400 L skala kjøring-1	2	6	1	73	3	15	2
400 L skala kjøring-2	1	6	1	77	2	13	1
400 L skala kjøring 3	2	6	1	74	4	14	1
400 L skala kjøring 5	1	5	1	71	2	18	1
400 L skala kjøring 6	1	5	1	71	3	18	1

Bemerk: 400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulum-kulturen på Dag 2.

^a Sum av de to G1-isomerene

Tabell 6**Relative bindingsaffiniteter for pertuzumab for FcRn**

Prøve	Relativ bindingsaffinitet ^a	
	NeutrAvidin beleggingsformat	Her2ECD beleggingsformat
Referansematerial	1,00	1,00
S9802A	1,34	1,30
400 L skala kjøring-1	1,04	1,22
400 L skala kjøring-2	1,09	1,31
400 L skala kjøring 3	1,14	1,42
400 L skala kjøring 5	1,22	1,36
400 L skala kjøring 6	1,06	1,29

Bemerk: 400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulum-kulturen på Dag 2.

^a Absorbansen på midtpunktet av titeringskurven (mid-OD) for standard (dvs. referansematerialet) og de tilsvarende konsentrasjonene for standard og prøver på denne mid-OD ble bestemt. Den relative bindingsaffiniteten ble fremskaffet ved å dele mid-OD-konsentrasjonen for standard med den for prøven.

Tabell 7

EC₅₀-verdier for binding av pertuzumab til Fc-gammareseptorer

Prøve	EC ₅₀ (µg/ml)									
	FcγRIa		FcγRIIa		FcγRIIb		FcγRIIIa (F158)		FcγRIIIa (V158)	
	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD	Snitt	SD
Referansematerial	0,0081	0,0014	5,8	1,8	57	17	14,0	1,4	1,8	0,1
S9802A	0,0078	0,0020	5,4	1,9	45	17	7,8	0,3	1,1	0,1
400 L skala kjøring-1	0,0079	0,0013	5,4	1,5	70	25	8,4	0,9	1,2	0,1
400 L skala kjøring-2	0,0074	0,0016	5,8	1,6	54	18	10,4	0,7	1,4	0,2
400 L skala kjøring 3	0,0075	0,0015	5,5	1,1	54	10	8,2	0,9	1,2	0,1
400 L skala kjøring 5	0,0076	0,0011	6,1	2,7	50	12	10,9	1,5	1,4	0,2
400 L skala kjøring 6	0,0080	0,0005	6,2	1,9	44	1	10,3	0,9	1,4	0,2

Bemerk: Gjennomsnittet av standardavvikene (SD) ble fremskaffet fra flere kjøringar av analysen (N=4).

FcγRIIIa-reseptor har to versjoner: F158 og V158.

400 L kjøring-4 er ikke tilgjengelig på grunn av kontaminering av 100 L inokulumkulturen på Dag 2.

P a t e n t k r a v

1. Sammensetning, som omfatter

(a) et hovedtype-HER2-antistoff som binder til domene-II på HER2, og omfatter en
5 varaibel lett aminosyresekvens ifølge SEKV ID Nr. 3 og en varaibel tung aminosyresekvens
ifølge SEKV ID Nr. 4; og

(b) en antistoffvariant som omfatter hovedtype-HER2-antistoffet og en amino-
terminal lederforlengelse som omfatter VHS- på en lett kjede av antistoffvarianten,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t f r a 5 % til 15 % av antistoffmolekylene i sammen-
10 setningen omfatter den amino-terminal lederforlengelsen, som kvantitert med kationebytter
analyse.

2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor den aminoterminal lederforlengelsen foreligger
på to lette kjeder i antistoffvarianten.

3. Sammensetning ifølge krav 1 eller 2, hvor hovedtype-HER-antistoffet og
antistoffvarianten begge er intakte antistoffer.

4. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor
20 hovedtype-HER2-antistoffet omfatter lett kjede- og tung kjede aminosyresekvensene i
henholdsvis SEKV ID Nr.15 og 16.

5. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den
aminoterminal lederforlengelsen består av VHS-.

6. Sammensetning ifølge krav 4, som ytterligere omfatter en andre variant av
hovedtype-HER2-antistoffet, hvor den andre varianten av hovedtype-HER2-antistoffet er
valgt fra gruppen som består av:

(i) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en C-terminal lysinrest på to tunge
30 kjeder derav,

(ii) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en deamidertAsn-386 og/eller Asn-
391 på en eller to tunge kjeder derav, og

(iii) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en oksiderte metioninrest ved Met-
254 i SEKV ID Nr. 16.

7. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som ytterligere
omfatter en glykosyleringsvariant av hovedtype-HER2-antistoffet, hvor
glykosyleringsvarianten er valgt fra gruppen som består av

(i) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en G1- eller G2-oligosakkaridstruktur bundet til en Fc-region derav,

(ii) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en karbohydratenhet bundet til en lett kjede derav,

5 (ii) hovedtype-HER2-antistoffet som omfatter en ikke-glykosylert tung kjede; og

(iv) hovedtype-HER2-antistoffet med en sialidert oligosakkaridstruktur bundet til en Fc-region derav.

8. Sammensetning følge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor hovedtype-
10 HER2-antistoffet binder til overgangen mellom domene-I, -II og -III i HER2.

9. Antistoff,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter

(a) en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV ID Nr.23, eller en
15 deamidert og/eller oksidert variant derav; og

(b) en tung kjede som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV ID Nr. 16, SEKV ID Nr. 124, eller en deamidert og/eller oksidert variant derav.

10. Farmasøytisk formulering,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter sammensetningen ifølge i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, eller antistoffet i følge krav 9 i en farmasøytisk akseptabel bærer.

11. Farmasøytisk formulering ifølge krav 10, for anvendelse i en fremgangsmåte for
25 behandling av HER2-uttrykkende kreft hos en pasient, hvor den omfatter å administrere den farmasøytiske formuleringen til pasienten i en mengde som er effektiv til å behandle kreften.

12. Anvendelse av sammensetningen ifølge i følge et hvilket som helst av kravene 1 til
30 8, eller antistoffet i følge krav 9 til fremstilling av et medikament for behandling av HER2-uttrykkende kreft.

Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.
 KAO, YUNG-HSIANG
 VANDERLAAN, MARTIN

<120> HER2 ANTIBODY COMPOSITION

<130> P2105R1 PCT

<140> PCT/US2005/025084

<141> 2005-07-15

<150> US 60/590,202

<151> 2004-07-22

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

```

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

```


Ser Arg Ile Val Tyr₈₀ Met Glu Leu Arg Ser₈₅ Leu Thr Phe Glu Asp₉₀

Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys Ala Arg Asn Leu₁₀₀ Gly Pro Ser Phe Tyr₁₀₅

Phe Asp Tyr Trp Gly₁₁₀ Gln Gly Thr Thr Leu₁₁₅ Thr Val Ser Ser

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 3

Asp₁ Ile Gln Met Thr₅ Gln Ser Pro Ser Ser₁₀ Leu Ser Ala Ser Val₁₅

Gly Asp Arg Val Thr₂₀ Ile Thr Cys Lys Ala₂₅ Ser Gln Asp Val Ser₃₀

Ile Gly Val Ala Trp₃₅ Tyr Gln Gln Lys Pro₄₀ Gly Lys Ala Pro Lys₄₅

Leu Leu Ile Tyr Ser₅₀ Ala Ser Tyr Arg Tyr₅₅ Thr Gly Val Pro Ser₆₀

Arg Phe Ser Gly Ser₆₅ Gly Ser Gly Thr Asp₇₀ Phe Thr Leu Thr Ile₇₅

Ser Ser Leu Gln Pro₈₀ Glu Asp Phe Ala Thr₈₅ Tyr Tyr Cys Gln Gln₉₀

Tyr Tyr Ile Tyr Pro₉₅ Tyr Thr Phe Gly Gln₁₀₀ Gly Thr Lys Val Glu₁₀₅

Ile Lys

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅

Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Thr Phe Thr₃₀

Asp Tyr Thr Met Asp₃₅ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu₄₅

Glu Trp Val Ala Asp₅₀ Val Asn Pro Asn Ser₅₅ Gly Gly Ser Ile Tyr₆₀

Asn Gln Arg Phe Lys₆₅ Gly Arg Phe Thr Leu₇₀ Ser Val Asp Arg Ser₇₅

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

	80		85		90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			95		Ala
				Arg	Asn
				Leu	Gly
				100	Pro
					Ser
					Phe
					105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				110	Gly
					Thr
					Leu
					115
					Val
					Thr
					Val
					Ser
					Ser

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 5	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
	1				5					10					15
	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
					20					25					30
	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
					35					40					45
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
					50					55					60
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
					65					70					75
	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					80					85					90
	Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
					95					100					105

Ile Lys

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 6	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
					20					25					30
	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
					35					40					45
	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr
					50					55					60
	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
					65					70					75
	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80					85					90

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

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

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<220>
 <221> xaa
 <222> 10
 <223> Xaa is preferrably D or S

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met xaa
 5 10

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 8
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 9
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 10
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is preferably R or L

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is preferably Y or E

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is preferably T or S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 13

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 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> 14
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 95 100 105
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp 215	Lys Lys Val Glu Pro 220	Lys Ser Cys Asp Lys 225
Thr His Thr Cys Pro 230	Pro Cys Pro Ala Pro 235	Glu Leu Leu Gly Gly 240
Pro Ser Val Phe Leu 245	Phe Pro Pro Lys Pro 250	Lys Asp Thr Leu Met 255
Ile Ser Arg Thr Pro 260	Glu Val Thr Cys Val 265	Val Val Val Asp Val Ser 270
His Glu Asp Pro Glu 275	Val Lys Phe Asn Trp 280	Tyr Val Asp Gly Val 285
Glu Val His Asn Ala 290	Lys Thr Lys Pro Arg 295	Glu Glu Gln Tyr Asn 300
Ser Thr Tyr Arg Val 305	Val Val Ser Val Leu Thr 310	Val Leu His Gln Asp 315
Trp Leu Asn Gly Lys 320	Glu Tyr Lys Cys Lys 325	Val Ser Asn Lys Ala 330
Leu Pro Ala Pro Ile 335	Glu Lys Thr Ile Ser 340	Lys Ala Lys Gly Gln 345
Pro Arg Glu Pro Gln 350	Val Tyr Thr Leu Pro 355	Pro Ser Arg Glu Glu 360
Met Thr Lys Asn Gln 365	Val Ser Leu Thr Cys 370	Leu Val Lys Gly Phe 375
Tyr Pro Ser Asp Ile 380	Ala Val Glu Trp Glu 385	Ser Asn Gly Gln Pro 390
Glu Asn Asn Tyr Lys 395	Thr Thr Pro Pro Val 400	Leu Asp Ser Asp Gly 405
Ser Phe Phe Leu Tyr 410	Ser Lys Leu Thr Val 415	Asp Lys Ser Arg Trp 420
Gln Gln Gly Asn Val 425	Phe Ser Cys Ser Val 430	Met His Glu Ala Leu 435
His Asn His Tyr Thr 440	Gln Lys Ser Leu Ser 445	Leu Ser Pro Gly

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 15

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 16
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120

Ser Thr Lys Gly	Pro 125	Ser Val Phe Pro	Leu 130	Ala Pro Ser Ser	Lys 135
Ser Thr Ser Gly	Gly 140	Thr Ala Ala Leu	Gly 145	Cys Leu Val Lys	Asp 150
Tyr Phe Pro Glu	Pro 155	Val Thr Val Ser	Trp 160	Asn Ser Gly Ala	Leu 165
Thr Ser Gly Val	His 170	Thr Phe Pro Ala	Val 175	Leu Gln Ser Ser	Gly 180
Leu Tyr Ser Leu	Ser 185	Ser Val Val Thr	Val 190	Pro Ser Ser Ser	Leu 195
Gly Thr Gln Thr	Tyr 200	Ile Cys Asn Val	Asn 205	His Lys Pro Ser	Asn 210
Thr Lys Val Asp	Lys 215	Lys Val Glu Pro	Lys 220	Ser Cys Asp Lys	Thr 225
His Thr Cys Pro	Pro 230	Cys Pro Ala Pro	Glu 235	Leu Leu Gly Gly	Pro 240
Ser Val Phe Leu	Phe 245	Pro Pro Lys Pro	Lys 250	Asp Thr Leu Met	Ile 255
Ser Arg Thr Pro	Glu 260	Val Thr Cys Val	Val 265	Val Asp Val Ser	His 270
Glu Asp Pro Glu	Val 275	Lys Phe Asn Trp	Tyr 280	Val Asp Gly Val	Glu 285
Val His Asn Ala	Lys 290	Thr Lys Pro Arg	Glu 295	Glu Gln Tyr Asn	Ser 300
Thr Tyr Arg Val	Val 305	Ser Val Leu Thr	Val 310	Leu His Gln Asp	Trp 315
Leu Asn Gly Lys	Glu 320	Tyr Lys Cys Lys	Val 325	Ser Asn Lys Ala	Leu 330
Pro Ala Pro Ile	Glu 335	Lys Thr Ile Ser	Lys 340	Ala Lys Gly Gln	Pro 345
Arg Glu Pro Gln	Val 350	Tyr Thr Leu Pro	Pro 355	Ser Arg Glu Glu	Met 360
Thr Lys Asn Gln	Val 365	Ser Leu Thr Cys	Leu 370	Val Lys Gly Phe	Tyr 375
Pro Ser Asp Ile	Ala 380	Val Glu Trp Glu	Ser 385	Asn Gly Gln Pro	Glu 390
Asn Asn Tyr Lys	Thr 395	Thr Pro Pro Val	Leu 400	Asp Ser Asp Gly	Ser 405
Phe Phe Leu Tyr	Ser 410	Lys Leu Thr Val	Asp 415	Lys Ser Arg Trp	Gln 420
Gln Gly Asn Val	Phe 425	Ser Cys Ser Val	Met 430	His Glu Ala Leu	His 435
Asn His Tyr Thr	Gln 440	Lys Ser Leu Ser	Leu 445	Ser Pro Gly	

<210> 17

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 17
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 65 70 75
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 80 85 90
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 95 100 105
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 110 115 120
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 125 130 135
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 140 145 150
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 155 160 165
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 170 175 180
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 185 190 195
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 200 205 210
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 215 220 225
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 230

<210> 18
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 18
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45
 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly
 65 70 75
 Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser
 80 85 90
 Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 95 100 105
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly
 110 115 120
 Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 125 130 135
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 140 145 150
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 155 160 165
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 170 175 180
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 185 190 195
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 200 205 210
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 215 220 225
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 320 325 330
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 335 340 345
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 350 355 360

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 365 370 375
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 380 385 390
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 395 400 405
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 410 415 420
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 425 430 435
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 440 445 450
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 455 460 465

Pro Gly

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
 20 25 30
 Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
 35 40 45
 Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
 50 55 60
 Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
 65 70 75
 Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 80 85 90
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
 95 100 105
 Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 110 115 120
 Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
 125 130 135
 Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
 140 145 150
 Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
 155 160 165
 Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
 170 175 180
 Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
 12

185 190 195

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
 1 5 10 15
 Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
 20 25 30
 Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 35 40 45
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp
 50 55 60
 Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
 65 70 75
 Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 80 85 90
 Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
 95 100 105
 Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
 110 115 120
 Cys Ala Arg Val

<210> 21
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
 20 25 30
 Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
 35 40 45
 Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
 50 55 60
 Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 65 70 75
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
 80 85 90
 Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 95 100 105
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
 110 115 120
 Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 125 130 135

Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
140 145 150

Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
155 160 165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15
Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
20 25 30
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
35 40 45
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
50 55 60
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
65 70 75
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
80 85 90
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
95 100 105
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
110 115 120
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
125 130 135
Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
140

<210> 23
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized.

<400> 23
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
1 5 10 15
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
20 25 30
Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
50 55 60
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

<400>	24														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	
				20					25					30	
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	
				95					100					105	
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
				110					115					120	
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
				125					130					135	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	
										15					

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					

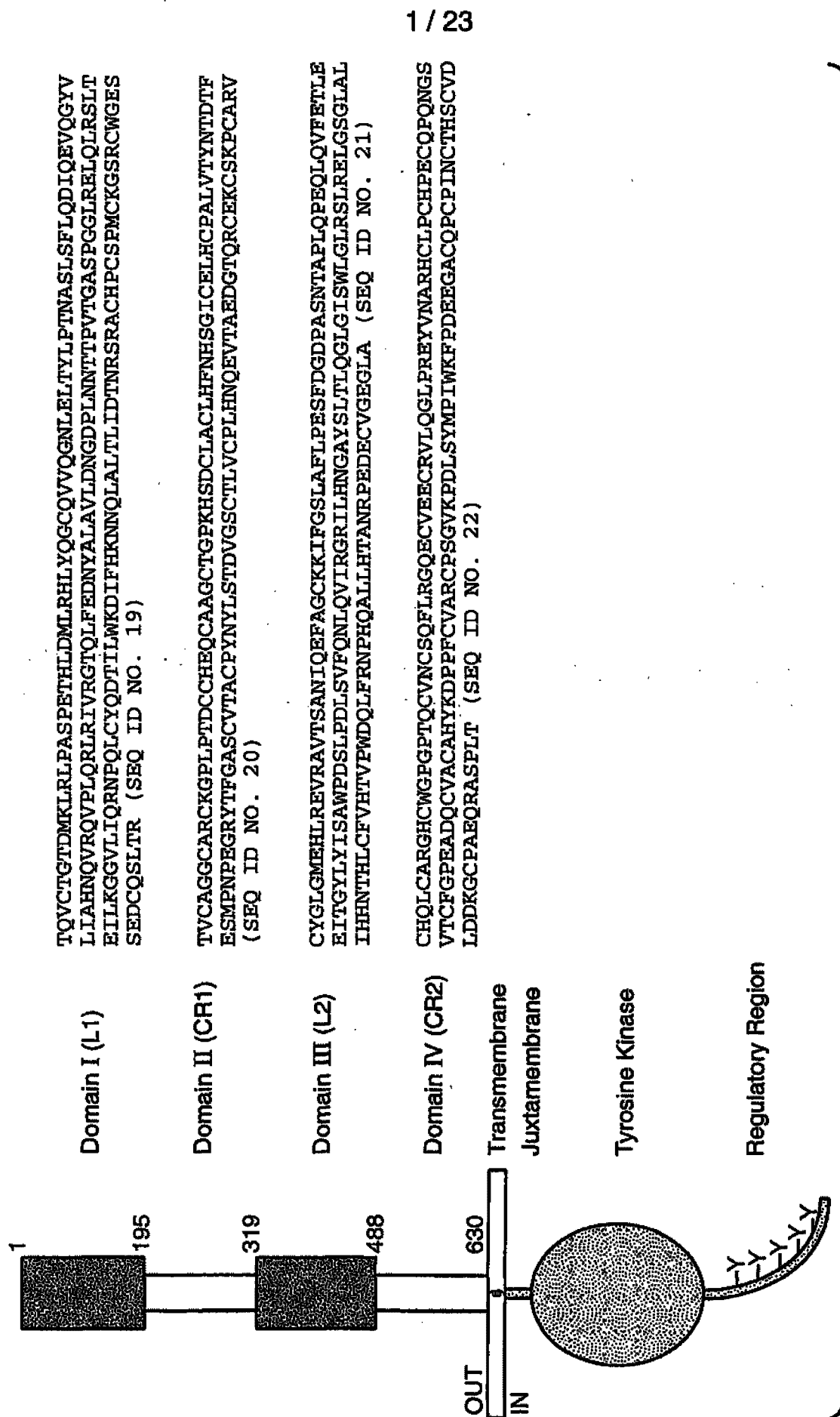


FIG. 1

2 / 23

VARIABLE LIGHT

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQORP	
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	

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

	90	100
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)
	* *	* *
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)
	*** *	
hum κI	EDFATYYC [QQYNLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)

FIG._2A

VARIABLE HEAVY

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

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

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)		
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)		

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)		

FIG._2B

3 / 23

Amino Acid Sequence for Pertuzumab Light Chain

1 10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG._3A**Amino Acid Sequence for Pertuzumab Heavy Chain**

1 10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGGSIY
 70 80 90 100 110 120
 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGOGTLVTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 LYSLSVSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG._3B

4/23

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
 46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F 90
 91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q Q T K V E I K R T V A A P S V F 135
 136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
 181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
 226 K S F N R G E C (SEQ ID NO. 17) 233

FIG._4A

5/23

1 MGWS C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P P E P V T V S W N 180
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
 271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18) 465

FIG. 4B

6 / 23

Ligand-activated EGFR Heterodimerizes with HER2 2C4 Binds at the Heterodimeric Binding Site

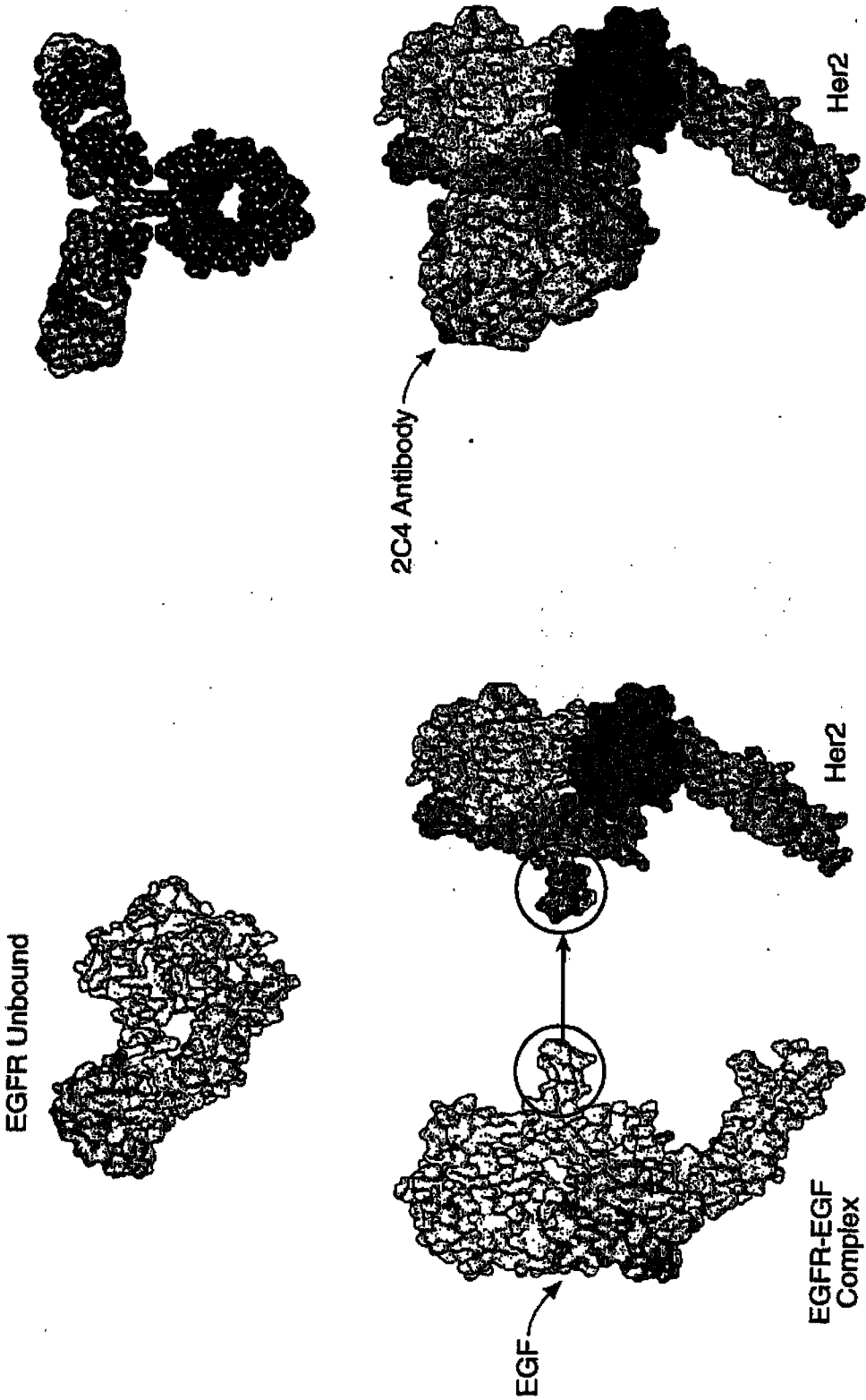


FIG._5

7 / 23

Coupling of HER2/3 to the MAPK and Akt Pathways

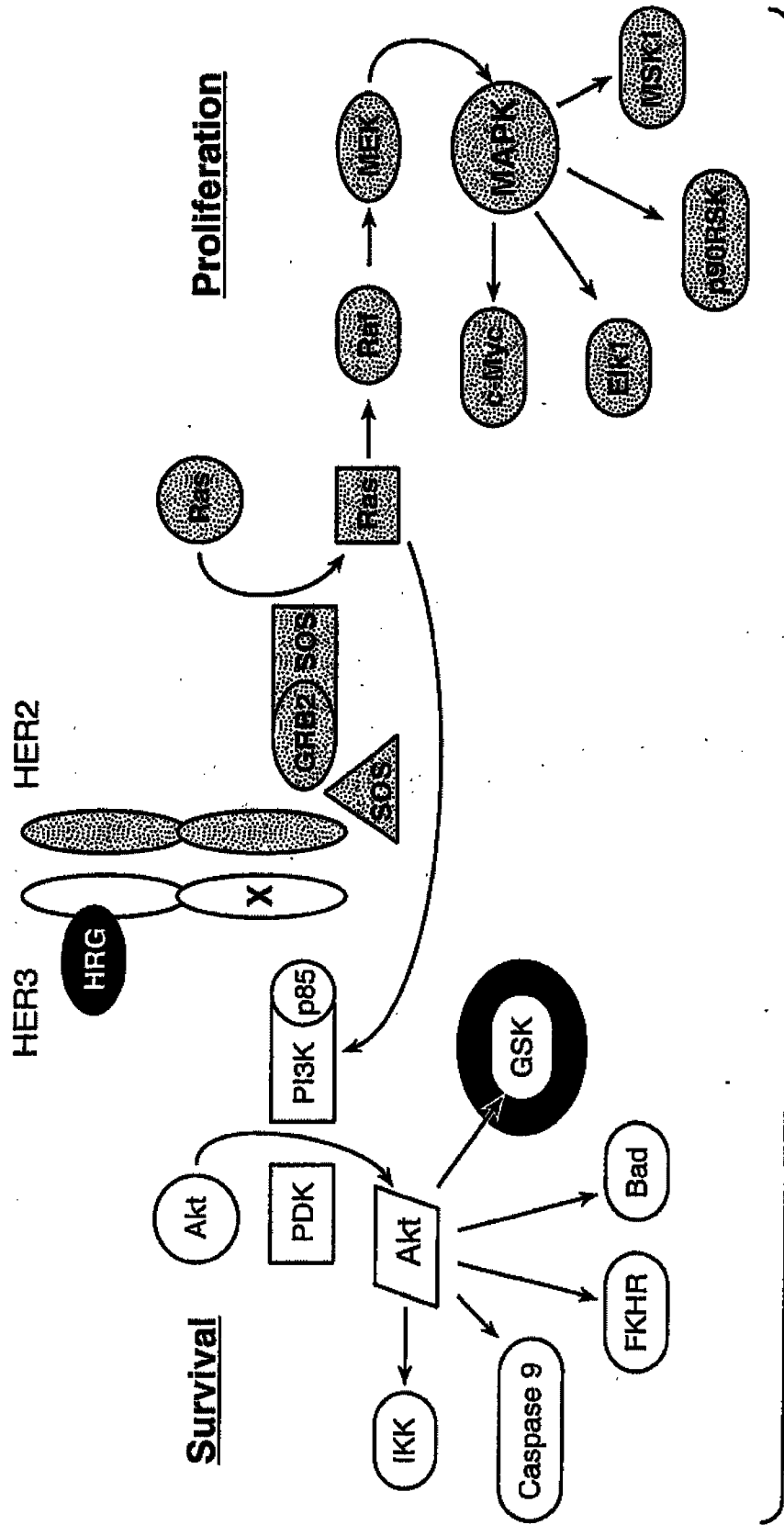
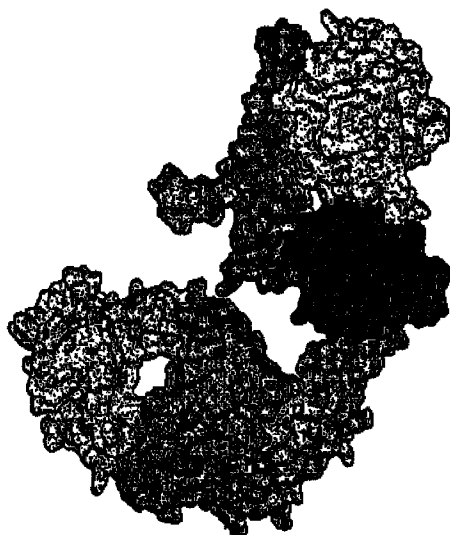


FIG. 6

8 / 23

**Trastuzumab
Herceptin**

- Binds in IV near JM.
- Protects against receptor shedding
- Moderately affects receptor down-modulation
- Slight effect on HER2's role as a coreceptor

**Pertuzumab
Omnitarg**

- Binds in II at dimerization interface
- Does not prevent receptor shedding
- Moderately affects receptor down-modulation
- Major effect on HER2's role as a coreceptor

FIG. 7

9/23

Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Light Chain

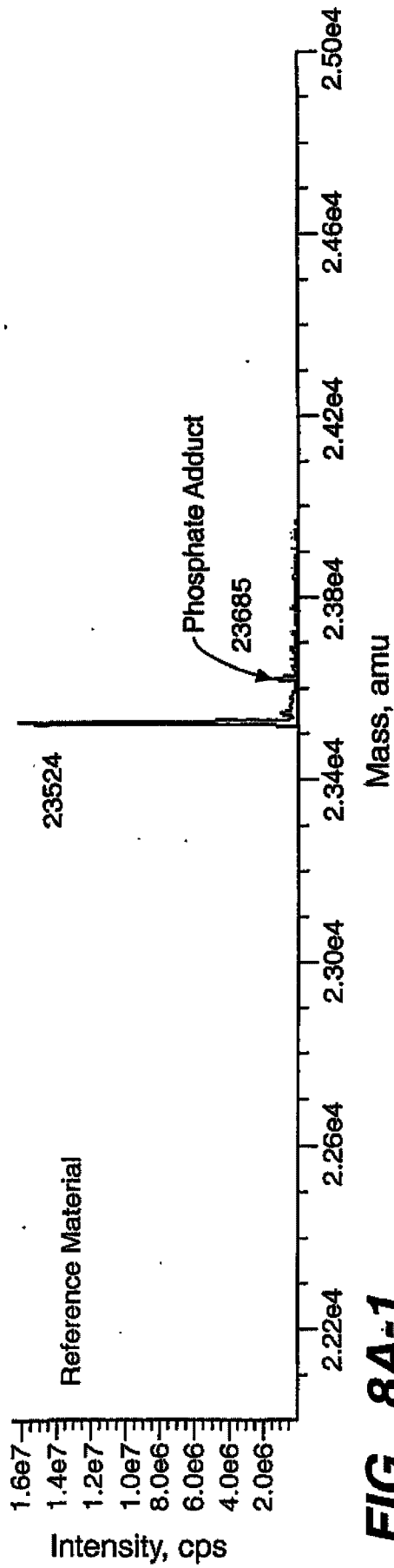


FIG.-8A-1

Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Light Chain

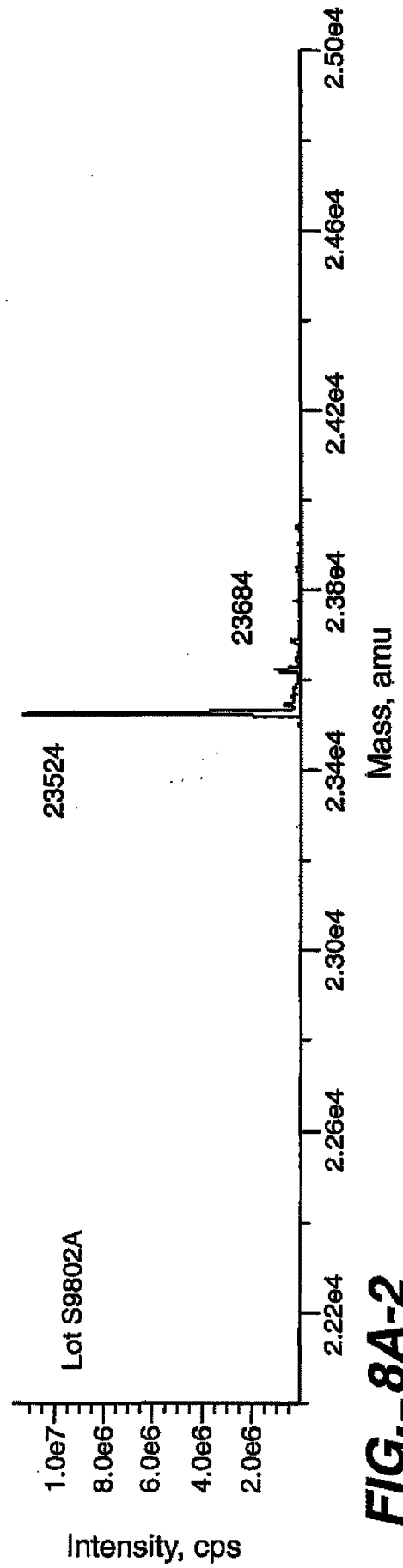


FIG.-8A-2

10 / 23

Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Light Chain

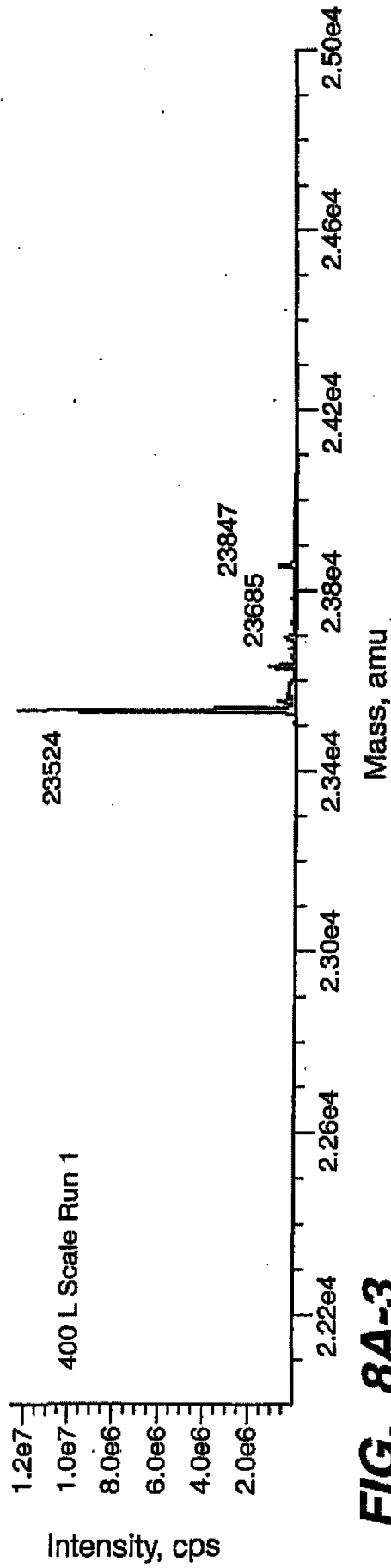


FIG. 8A-3

Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Heavy Chain

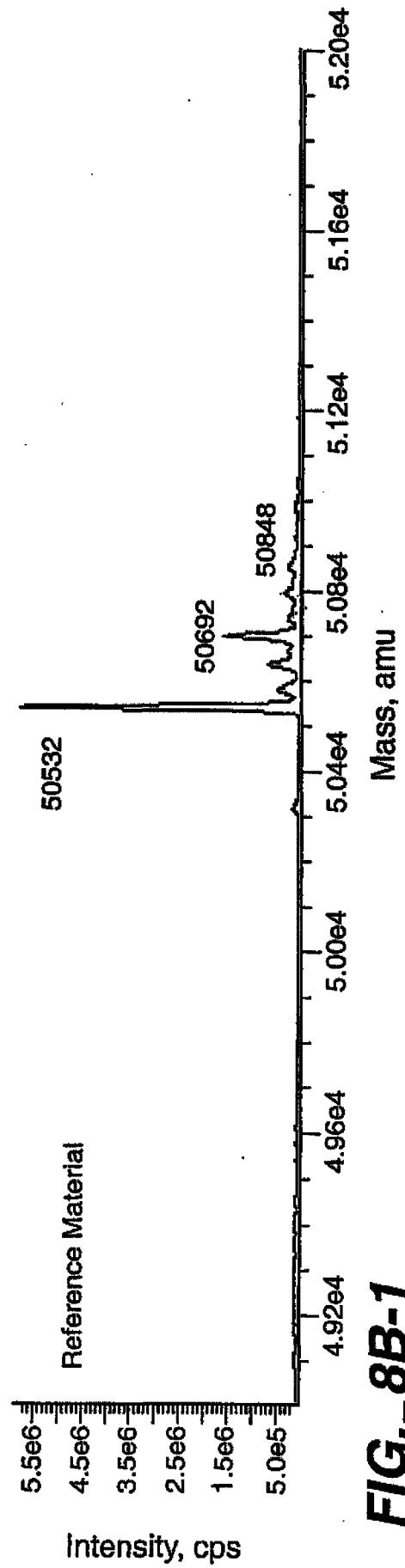
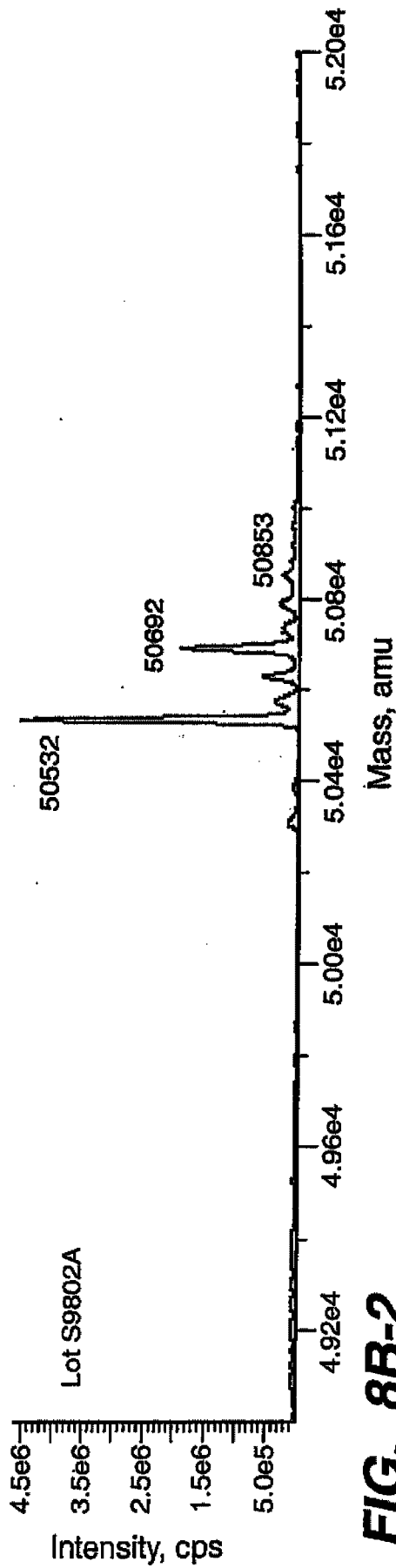


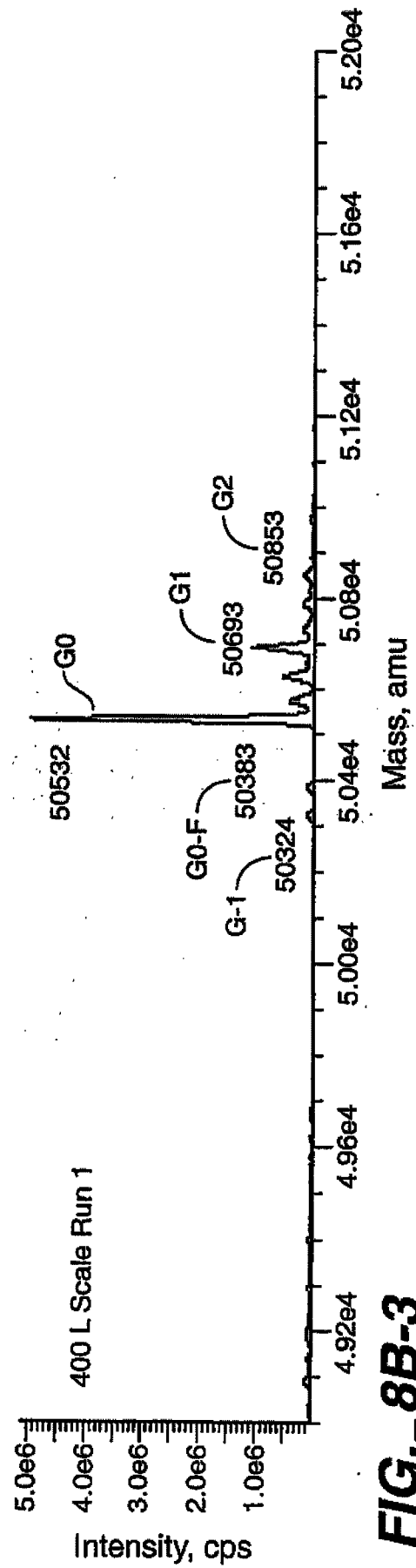
FIG. 8B-1

11 / 23

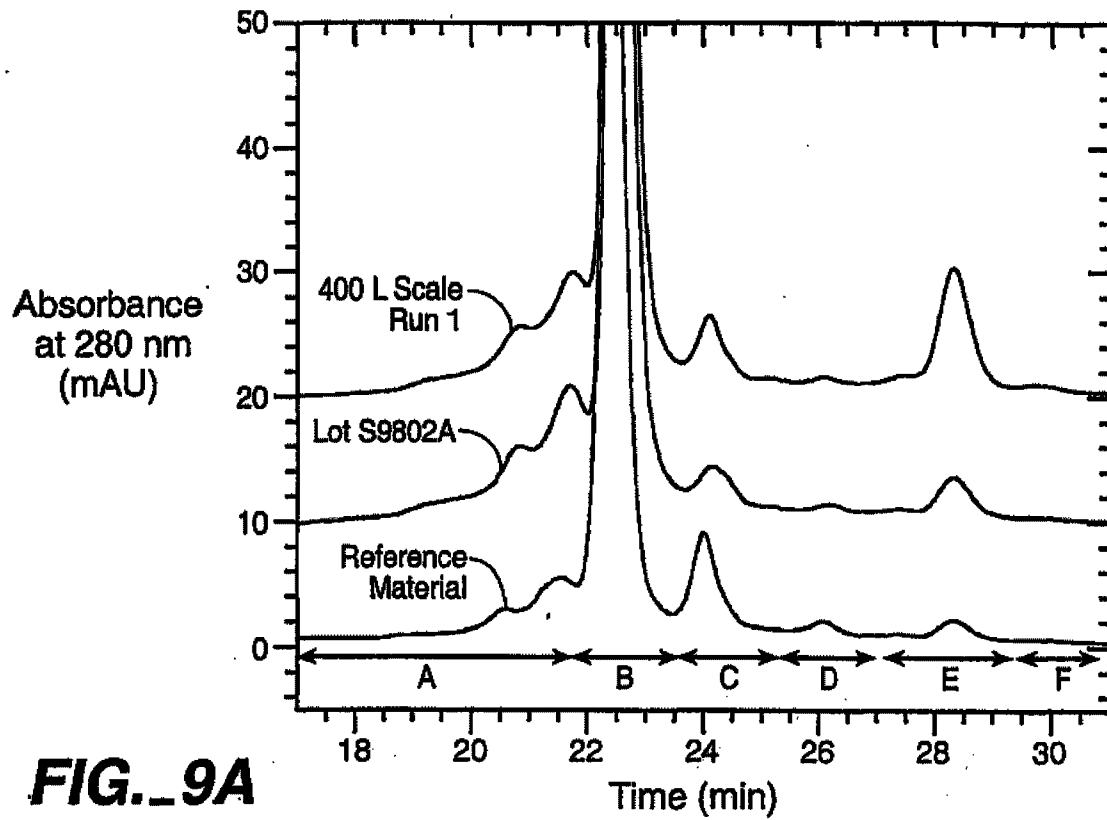
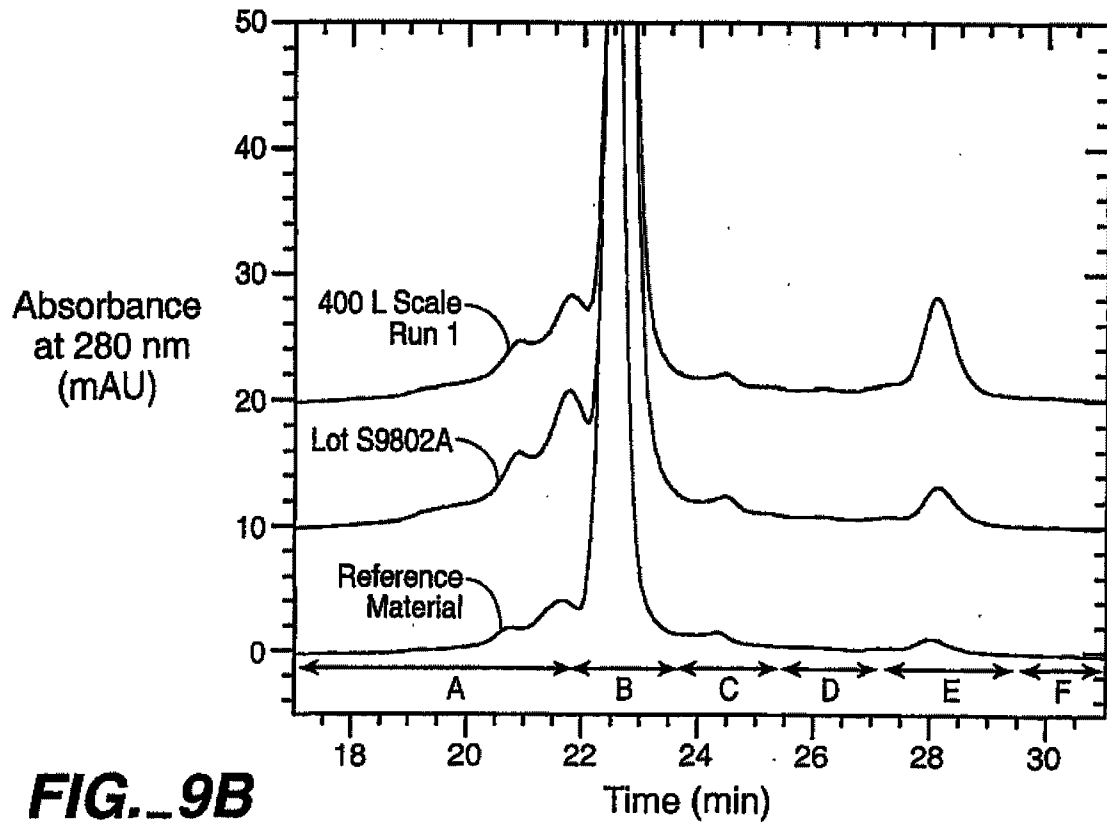
Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Heavy Chain



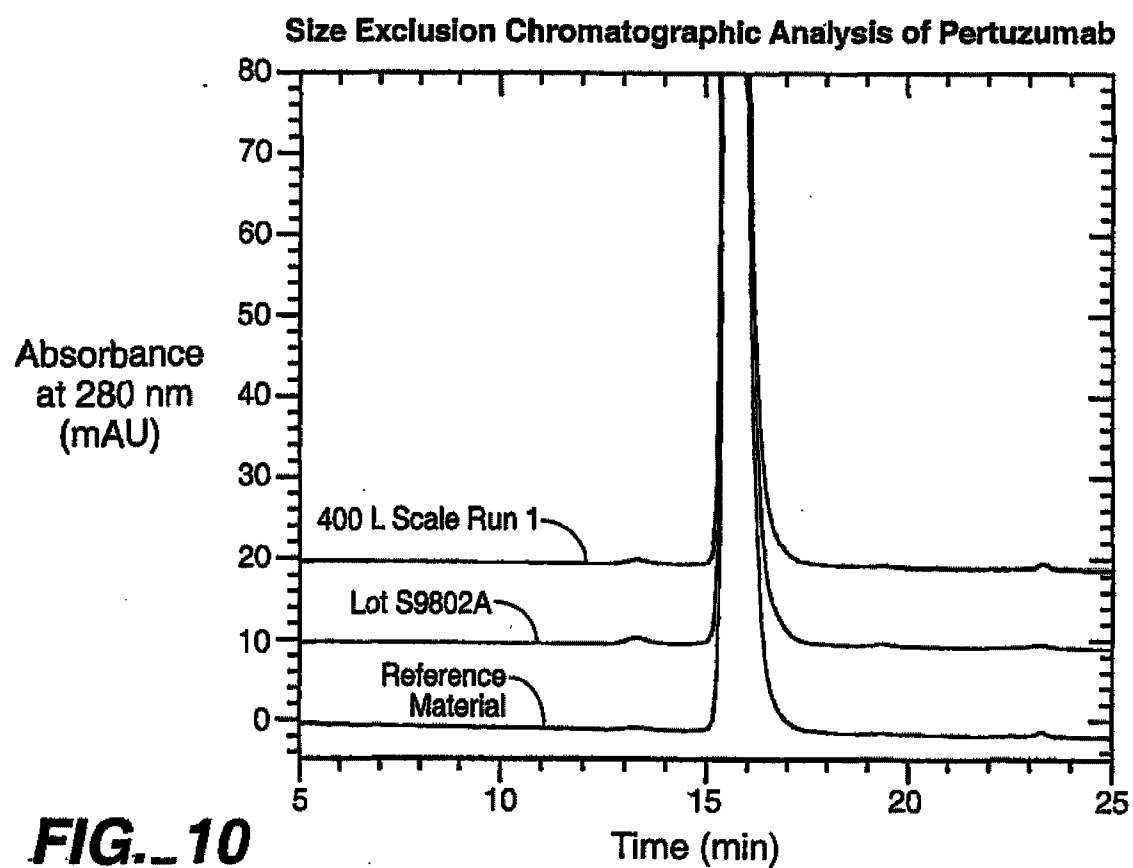
Reconstructed Mass Spectra of Reduced Pertuzumab: Heavy Chain



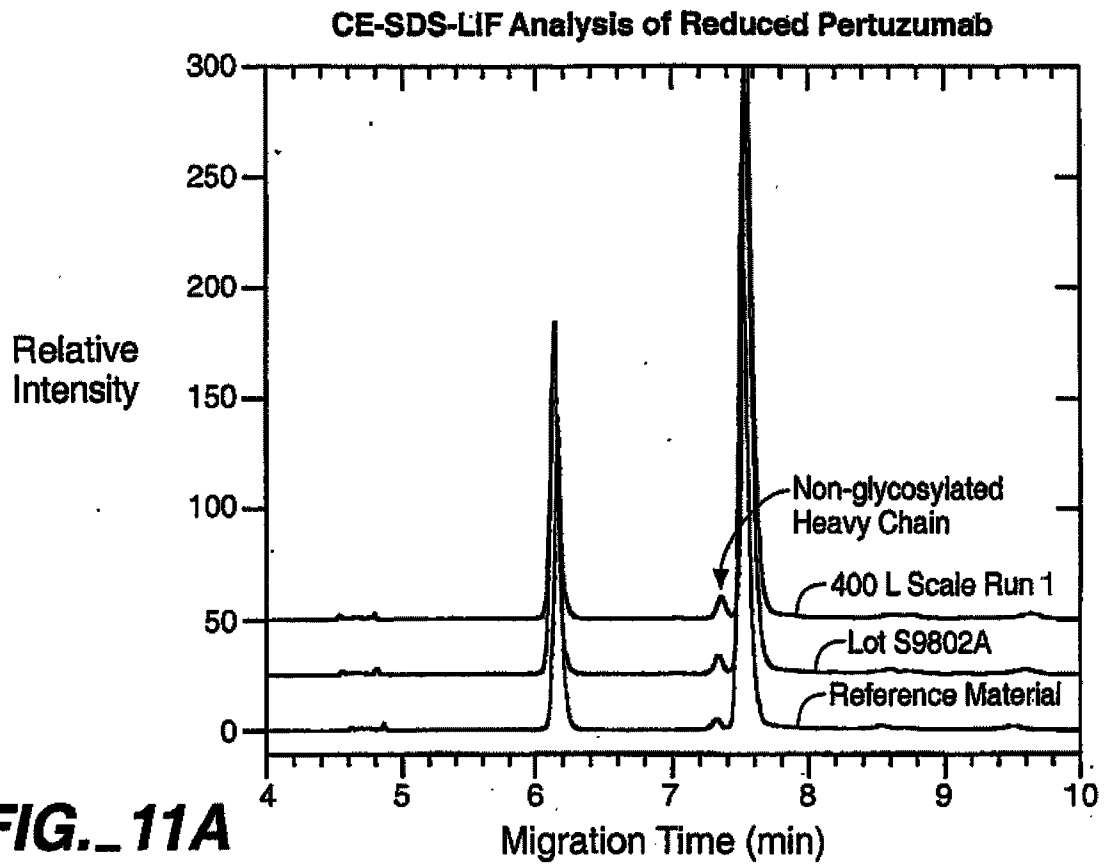
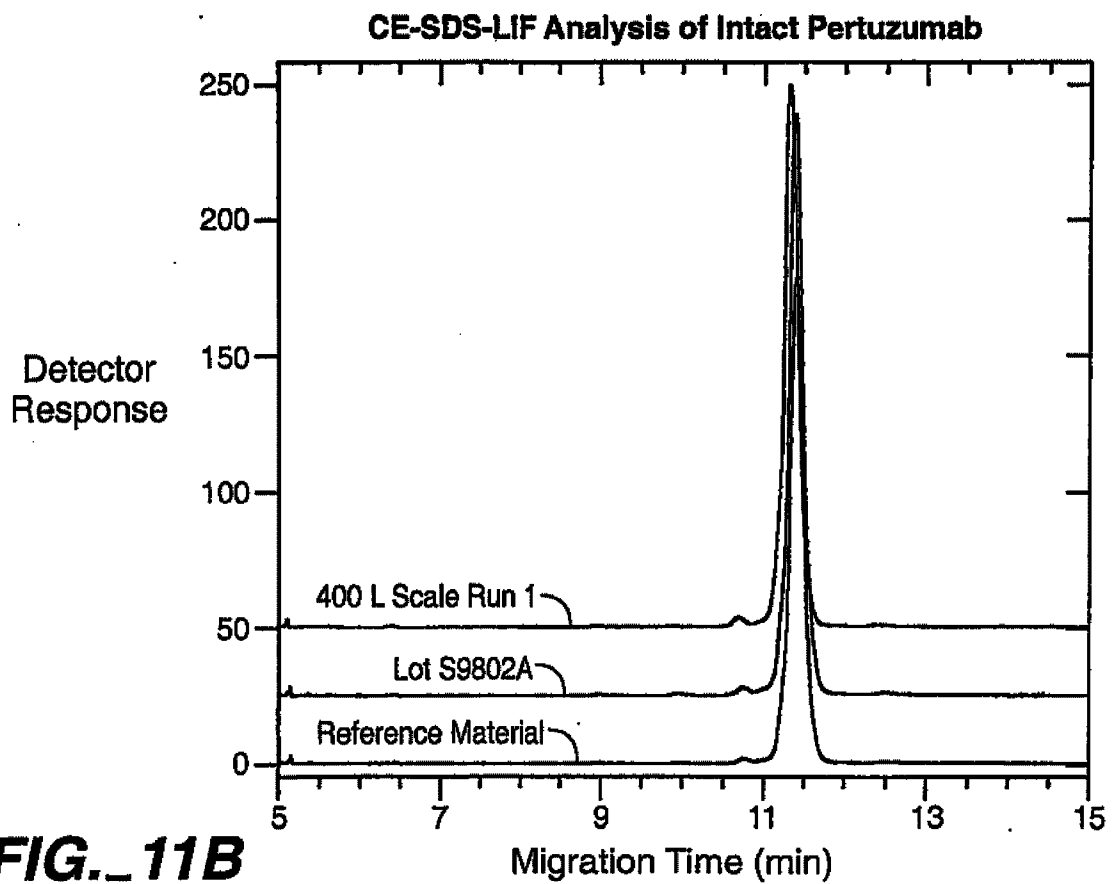
12 / 23

Cation Exchange Chromatography Analysis of Native Pertuzumab**FIG. 9A****Cation Exchange Chromatography Analysis of CPB-Digested Pertuzumab****FIG. 9B**

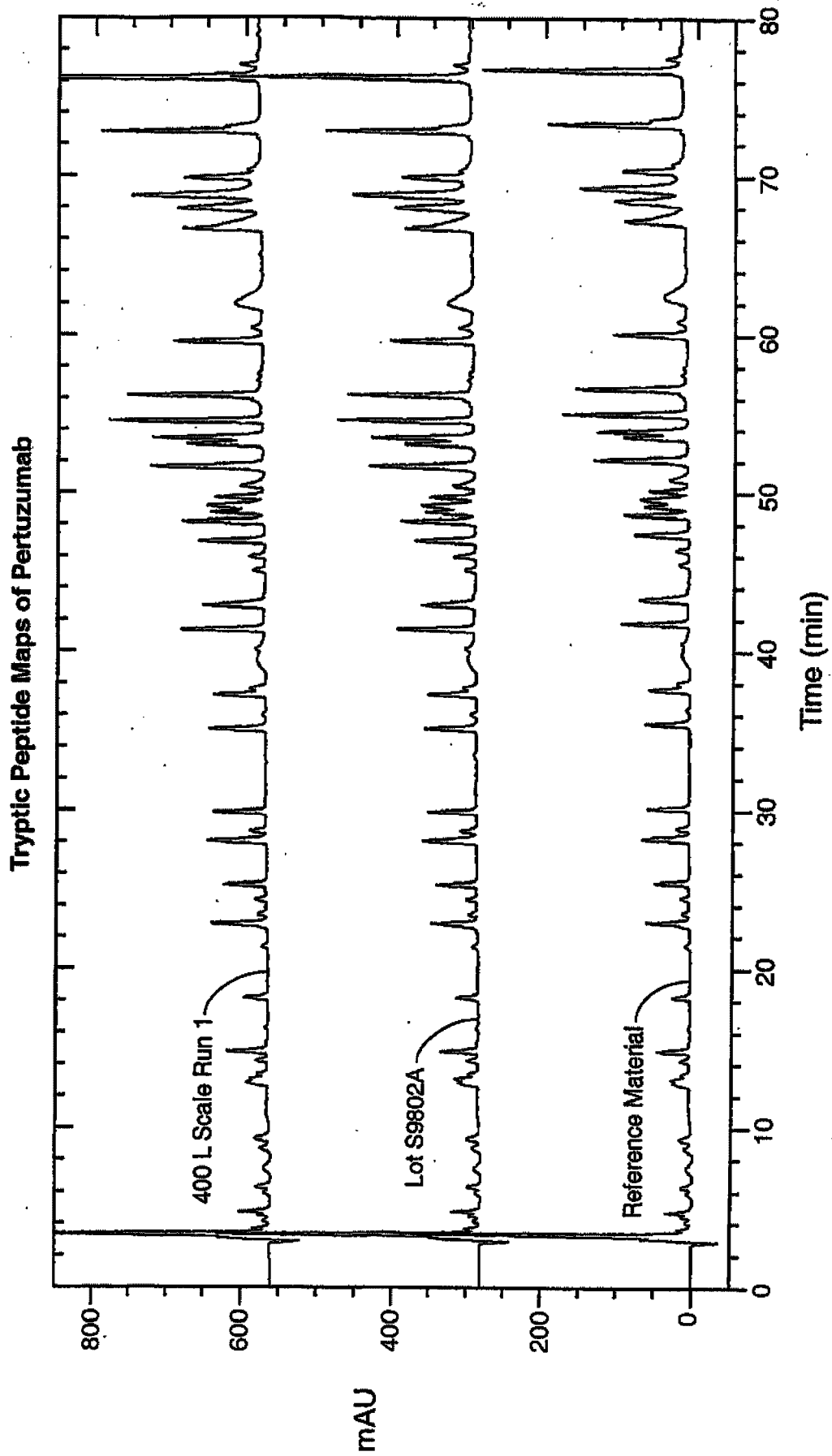
13 / 23



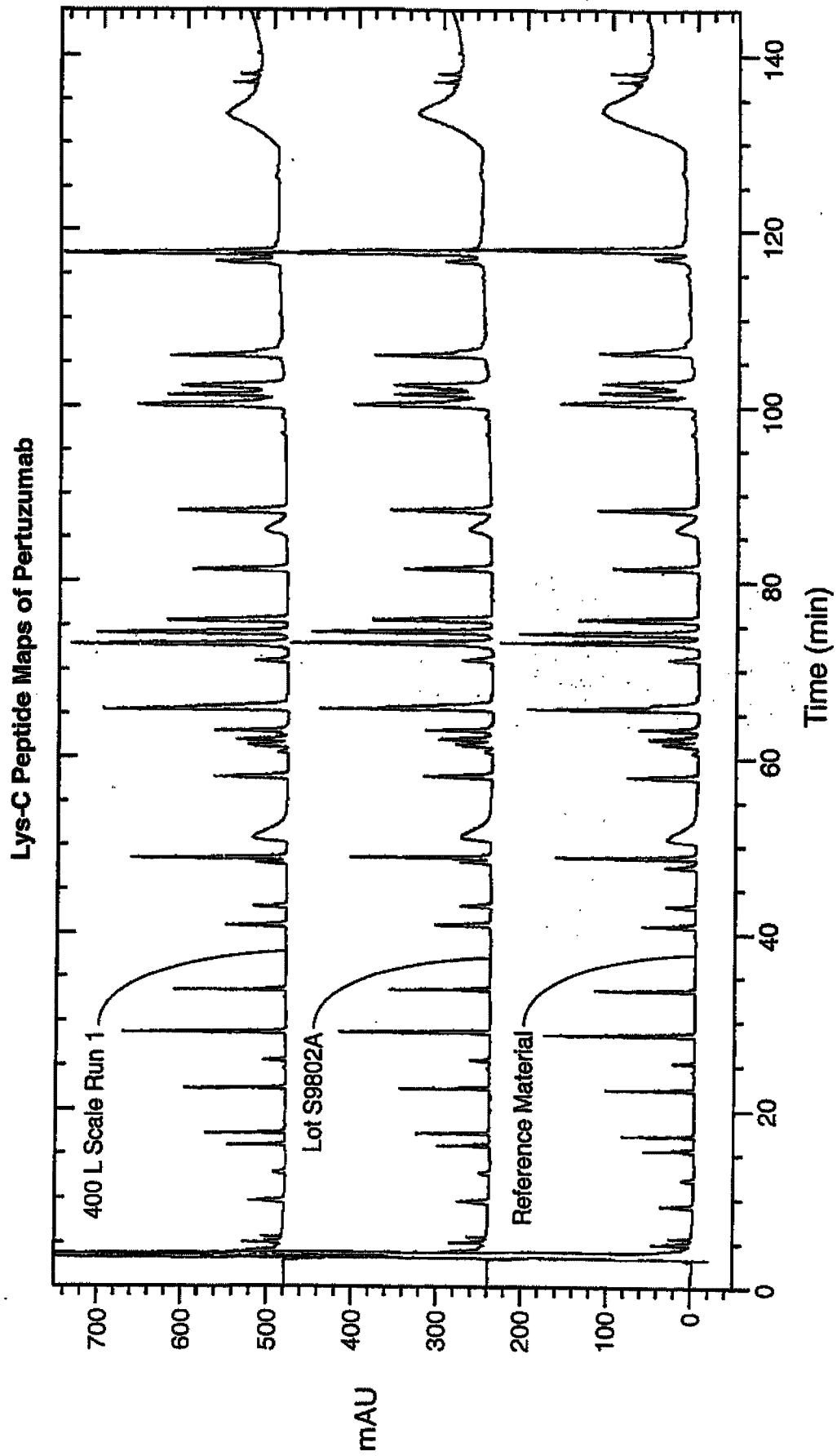
14 / 23

**FIG._11A****FIG._11B**

15 / 23

**FIG. 12A**

16 / 23

**FIG. 12B**

17 / 23

CE Analysis of N-linked Oligosaccharides Released from Pertuzumab

Overlaid Traces: Aligned

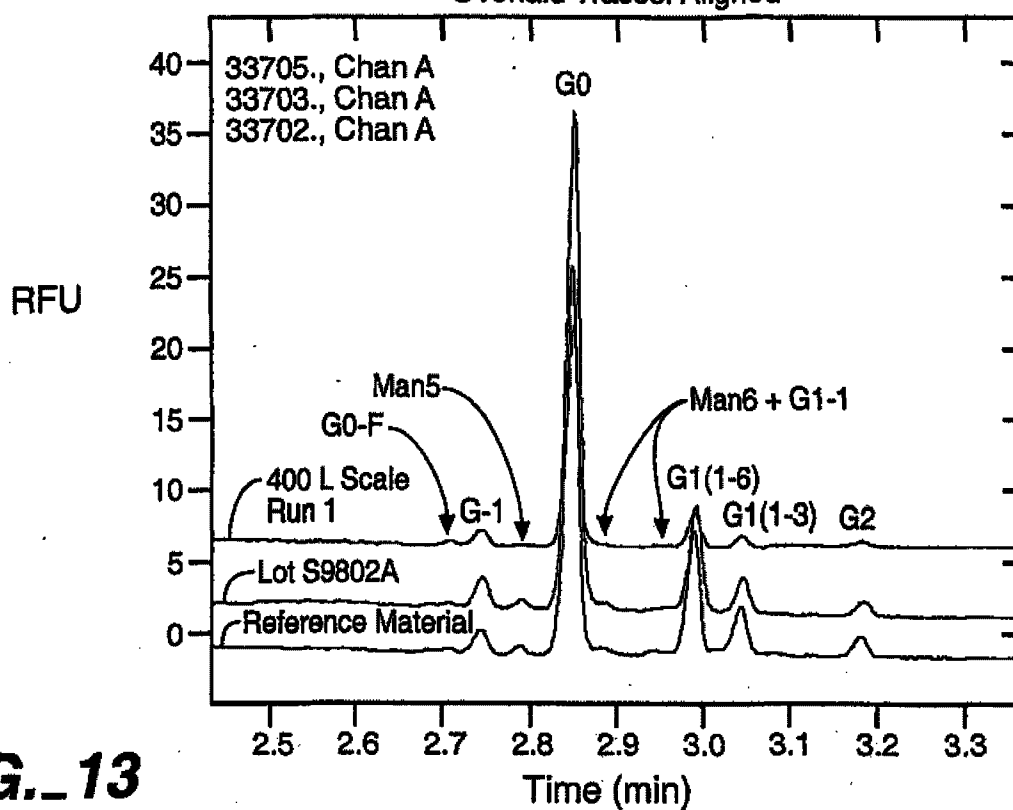
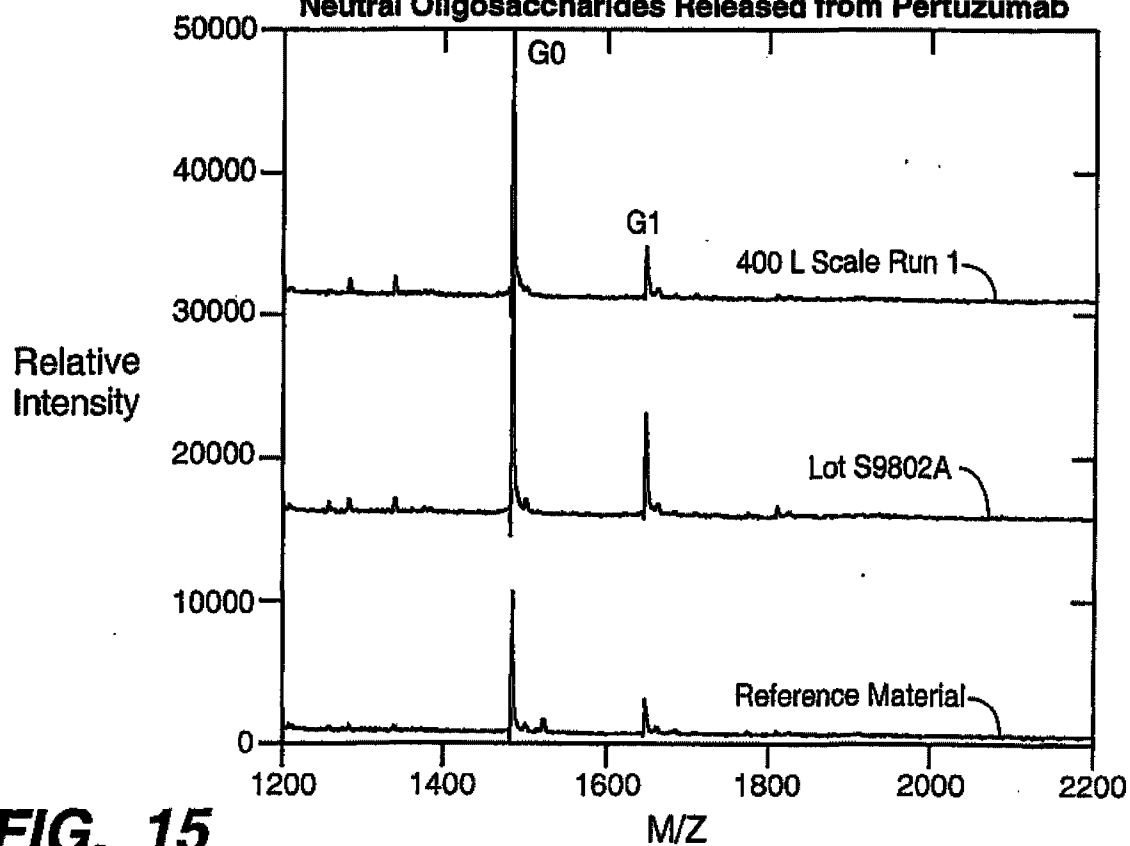
**FIG._13****Positive Mode MALDI-TOF Mass Spectra of Released Neutral Oligosaccharides Released from Pertuzumab****FIG._15**

FIG. 14A

Oligosaccharide Structures Commonly Observed In IgG Antibodies

<u>Structures</u>	<u>Abbreviation</u>	<u>Mass</u>
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ Fuca(1→6)	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man6	1398

Oligosaccharide Structures Commonly Observed In IgG Antibodies

<u>Structures</u>	<u>Abbreviation</u>	<u>Mass</u>
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-6)	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G2	1788

Masses shown in this figure correspond to the (M+Na)⁺ values.

FIG. 14B

LIGHT CHAIN

1 DIQMTQSPSSLASVGD¹⁵RVTTITCRASQDVNT³⁰AVAWYQQKPGKAPK⁴⁵
 46 LLISASFLYSGVPPSR⁶⁰FSGSRSGTDF⁷⁵TLTISSSLQPEDFATYYCQQ⁹⁰
 91 HYTTPPTFGQGT¹⁰⁵KKVEIKRTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASV¹³⁵CVCL
 136 LNNFYPREAKVQWKVDN¹⁵⁰ALQSGNSQESVTEQD¹⁶⁵SKDSTYSSLSTLT¹⁸⁰
 181 LSKADYEKKVYACEV¹⁹⁵THQG²¹⁰LSSSPVTKSFN²¹⁴RGEC

20/23

FIG.-16A

21/23

HEAVY CHAIN

1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	30	CAASGFNIKDTYIHWV	45	RQAPGKGL
46	EWVARIYPTNGYTRYADSV	60	KGRFTISADTSKNTAYL	75	QMNSLR
91	TAVYYCSRWG	105	DDGFYAMDYWG	120	QGTLVTVSSASTKGP
136	KSTSGGTAALGCLVKDYF	150	PEPVTVSN	165	SGALTS
181	GLYSLSSVVTVPSSSLG	195	TQTYICNVN	210	HKPSNTKVDKK
226	THTCPPCPAP	240	ELLGGP	255	SVFLFPKPKD
271	HEDPEVKFNWYVDGVE	285	VHNAKTKPRE	300	EQYNSTYRV
316	WLN	330	GKEYKCKVSNKALPAPI	345	EKTISKAKGQPR
361	MTKNQVSLTCLVKGFY	375	PSDIAVEWES	390	NGQPENN
406	SFFLYSKLTVDKSRW	420	QQGNVF	435	SCSVMH
					EALHNHYTQKSLSPG

FIG. 16B

22 / 23

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217 (SEQ ID NO. 23)

FIG.-17A

23 / 23

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDDWVRQAPGKGL 45
 46 EWVADVNPNSGGSIYNNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSSLRAED 90
 91 TAVYYCARNGLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSSVFFPLAPSSK 135
 136 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLQSSG 180
 181 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT 225
 226 HTCPCPAPPELGGPSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH 270
 271 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW 315
 316 LNKKEVKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPRPEPQVYTLPPSREEM 360
 361 TKNQVSSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSSDGS 405
 406 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSSCSVMHHEALHNHYTQKSSLSPGK 449

(SEQ ID NO. 24)

FIG. 17B