



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0085855

(43) 공개일자 2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2007-7012834

(22) 출원일자 2007년06월07일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년06월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/044247

(87) 국제공개번호 WO 2006/063042

국제출원일자 2005년12월06일

국제공개일자 2006년06월15일

(30) 우선권주장 60/633,941 2004년12월07일 미국(US)

(71) 출원인 제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 아믈러, 루카스, 씨.
미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 그레나다 레인 845
자누아리오, 토마스, 이.
미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 아파트먼트 14 클라라스트리트
221

(74) 대리인 김영
양영준

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) HER 억제제를 이용한 치료를 위한 환자 선택 방법

(57) 요약

유전자 발현 분석에 기초하여, 페르투주마브와 같은 HER 억제제를 이용한 치료법을 위한 환자를 선택하는 방법이 설명되어 있다. 유전자 발현 분석을 통해, 생물학적 샘플에서 HER 인산화 또는 활성화를 평가하는 방법 또한 설명되어 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

암을 치료하기에 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 2 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드를 발현하는 것인, 암의 치료 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, HER 수용체가 EGFR, HER2, 및 HER3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 치료 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, HER 수용체가 EGFR 및 HER2인 치료 방법.

청구항 4.

제2항에 있어서, HER 수용체가 HER2 및 HER3인 치료 방법.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, HER 리간드가 베타셀룰린, 암피레굴린, 에피레굴린, 및 TGF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 치료 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, HER 리간드가 베타셀룰린인 치료 방법.

청구항 7.

제5항에 있어서, HER 리간드가 암피레굴린인 치료 방법.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 샘플이 베타셀룰린 또는 암피레굴린 뿐 아니라 HER2 및 EGFR 또는 HER3을 발현하는 것인 치료 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 종양 샘플이 베타셀룰린 뿐 아니라 HER2 및 EGFR을 발현하는 것인 치료 방법.

청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, HER 억제제가 HER 이량체화 억제제인 치료 방법.

청구항 11.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, HER 억제제가 HER 항체인 치료 방법.

청구항 12.

제11항에 있어서, HER 항체가 HER2 항체인 치료 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, HER2 항체가 HER2 세포의 도메인의 도메인 II에 결합하는 것인 치료 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, HER2 항체가 페르투주마브인 치료 방법.

청구항 15.

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, HER 항체가 네이키드(naked) 항체인 치료 방법.

청구항 16.

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, HER 항체가 무손상 항체인 치료 방법.

청구항 17.

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, HER2 항체가 항원 결합 부위를 포함하는 항체 단편인 치료 방법.

청구항 18.

제1항에 있어서, 발현이 HER 수용체 또는 리간드를 코딩하는 mRNA를 정량화함으로써 결정되는 것인 치료 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, mRNA가 증합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 정량화되는 것인 치료 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, PCR이 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)인 치료 방법.

청구항 21.

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 샘플이 고정된 종양 샘플인 치료 방법.

청구항 22.

제21항에 있어서, 종양 샘플이 포르말린 고정된 파라핀 포매(FFPE) 종양 샘플인 치료 방법.

청구항 23.

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 샘플이 동결된 종양 샘플인 치료 방법.

청구항 24.

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, HER 수용체 및 HER 리간드의 발현이 중앙값 이상인 치료 방법.

청구항 25.

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 난소암, 복막암, 또는 난관암인 치료 방법.

청구항 26.

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 전이성 유방암(MBC)인 치료 방법.

청구항 27.

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 비소세포 폐암(NSCLC)인 치료 방법.

청구항 28.

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 치료 방법.

청구항 29.

제28항에 있어서, 화학요법제가 항대사물 화학요법제인 치료 방법.

청구항 30.

제29항에 있어서, 항대사물 화학요법제가 켄시타빈인 치료 방법.

청구항 31.

암을 치료하는데 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린을 발현하는 것인, 암의 치료 방법.

청구항 32.

제31항에 있어서, HER 억제제가 HER2와 EGFR 또는 HER3의 이중이량체화를 억제하는 것인 치료 방법.

청구항 33.

암을 치료하는데 유효한 양의, HER2의 도메인 II에 결합하는 HER2 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린 뿐 아니라 HER2 및 EGFR 또는 HER3을 발현하는 것인, 암의 치료 방법.

청구항 34.

제33항에 있어서, HER2의 도메인 I, II 및 III 사이의 연결부에 결합하는 치료 방법.

청구항 35.

샘플에서의 2 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 2 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현은 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 나타내는 것인, 생물학적 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화의 평가 방법.

청구항 36.

제35항에 있어서, 샘플이 파라핀 포매되고 포르말린 고정된 종양 샘플인 평가 방법.

청구항 37.

샘플에서의 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현은 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 나타내는 것인, 생물학적 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화의 평가 방법.

청구항 38.

환자로부터의 샘플에서의 2 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 HER 수용체 및 HER 리간드의 발현은 상기 환자가 HER 이량체화 억제제를 이용한 치료법에 반응하기 쉽다는 것을 나타내는 것인, HER 이량체화 억제제를 이용한 치료를 위한 환자의 확인 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서, 환자가 암 환자인 확인 방법.

청구항 40.

난소암을 치료하기에 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린을 발현하는 것인, 난소암의 치료 방법.

청구항 41.

제40항에 있어서, 종양 샘플이 2 이상의 HER 수용체를 추가로 발현하는 것인 치료 방법.

명세서**기술분야**

본 발명은 유전자 발현 분석에 기초하여 HER 억제제, 예를 들어 페르투주마브를 이용한 치료법을 위한 환자를 선택하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 유전자 발현 분석을 통해 생물학적 샘플 내에서의 HER 인산화 또는 활성화를 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경기술**HER 수용체 및 그에 대한 항체**

수용체 티로신 키나제의 HER 족은 세포 성장, 분화 및 생존의 중요한 매개자이다. 상기 수용체 족은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1 또는 HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185^{neu}), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 비롯한 4개의 별개의 구성원을 포함한다.

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

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

래트 p185^{neu} 및 인간 HER2 단백질 생성물에 대해 지정된 항체가 기재되었다.

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

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

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

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

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

HER 수용체는 일반적으로 세포 내의 다양한 조합으로 발견되며, 이중이량체화는 다양한 HER 리간드에 대한 세포 반응의 다양성을 증가시키는 것으로 여겨진다 (문헌 [Earp et al. Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132 (1995)]). EGFR은 6가지 상이한 리간드에 의해 결합된다: 표피 성장 인자 (EGF), 형질전환성 성장 인자 알파 (TGF- α), 암피레굴린, 헤파린 결합 표피 성장 인자 (HB-EGF), 베타셀룰린 및 에피레굴린 (문헌 [Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)]). 단일 유전자의 선택적 스플라이싱으로부터 초래되는 헤레굴린 단백질의 작은 HER3 및 HER4에 대한 리간드이다. 헤레굴린 작은 알파, 베타 및 감마 헤레굴린 (문헌 [Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992)]); 미국 특허 제5,641,869호; 및 [Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)]); neu 분화 인자 (NDF), 아교 성장 인자 (GGF); 아세틸콜린 수용체 유도 활성 (ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유래된 인자 (SMDF)를 포함한다. 해설에 대해서는, 문헌 [Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)]; [Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996)] 및 [Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995)]를 참고한다. 최근에, 3가지 추가의 HER 리간드가 확인되었다; HER3 또는 HER4에 결합하는 것으로 보고된 뉴레굴린-2 (NRG-2) (문헌 [Chang et al. Nature 387 509-512 (1997)]);

및 [Carraway et al. Nature 387:512-516 (1997)]; HER4에 결합하는 뉴레굴린-3 ([Zhang et al. PNAS (USA) 94 (18):9562-7 (1997)]; 및 HER4에 결합하는 뉴레굴린-4 ([Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)]). HB-EGF, 베타셀룰린 및 에피레굴린도 HER4에 결합한다.

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

난소암

난소암은 여성 생식관의 악성 종양에 의한 사망의 가장 흔한 원인이다. 미국에서는 1년에 24,000명이 새로 진단받는 것으로 추정되며, 약 13,000명이 이 질환으로 사망한다. 진행성 난소암 환자들은 흔히, 탁산과 종종 병용되는 백금계 화학요법으로 치료된다. 이들 약제들이 실패한 후에는, 치료적 선택사항이 거의 없다. 백금 민감성 질환을 갖는 환자는 종종 백금으로 재치료되지만, 상당한 비율의 환자들은 재치료 후 짧은 반응 기간을 갖는다. 백금 내성 질환을 갖는 환자들에 대해서는 성과가 보다 좋지 않다. 토포테칸은 최초 화학요법 또는 후속 화학요법이 실패한 환자들에 대해 미국 식품 의약품 안전청 (FDA)에 의해 승인받았으며; 리포솜 형태의 독소루비신은 백금계 화학치료 계획 및 파클리탁셀계 화학치료 계획 모두에 무반응성인 난소암 환자들에게만 승인되었다. 토포테칸 및 리포솜 형태의 독소루비신은 백금 내성 질환 환자에 있어, 각각 6% 및 12%의 부분적 반응을 보였으며, 진행 없는 생존의 중앙값은 14-18주이었다. 보다 최근에는, 젬시타빈을 이용한 유망한 결과들이 16%의 부분적 반응으로 백금 내성 난소암에서 보고되었으며, 이로 인해 2차 치료로서의 이 약제의 사용이 증가하였다. 하지만, 기존의 치료들이 실패한 진행성 난소암 환자들을 위한 신규하고 개선된 치료적 선택사항에 대한 명백한 필요가 존재한다.

HER 족의 수용체 티로신 키나제들이 난소암의 발병과정에 관련되어 있다. HER 신호전달 경로를 표적화하기 위하여, 페르투주마브(rhuMAb 2C4)가 HER2와 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제함으로써, 리간드에 의해 진행되는 인산화 및 활성화, 및 RAS 및 AKT 경로의 하류 활성화를 억제하는 인간화된 항체로서 개발되었다.

젬시타빈은 다양한 종양들에 사용되어 왔으며, 췌장암 및 폐암에서 사용되도록 표시된다. 단일제 젬시타빈의 사용이 갖는 가장 흔한 독성들에는 혈구감소증이 포함되며, 빈혈 및 호중구감소증이 각각 68% 및 63% 발생한다. 다른 흔한 독성은 구역 및 구토이며, 조합 발생율이 69%이고, 등급 III 및 등급 IV의 발생율이 13% 및 1%이었다. 설사는 19%로 보다 덜 빈번하게 나타난다. 발진은 30%에서 보다 흔하게 나타나며, 등급 III의 발생율은 단지 1%이다. 젬시타빈은 예상치 못한 독성의 임의의 심각한 증가 없이 많은 다른 화학요법제, 예를 들어 탁산, 안트라시클린, 및 백금과 조합되어 왔다.

트라스투주마브는 II상 시험에서 상이한 화학요법의 몇 가지 조합에 있어서 젬시타빈과 조합되었으며, 또한 심장 독성 또는 예상치 않은 독성의 관찰 없이 우수한 내성을 보였다 (문헌 [Safran et al. Proc Am. Soc. Clin. Oncol. 20:130a (2001), Miller et al. Oncology 15(2): 38-40 (2001)]). 트라스투주마브 및 젬시타빈의 조합에 관해서는, 문헌 [Zinner et al. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:328a (2001)], [Nagourney et al. Breast Cancer Res. Treat. 57:116, Abstract 475 (1999)], [Bun et al. Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 41:719, Abstract #4571 (2000)], [Konecny et al. Breast Cancer Res Treat 57: 114, Abstract 467 (1999)], [O'Shaughnessy et al. Sem. Oncol 2(suppl3):22 26 (2004)], [Sledge et al. Sem. Oncol. 2(suppl3):19 21 (2003)], [Zinner et al. Lung Cancer 44(1):99 110 (2004)], [Gatzemeier et al. Ann of Oncol. 15:19 27 (2004)]을 또한 참조한다.

고형 종양을 치료하기 위한 단일제로서의 움니타르그의 I상 시험에서, 3명의 진행성 난소암 환자들에게 페르투주마브를 처치하였다. 한 사람은 지속적인 부분적 반응을 보였고, 다른 한 환자는 15주 동안 질환 진행이 불변이었다. (문헌 [Agus et al. Proc Am Soc Clin Oncol 22: 192, Abstract 771 (2003)]).

진단법

HER2 항체 트라스투주마브로 치료한 환자들이 일반적으로 HER2 과발현/증폭에 기초한 치료법을 위해 선택된다. 예를 들어, WO99/31140 (파톤 등(Paton et al.)), US2003/0170234A1 (헬만, 에스.(Hellmann, S.)), 및 US2003/0147884 (파톤 등) 뿐 아니라; WO01/89566, US2002/0064785, 및 US2003/0134344 (마스 등(Mass et al.))를 참조한다. 또한, HER2 과발현 및 증폭을 탐지하기 위한 면역조직화학법(IHC) 및 형광 계내 혼성화(FISH)에 관해서는, 코헨 등(Cohen et al.)의 US2003/0152987을 참조한다.

WO2004/053497 (바쿠스 등(Bacus et al.))은 헤르셉틴(HERCEPTIN)® 요법에 대한 반응을 측정 또는 예측하는 것을 언급한다. US2004/013297A1 (바쿠스 등)은 ABX0303 EGFR 항체 요법에 대한 반응을 측정 또는 예측하는 것에 관한 것이다. WO2004/000094 (바쿠스 등)는 EGFR-HER2 티로신 키나제 억제제인 소분자 GW572016에 대한 반응을 측정하는 것에 관한 것이다.

WO2004/063709(아믈러 등(Amler et al.))는 EGFR 억제제 에를로티니브 HCl에 대한 감수성을 측정하는 바이오마커 및 그 측정 방법을 언급한다. US2004/0209290(코블레이 등)은 유방암 예후에 대한 유전자 발현 마커에 관한 것이다.

페르투주마브 및 그를 이용한 치료법을 위한 환자 선택에 관한 특허 문헌들에는 WO01/00245 (아담스 등(Adams et al.)); US2003/0086924 (슬리브코브스키, 엠.(Sliwowski, M.)); US2004/0013667A1 (슬리브코브스키, 엠.) 뿐만 아니라; WO2004/008099A2, 및 US2004/0106161 (보센마이어 등(Bossenmaier et al.))이 포함된다.

문헌 [Cronin et al. Am. J. Path. 164(1): 35-42 (2004)]은 파라핀 포매 조직 표본에서의 유전자 발현 측정을 설명한다. 문헌 [Ma et al. Cancer Cell 5:607-616 (2004)]은 일차 생검 표본으로부터 취한 종양 조직 절편으로부터 단리된 RNA를 이용한 유전자 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이에 의한 유전자 프로파일링을 설명한다.

발명의 요약

본 발명은 적어도 부분적으로는, 특정 유전자의 발현 프로파일이 HER 인산화 또는 활성화를 측정하기 위한 대용자로서 작용할 수 있다는 발견에 관한 것이다. 고정된 조직 또는 종양 샘플에서 HER2 인산화를 신뢰성 있게 평가하는 것에 기술적으로 어려움이 있기 때문에, 이러한 발견은 시험되는 샘플이 고정된 표본인 경우에 특히 유리하다. 원하는 발현 프로파일을 보이는 환자를 스크리닝함으로써 페르투주마브와 같은 HER 억제제로부터 보다 우수한 임상적 이점을 얻을 수 있는 환자의 하위군을 확인할 수 있을 것이다.

따라서, 첫 번째 실시양태에서, 본 발명은 암을 치료하기에 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드를 발현하는, 암 치료 방법을 제공한다.

뿐만 아니라, 본 발명은 암을 치료하기에 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린을 발현하는, 암 치료 방법을 제공한다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 암을 치료하기에 유효한 양의, HER2의 도메인 II에 결합하는 HER2 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린 뿐 아니라, HER2 및 EGFR 또는 HER3를 발현하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 샘플에서 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현은 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 나타내는, 생물학적 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 평가하는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 샘플에서의 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현은 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 나타내는, 생물학적 샘플에서의 HER 인산화 또는 활성화를 평가하는 방법에 관한 것이다.

또다른 측면에서, 본 발명은 환자로부터의 샘플에서의 둘 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 HER 수용체 및 HER 리간드의 발현은 환자가 HER 이량체화 억제제를 이용한 치료법에 반응하기 쉽다는 것을 나타내는, HER 이량체화 억제제를 이용한 치료법을 위한 환자를 확인하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한, 또다른 측면에서, 난소암을 치료하는데 유효한 양의 HER 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 환자로부터의 종양 샘플이 베타셀룰린 또는 암피레굴린을 발현하는, 난소암 치료 방법에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

"HER 수용체"는 HER 수용체 계열에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이고, 이에 EGFR, HER2, HER3 및 HER4 수용체가 포함된다. 이러한 HER 수용체는 일반적으로 HER 리간드와 결합할 수 있거나/또는 다른 HER 수용체 분자와 이량체화할 수 있는 세포의 도메인; 친지성 막관통 도메인; 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 수 개의 티로신 잔기가 정착되어 있는 카복실-말단 시그널링 도메인을 포함할 것이다. 상기 HER 수용체는 "본래의 서열" HER 수용체 또는 그의 "아미노산 서열 변이체"일 수 있다. 바람직하게는, 상기 HER 수용체는 본래의 서열 인간 HER 수용체이다.

용어 "ErbB1", "HER1" "상피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 예를 들면 문헌 [Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)]에 기재된 바와 같은 EGFR을 지칭하는데, 이에 그의 천연 돌연변이체 형태 [예를 들면, 문헌 (Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990))에 기재된 바와 같은 결실 돌연변이체 EGFR]가 포함된다. *erbB1*은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 지칭한다.

"ErbB2" 및 "HER2"란 표현은 본원에 상호교환적으로 사용되고, 예를 들면 문헌 [Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) and Yamamoto et al., Nature 319:230-234 (1986)]에 기재된 인간 HER2 단백질 (유전자 은행 수탁 번호 X03363)을 지칭한다. 용어 "*erbB2*"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 지칭하고, "*neu*"는 랫트 p185^{neu}를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 바람직한 HER2는 본래의 서열 인간 HER2이다.

HER2의 세포의 도메인은 4개의 도메인, 즉 "도메인 I" (약 1 내지 195의 아미노산 잔기; 서열 번호 19), "도메인 II" (약 196 내지 319의 아미노산 잔기; 서열 번호 20), "도메인 III" (약 320 내지 488의 아미노산 잔기; 서열 번호 21), 및 "도메인 IV" (약 489 내지 630의 아미노산 잔기; 서열 번호 22) (신호 펩티드가 없는 잔기의 넘버링)를 포함한다. 문헌 [Garrett et al. Mol. Cell. 11:495-505 (2003)], [Cho et al. Nature 421:756-760 (2003)], [Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)], 및 [Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993)]을 참조한다. 또한 본원의 도 1을 참조한다.

"ErbB3" 및 "HER3"은 예를 들면, 미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호 뿐만 아니라 문헌 [Kraus et al., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)]에 기재된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 지칭한다.

용어 "ErbB4" 및 "HER4"는, 예를 들면 문헌 [EP Pat Appln No 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750 (1993); and Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)]에 기재된 바와 같은 수용체 폴리펩티드 (예를 들면, WO 99/19488 (1999. 4. 22일에 공개됨)에 기재된 바와 같은 그의 이소형을 포함함)를 지칭한다.

"HER 리간드"란 HER 수용체에 결합하고/하거나 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 의미한다. 본원에서 특별히 당해 HER 리간드는 본래의 서열 인간 HER 리간드, 예를 들면 상피 성장 인자 (EGF) [Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)]; 형질전환성 성장 인자 알파 (TGF- α) [Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)]; 신경초종 또는 각질세포 자가분비성 성장 인자로서 공지되기도 한 암피레굴린 [Shoyab et al., Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al., Nature 348:257-260 (1990); and Cook et al., Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)]; 베타셀룰린 [Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); and Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)]; 헤파린-결합성 상피 성장 인자 (HB-EGF) [Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)]; 에피레굴린 [Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); and Komurasaki et al., Oncogene 15:2841-2848 (1997)], 헤레굴린 [하기 참조]; 뉴레굴린-2 (NRG-2) [Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)]; 뉴레굴린-3 (NRG-3) [Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)]; 뉴레굴린-4 (NRG-4) [Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)]; 또는 크립토 (CR-1) [Kannan et al., J. Biol. Chem. 272 (6):3330-3335 (1997)]이다. EGFR과 결합하는 HER 리간드에는 EGF, TGF- α , 암피레굴린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에피레굴린이 포함된다. HER3와 결합하는 HER 리간드에는 헤레굴린이 포함된다. HER4와 결합할 수 있는 HER 리간드에는 베타셀룰린, 에피레굴린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 및 헤레굴린이 포함된다.

본원에 사용된 경우의 "헤레글린" (HRG)은 미국 특허 제5,641,869호 또는 문헌 [Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)]에 기재된 바와 같은 헤레글린 유전자 생성물에 의해 코딩된 폴리펩티드를 지칭한다. 헤레글린의 예로는 헤레글린- α , 헤레글린- β 1, 헤레글린- β 2 및 헤레글린- β 3 [Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992) 및 미국 특허 제5,641,869호]; neu 분화 인자 (NDF) [Peles et al. Cell 69:205-216 (1992)]; 아세틸콜린 수용체 유도 활성 (ARIA) [Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)]; 신경교성 성장 인자 (GGF) [Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)]; 감각 및 운동 신경단위 유래된 인자 (SMDF) [Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)]; γ -헤레글린 [Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)]이 있다.

단백질 "발현"은 유전자 상에 코딩된 정보가 메신저 RNA(mRNA)로 전환된 후, 단백질로 전환되는 과정을 지칭한다.

본원에서 목적하는 단백질(예를 들어, HER 수용체 또는 HER 리간드)을 "발현하는" 샘플 또는 세포는 단백질을 코딩하는 mRNA 또는 단백질이 샘플 또는 세포 중에 존재하는 것으로 측정된 것이다.

유전자들을 정규화하는데 사용될 수 있는 "하우스키핑(housekeeping)" 유전자의 예는 글루쿠코니다제(GUS), B-액틴 및 PRL19이며, GUS가 시험된 샘플 사이에서 발현 변화를 가장 적게 나타내므로 바람직하다.

본원에서 사용되는 "중합효소 연쇄 반응" 또는 "PCR"의 기술은 핵산, RNA 및/또는 DNA의 미량의 특정 단편을 미국 특허 제4,683,195호 (1987. 7. 28)에 기재된 바와 같이 증폭시키는 과정을 일반적으로 지칭한다. 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 고안할 수 있도록, 관심이 있거나 관심 밖의 영역 말단으로부터의 서열 정보는 입수 가능해야 하며, 이러한 프라이머는 증폭될 주형의 반대편 가닥과 서열이 동일하거나 유사할 것이다. 두 프라이머의 5' 말단 뉴클레오타이드는 증폭된 물질의 말단과 일치할 수 있다. PCR을 사용하여 특이적 RNA 서열, 전체 게놈 DNA로부터의 특이적 DNA 서열, 및 전체 세포 RNA, 박테리오파아지 또는 플라스미드 서열로부터 전사된 cDNA 등을 증폭시킬 수 있다 [참조: Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)]. 본원에서 사용된 PCR은 프라이머로서 공지된 핵산 (DNA 또는 RNA)을 사용하는 것을 포함하는, 핵산 시험 샘플을 증폭시키기 위한 핵산 중합효소 반응 방법의 한 예이나 유일한 예는 아니며, 핵산 중합효소를 이용하여 특정 핵산 조각을 증폭 또는 생성시키거나 특정 핵산에 상보적인 특정 핵산 조각을 증폭 또는 생성시킨다.

"정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응" 또는 "qRT-PCR"은 PCT 반응의 각 단계에서 PCR 생성물의 양이 측정되는 형태의 PCR을 지칭한다. 이 기술은 문헌[Cronin et al., 상기 참조 및 Ma et al., 상기 참조]를 비롯한 다양한 문헌에 기술되어 있다.

"마이크로어레이"란 용어는 기재 상의 혼성화가능한 배열 요소, 바람직하게는 폴리뉴클레오타이드 프로브의 정돈된 배열을 지칭한다.

"폴리뉴클레오타이드"란 용어는 단수 또는 복수로 사용되었을 때, 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리디옥시리보뉴클레오타이드를 지칭하며, 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원에서 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오타이드는 비제한적으로 단일 및 이중 가닥 DNA, 단일 및 이중 가닥 영역을 포함하는 DNA, 단일 및 이중 가닥 RNA, 및 단일 및 이중 가닥 영역을 포함하는 RNA, 단일 또는 보다 일반적으로는 이중 가닥일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 혼성화 분자를 포함하거나, 또는 단일 및 이중 가닥 영역을 포함한다. 아울러, 본원에서 사용된 "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA 및 DNA 모두를 포함하는 삼중 가닥 영역을 지칭한다. 이같은 영역에서의 가닥들은 동일한 분자에서 형성되거나 또는 상이한 분자에서 형성될 수 있다. 영역들은 하나 이상의 모든 분자들을 함유할 수 있지만, 일반적으로는 분자들의 일부 한 영역만을 포함한다. 삼중-나선 영역 분자 중 하나는 흔히 올리고뉴클레오타이드이다. "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 구체적으로 cDNA를 포함한다. 이 용어는 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA (cDNA 포함) 및 RNA를 포함한다. 따라서, 안정성 이유로 또는 기타 이유로 골격이 변형된 DNA 또는 RNA는 본원에서 의도하는 "폴리뉴클레오타이드"이다. 아울러, 특이한 염기, 예를 들어, 이노신, 또는 변형된 염기, 예를 들어, 삼중 수소화된 염기를 포함하는 DNA 또는 RNA가 본원에서 정의된 용어 "폴리뉴클레오타이드"에 포함된다. 일반적으로, "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 모든 화학적으로, 효소적으로 및/또는 대사적으로 변형된 형태의 비변형된 폴리뉴클레오타이드와 아울러, 바이러스 및 세포(단순 및 복잡 세포 포함)의 DNA 및 RNA 특성의 화학적 형태를 포함한다.

"올리고뉴클레오타이드"란 용어는 비제한적으로 단일 가닥 디옥시리보뉴클레오타이드, 단일 또는 이중가닥 리보뉴클레오타이드, RNA:DNA 하이브리드 및 이중 가닥 DNA를 포함하는 비교적 짧은 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 단일 가닥 DNA 프

로브 올리고뉴클레오티드와 같은 올리고뉴클레오티드는 흔히 화학적 방법, 예를 들어, 상업적으로 이용가능한 자동화된 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오티드는 시험관내 재조합 DNA-매개 기술을 비롯한 다양한 기타 방법, 및 세포 및 생물체 내에서 DNA 발현에 의해 제조될 수 있다.

"유전자 증폭"은 특정 세포 또는 세포주에서 유전자 또는 유전자 단편의 다수 복제본이 형성되는 과정을 말한다. 복제된 영역(증폭된 DNA 스트레치)는 종종 "앰플리콘(amplicon)"으로 불린다. 통상, 생성되는 메신저 RNA(mRNA)의 양은 발현되는 특정 유전자의 복제본 수에 비례하여 증가한다.

혼성화 반응의 "엄격도"는 당업자가 쉽게 결정할 수 있으며, 통상적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 달라지는 실험적 계산값이다. 통상적으로, 프로브의 길이가 길수록, 적절한 어닐링에 요구되는 온도가 더 높고; 프로브의 길이가 짧을수록, 요구되는 온도가 더 낮다. 통상적으로, 혼성화는 상보적 가닥이 자신들의 용융 온도보다 낮은 환경에 존재할 때 재어닐링되는 변성된 DNA의 능력에 따라 달라진다. 프로브와 혼성화가능한 서열 사이의 원하는 상동성의 정도가 높을수록, 사용할 수 있는 상대적인 온도가 높아진다. 따라서, 상대적 온도가 높아질수록 반응 조건은 더욱 엄격해지는 반면, 상대적 온도가 낮을수록 반응조건은 덜 엄격해진다. 혼성화 반응의 엄격도와 관련한 더 상세한 정보 및 설명은 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)]을 참조한다.

본 명세서에서 정의된 바와 같은 "엄격 조건" 또는 "고엄격 조건"은 (1) 세척시 이온 강도가 낮고 온도가 높은 조건, 예를 들어 50°C에서 0.015M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트를 사용하는 조건, (2) 혼성화 시에 포름아미드, 예를 들어 42°C에서 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨이 함유된 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.5)/0.1% 소혈청 알부민/0.1%피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈으로 제조한 50% (부피/부피) 포름아미드와 같은 변성제를 사용하는 조건 또는 (3) 42°C에서 50% 포름아미드, 5×SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산 나트륨, 5×덴하르트 (Denhardt's) 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용하고, 42°C에서 0.2×SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)로 세척하고 55°C에서 50% 포름아미드로 세척한 후에, 55°C에서 EDTA가 함유된 0.1×SSC를 이용한 고엄격 세척을 수행하는 조건이다.

"중간정도의 엄격 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있으며, 상기한 것보다 덜 엄격한 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어 온도, 이온 강도 및 SDS의 비율(%))의 사용을 포함한다. 중간정도의 엄격 조건의 예는 20% 포름아미드, 5×SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5×덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트 및 20 mg/ml의 연어 정자의 잘린 변성 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C로 밤새 인큐베이션한 후 필터를 약 37 내지 50°C에서 1×SSC로 세척하는 조건이다. 당업자라면, 프로브 길이 등과 같은 인자에 맞춰 필요한 온도, 이온 강도 등을 조절하는 방법을 잘 알 것이다.

본원에서 "HER 이량체"는 2개 이상의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유적으로 결합된 올리고머이다. 이러한 복합체는 둘 이상의 HER 수용체를 발현하는 세포가 HER 리간드에 노출되는 경우에 형성될 수 있고, 예를 들면 문헌 [Sliwkowski et al. J. Biol. Chem., 269 (20):14661-14665 (1994)]에 기재된 바와 같이 면역침전에 의해 분리하고 SDS-PAGE로 분석할 수 있다. 이러한 HER 이량체의 예로는 EGFR-HER2, HER2-HER3 및 HER3-HER4 이중이량체가 있다. 더욱이, 이러한 HER 이량체는 상이한 HER 수용체와 결합된 둘 이상의 HER2 수용체, 예를 들면 HER3, HER4 또는 EGFR을 포함할 수 있다. 사이토킨 수용체 서브유닛 (예: gp 130)와 같은 기타 단백질이 이량체에 포함될 수 있다.

"HER 억제제"는 HER 활성화 또는 기능을 방해하는 물질이다. HER 억제제의 예는 HER 항체(예를 들어, EGFR, HER2, HER3, 또는 HER4 항체); EGFR-표적된 약물; 소분자 HER 길항제; HER 티로신 키나제 억제제; 안티센스 분자(예를 들어, WO 2004/87207 참조); 및/또는 하류 신호 분자에 결합하거나, 또는 그 기능을 저해하는 물질, 예를 들어, MAPK 또는 Akt(도 5 참조)를 포함한다. 바람직하게는, HER 억제제는 HER 수용체에 결합하는 항체 또는 소분자이다.

본원에 사용된 용어 "EGFR-표적된 약물"은 EGFR에 결합하여 임의로 EGFR 활성화를 억제하는 치료제에 관한 것이다. 그러한 제제의 예로는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다. EGFR에 결합하는 항체의 예로는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (미국 특허 제4,943,533호 참조, Mendelsohn et al.) 및 그의 변이체, 예를 들면 키메라화된 225 (C225 또는 세투시마브; ERBUTIX®) 및 재구성된 인간 225 (H225) (WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); 타입 II 돌연변이 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 제5,212,290호); EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체 (미국 특허 제5,891,996호); 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예를 들어, ABX-EGF (WO 98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); 및 mAb 806 또는 인간화된 mAb 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384

(2004))가 있다. 항-EGFR 항체는 세포독성제와 결합되어 이뮤노컨쥬게이트를 형성할 수 있다 (EP 659,439 A2, Merck Patent GmbH). EGFR에 결합하는 소분자의 예로는 ZD1839 또는 Gefitinib (IRESSA™ Astra Zeneca); CP-358774 또는 에를로티니브 HCL (TARCEVA™ Genentech/OSI); 및 AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen)이 있다.

"티로신 키나제 억제제"는 HER 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 억제하는 분자이다. 이러한 억제제의 예로는 선행 문단에서 언급된 EGFR-표적된 약물; 다케다(Takeda)에서 시판되는 TAK165와 같은 소분자 HER2 티

로신 키나제 억제제; EGFR에 선호적으로 결합하지만 HER2 및 EGFR-과발현 세포 둘다를 억제하는 EKB-569 (와이어스에서 시판)와 같은 이중-HER 억제제; GW572016 (글락소-스미스클라인에서 시판), 경구 HER2 및 EGFR 티로신 키나제 억제제; PKI-166 (노파르티스(Novartis)에서 시판); 카네르티니브 (CI-1033; 파마시아(Pharmacia))와 같은 펜-HER 억제제; ISIS 파마슈티칼스(ISIS Pharmaceuticals)에서 시판되는 Raf-1 신호전달을 억제하는 안티센스 제제 ISIS-5132와 같은 Raf-1 억제제; 글락소에서 시판되는 이마티니브 메실레이트 (글리백(GLEEVEC™)와 같은 비-HER 표적화된 TK 억제제; MAPK 세포의 조절된 키나제 I 억제제 CI-1040 (파마시아에서 시판); PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노)퀴나졸린과 같은 퀴나졸린; 피리도피리미딘; 피리미도피리미딘; CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706과 같은 피롤로피리미딘; 피라졸로피리미딘, 4-(페닐아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘; 쿠르쿠민 (디페롤로일 메탄, 4,5-비스(4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 니트로티오펜 잔기를 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lambers)); 안티센스 분자 (예를 들어 HER-코딩 핵산에 결합하는 것들); 퀴녹살린 (미국 특허 제5,804,396호); 트리포스틴 (미국 특허 제5,804,396호); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게(Schering AG)); CI-1033 (화이자)와 같은 펜-HER 억제제; 아피니타크(Affinitac) (ISIS 3521; 이시스(Isis)/릴리(Lilly)); 이마티니브 메실레이트 (글리백; 노파르티스); PKI 166(노파르티스); GW2016 (글락소스미스클라인); CI-1033 (화이자); EKB-569 (와이어스); 세막시니브 (서젠); ZD6474(아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); INC-1C11 (임클론) 또는 임의의 하기 특허 간행물에 기재된 것: 미국 특허 제5,804,396호; WO 99/09016 (아메리칸 시아나미드(American Cyanamid)); WO 98/43960 (아메리칸 시아나미드); WO 97/38983 (워너 램버트); WO 99/06378 (워너 램버트); WO 99/06396 (워너 램버트); WO 96/30347 (화이자, 인크); WO 96/33978 (제네카); WO 96/3397 (제네카); 및 WO 96/33980 (제네카)을 들 수 있다.

"HER 이량체화 억제제"는 HER 이량체의 형성을 저해하는 물질이다. 바람직하게는, HER 이량체화 억제제는 항체, 예를 들어, HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 항체이다. 본원에서 가장 바람직한 이량체화 억제제는 페르투주마브 또는 MAb 2C4이다. HER2의 이중이량체 결합 부위로의 2C4 결합은 도 4에 예시되어 있다. HER 이량체 억제제의 다른 예는 EGFR에 결합하고, 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이량체를 억제하는 항체(예를 들어, 활성화된 또는 "구속되지 않은" EGFR에 결합하는 EGFR 모노클로날 항체 806, MAb 806; Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004) 참조); HER3에 결합하고, 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이량체를 억제하는 항체; HER4에 결합하고, 하나 이상의 다른 HER 수용체와의 이량체를 억제하는 항체; 펩티드 이량체화 억제제(미국 특허 제6,417,168호); 안티센스 이량체화 억제제 등을 포함한다.

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

"HER 활성화"는 임의의 하나 이상의 HER2 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, HER 활성화는 신호 전달 (예를 들어, HER 수용체 또는 기질 폴리펩티드 내의 티로신 잔기를 인산화하는 HER 수용체의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발됨)을 초래한다. HER 활성화는 관심의 HER 수용체를 포함하는 HER 이량체에 결합하는 HER 리간드에 의해 매개될 수 있다. HER 이량체에 결합하는 HER 리간드는 이량체 내의 하나 이상의 HER 수용체의 키나제 도메인을 활성화시켜 하나 이상의 HER 수용체 내의 티로신 잔기의 인산화 및/또는 Akt 또는 MAPK 세포내 키나제와 같은 추가의 기질 폴리펩티드(들) 내의 티로신 잔기의 인산화를 초래할 수 있다. 예를 들어, 도 5를 참조.

"인산화"는 하나 이상의 인산기(들)이 단백질, 예를 들어, HER 수용체, 또는 그 기질에 추가되는 것을 지칭한다.

"본래의 서열" 폴리펩티드는 천연으로부터 유래된 폴리펩티드 (예를 들면, HER 수용체 또는 HER 리간드)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이다. 그러한 본래 서열 폴리펩티드는 천연으로부터 단리될 수 있거나 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 본래 서열 폴리펩티드는 천연 인간 폴리펩티드, 무인 폴리펩티드 또는 임의의 다른 포유류 종으로부터의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

본원에서의 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되는데, 구체적으로는 본래의 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 둘 이상의 온전한 항체로부터 형성된 다중 특이적 항체 (예: 이중 특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편을 포괄한다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉, 이러한 집단 내에 포함된 개개의 항체는 모노클로날 항체 제조 중 미량으로 존재할 수도 있는 가능한 천연의 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 일반적으로 상이한 결정원 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않은 채로 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 형질을 나타내며, 항체 생성을 어떠한 특정 방법으로 제한하지는 않는다. 예를 들면, 본 발명에 따라서 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 기재된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 [미국 특허 제4,816,567호 참조]으로 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들면 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

본원에서의 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일정 부분이 특정한 종으로부터 유래된 항체 또는 특정한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 상기쇄의 나머지 부분이 또다른 종으로부터 유래된 항체 또는 또다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 뿐만 아니라 목적하는 활성을 나타내는 상기 항체의 단편 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체가 포함된다 [미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]. 본원에서 당해 키메라 항체에는 비-인간 영장류 (예: 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 포함된다.

"항체 단편"은 바람직하게는 항원 결합성 영역을 포함하는, 온전한 항체의 일정 부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아보디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중 특이적 항체가 있다.

본원에서 "온전한" 항체는 2개의 항원 결합 부위, 및 Fc 영역을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 온전한 항체는 하나 이상의 작용인자 기능을 갖는다.

이들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 온전한 항체를 상이한 "클래스"로 정할 수 있다. 5가지 주 클래스의 본래 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들 중의 몇 개는 추가로 "아부류" (이소형)로 나눌 수 있다: 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 불리운다. 상이한 부류의

면역글로불린의 아단위 구조와 3차원 형태는 널리 공지되어 있다.

항체 "작용인자 기능"은 항체의 Fc 영역 (본래의 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 작용인자 기능의 예로는 C1q 결합성; 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합성; 항체-의존적 세포 매개된 세포독성 (ADCC); 식작용; 세포 표면 수용체 (예: B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이 있다.

"항체-의존적 세포 매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 [예: 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 마크로파지]가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 후에 표적 세포의 분해를 유발시키는 세포 매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc RIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 464쪽의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 작용인자 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 부가적으로, 당해 분자의 ADCC 활성은, 예를 들면 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다.

"인간 작용인자 세포"는 하나 이상의 FcR를 발현하고 작용인자 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이러한 세포는 최소한 FcγRIII를 발현하고 ADCC 작용인자 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구가 있지만, PBMC와 NK 세포가 바람직하다. 상기 작용인자 세포는 그의 본래 공급원, 예를 들면 본원에 기재된 바와 같은 PBMCs 또는 혈액으로부터 분리할 수 있다.

용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역과 결합되는 수용체를 기재하는 데 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 그러나, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, 이것에는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 아부류의 수용체가 포함되는데, 이는 이들 수용체의 대립유전자성 변이체와 다르게 스포라이싱된 형태를 포함한다. FcγRII 수용체에는 주로 그의 세포질 도메인에서만 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는, FcγRIIA ("활성화 수용체")와 FcγRIIB ("억제성 수용체")가 포함된다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-이용된 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제성 수용체 FcγRIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-이용된 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]. FcR는 다음 문헌에서 고찰될 수 있다 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); and de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]. 앞으로 확인될 것을 포함한 기타 FcR가 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어에는 또한, 모체 IgG를 태아에게 전이시키는 것에 관여하는 신생아 수용체 FcRn이 포함된다 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)].

"보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 이러한 보체 활성화 경로는 동종 항원과 복합체를 형성한 분자 (예: 항체)에 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 결합시킴으로써 개시한다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

"천연 항체"는 통상적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설피드 연결 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄에 따라 다양하다. 각각의 중쇄와 경쇄는 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각 중쇄는 한 말단에서의 가변 도메인 (V_H) 다음에 수 많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_L)을 가지고 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄 가변 도메인 간의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

용어 "가변"은 가변 도메인의 특정한 부분이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타내고 그의 특정한 항원에 대한 각 특정 항체의 결합성과 특이성에 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 이러한 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포 적용되는 것은 아니다. 이는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 모두에 있어서 초가변 영역으로 불리우는 3가지 세그먼트에 집중되어 있다. 보다 고도로 보존된 가변 도메인 부분이 골격 영역 (FR)으로 불리운다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR를 포함하는데, 크게는 β-시트 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 몇몇 경우에는 상기 β-시트 구조의 형성부인 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 β-시트 형태를 취한다. 각 쇠에서의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 밀접하게 유지되어 있는데, 기타 쇠로부터의 초가변 영역의 경우에는, 항체의 항원-결합성 부위 형성에 도움이 된다 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접적인 관련은 없지만, 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC)에 항체가 참여하는 것과 같은 각종 작용인자 기능을 나타낸다.

본원에 사용된 경우의 용어 "초가변 영역"은 항원-결합에 관여하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 이러한 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 [예: 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 [예: 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]를 포함한다. "골격 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

항체를 파파인 분해시키면, 각각 단일의 항원-결합 부위를 갖고 있는 2개의 동일한 항원-결합 단편 ("Fab" 단편으로 불림)과 나머지 "Fc" 단편 (이의 명칭은 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하고 있음)이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 항원-결합 부위를 갖고 있고 항원과 가교결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다.

"Fv"는 완전한 항원-인식 부위와 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 1개의 중쇄와 1개의 경쇄 가변 도메인이 비-공유 결합으로 서로 단단하게 연결되어 있는 이량체로 이루어진다. 이러한 배열에서는, 각 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 규정한다. 집합적으로 설명하면, 6개의 초가변 영역이 항체에 항원-결합 특이성을 부여해준다. 그러나, 심지어 1개의 가변 도메인 (또는 특정 항원에 특이적인 단지 3개의 초가변 영역을 포함하는 Fv의 절반)이, 전체 항원 부위 보다는 낮은 친화성이긴 하지만 항원을 인식하여 결합할 수 있는 능력을 갖고 있다.

Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 또한 함유하고 있다. 또한, Fab' 단편은 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인들을 포함하여 중쇄 CH1 영역의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가됨으로써 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 보유하고 있는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래, 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖고 있는 한 쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

모든 척추동물 종으로부터의 항체의 "경쇄"는 이들의 불변 영역의 아미노산 서열을 기준으로 하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리우는, 명백하게 별개인 2가지 유형 중의 하나일 수 있다.

"단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 영역을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠로 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 해주는, V_H 및 V_L 영역 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 대한 고찰은 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)]을 참조할 수 있다. HER2 항체 scFv 단편은 WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다.

용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 쇠 (V_H - V_L) 내에 가변 경쇄 도메인 (V_L)에 연결된 가변 중쇄 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖고 있는 작은 항체 단편을 지칭한다. 동일한 쇠 상에서 두 도메인 간에 쌍을 형성하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 그 도메인들은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는, 예를 들어 문헌 [EP 404 097; WO 93/11161; and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다.

비-인간 (예: 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 가진 마우스, 쥐, 토끼 또는 비-인간 영장류 등의 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 골격 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 더욱이, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않은 잔기를 포함할 수도 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 증진시키도록 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인데, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한, 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일정 부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 적어도 일정 부분을 포함할 것이다. 추가의 상세한 내역은 다음 문헌을 참조할 수 있다 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)].

인간화 HER2 항체로는 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (헤르셉틴®) [본원에 참조 문헌으로 삽입된 미국 특허 제5,821,337호의 표 3에 기재된 바와 같음]; 인간화 520C9 (WO 93/21319) 및 아래에 기재된 바와 같은 인간화 2C4 항체가 있다.

본원의 목적을 위해, "트라스투주마브," "헤르셉틴®" 및 "huMAb4D5-8"은 각각 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

본원에서, "페르투주마브," 및 "옵니타르그(OMNITARG)TM"은 각각 서열 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

트라스투주마브 및 페르투주마브의 기능 차이는 도 6에 예시되어 있다.

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

"단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리되고/거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바로 항체 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 15 잔기 이상의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 수득하

는데 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시(Coomassie) 블루, 또는 바람직하게는 실버 염료를 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 동질성으로 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 계내에서 재조합 세포 내의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

"친화도 성숙된" 항체는 하기와 같은 변형(들)을 갖지 않은 모항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도를 증진시키는 하나 이상의 추가변 영역에서의 하나 이상의 변형을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대해서 나노몰 또는 심지어 피코몰 수준의 친화도를 갖는다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에 공지된 방법으로 제조된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 V_H 및 V_L 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙을 기술하고 있다.

CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 랜덤 돌연변이는 문헌 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier et al. Gene 169:147-155(1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jackson et al. J. Immunol. 154(7):3310-9(1995); 및 Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)]에 기술되어 있다.

"HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는" HER2 항체는 HER 이량체를 트라스투주마브보다 효과적으로 (예를 들어, 약 2배 이상 더 효과적으로) 감소시키거나 제거하는 것이다. 바람직하게는 이러한 항체는 뮤린 모노클로날 항체 2C4, 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 Fab 단편, 페르투주마브 및 페르투주마브의 Fab 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체만큼 적어도 거의 효과적으로 HER2 이량체화를 억제한다. HER 이량체화 억제는 HER 이량체를 직접 연구함으로써, 또는 HER 활성화, 또는 HER 이량체화로부터 초래되는 하류 신호전달을 평가함으로써, 및/또는 항체-HER2 결합 부위를 평가함으로써 등에 의해 평가될 수 있다. HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는 능력을 갖는 항체를 스크리닝하기 위한 분석법은 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 (Adams et al.)에 기재되어 있다. 단지 예로써, HER 이량체화의 억제에 대한 분석은, 예를 들어, HER 이량체 형성의 억제 (예를 들어, 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)]의 도 1A 내지 B; 및 WO 01/00245 참조); HER 이량

체를 발현하는 세포의 HER 리간드 활성화의 감소 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)]의 도 2A 내지 B); HER 이량체를 발현하는 세포에 결합하는 HER 리간드의 차단 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)]의 도 2E); HER 리간드의 존재 (또는 부재) 하에서 HER 이량체를 발현하는 암 세포 (예를 들어, MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D 세포)의 세포 성장 억제 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)]의 도 3A 내지 D); 하류 신호전달의 억제 (예를 들어, HRG-의존성 AKT 인산화의 억제 또는 HRG- 또는 TGF α -의존성 MAPK 인산화의 억제) (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)]의 도 2C 내지 D)를 평가함으로써 분석할 수 있다. 또한, 항체가 HER 이량체화를 억제하는지 여부는 항체-HER2 결합 부위를 연구함으로써, 예를 들어 HER2에 결합된 항체의 결정 구조와 같은 구조 또는 모델을 평가함으로써 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)] 참조).

HER2 항체는 트라스투주마브보다 효과적으로 "HRG-의존성 AKT 인산화를 억제"할 수 있고/거나 "HRG- 또는 TGF α -의존성 MAPK 인산화"를 억제할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 참조).

HER2 항체는 "HER2 엑토도메인(ectodomain) 절단을 억제하지 않는" 것일 수 있다 (문헌 [Molina et al. Cancer Res.61:4744-4749 (2001)]).

HER2의 "이종이량체 결합 부위에 결합하는" HER2 항체는 도메인 II 내의 잔기에 결합하며 (또한 임의로 도메인 I 및 III과 같은 HER2 세포의 도메인의 다른 도메인 내의 잔기에 결합함), HER2-EGFR, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이종이량

체의 형성을 일정 정도 이상으로 입체 장해할 수 있다. 문헌 [Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)]은 RCSB 단백질 데이터뱅크 (ID 코드 IS78)에 기록된 HER2-페르투주마브 결정 구조를 특성화하면서, HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 설명한다.

HER2의 "도메인 II에 결합하는" 항체는 도메인 II 내의 잔기에 결합하며, 임의로 도메인 I 및 III과 같은 HER2의 다른 도메인(들) 내의 잔기에 결합한다. 바람직하게는, 도메인 II에 결합하는 항체는 HER2의 도메인 I, II 및 III 사이의 연결부에 결합한다.

본원에서 "주요종 항체"라는 용어는 조성물 중에 양적으로 우세한 항체 분자인, 조성물 중의 항체 구조를 지칭한다. 한 실시양태에서, 주요종 항체는 HER2의 도메인 II에 결합하는 항체, HER 이량체화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는 항체, 및/또는 HER2의 이중이량체 결합 부위에 결합하는 항체와 같은 HER2 항체이다. 주요종 항체의 본원에서 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 서열 13 및 14의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것 (페르투주마브)이다.

본원에서 "아미노산 서열 변이체" 항체는 주요종 항체와 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 주요종 항체와 약 70% 이상의 상동성을 가질 것이며, 바람직하게는 이는 주요종 항체와 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상 상동성일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 주요종 항체의 아미노산 서열 내에 또는 그에 인접한 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 첨가를 갖는다. 본원에서 아미노산 서열 변이체의 예로는 산성 변이체(예를 들어, 탈아미드화된 항체 변이체), 염기성 변이체, 그의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장물 (예를 들어, VHS-)를 갖는 항체, 그의 1개 또는 2개의 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 갖는 항체 등을 들 수 있으며, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 대한 변이의 조합을 포함한다. 본원에서 특정 관심있는 항체 변이체는 그의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장물을 포함하며, 임의로 주요종 항체에 대해 다른 아미노산 서열 및/또는 글리코실화 차이를 추가로 포함하는 항체이다.

본원에서 "글리코실화 변이체" 항체는 주요종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 부분과 상이한 그에 부착된 하나 이상의 탄수화물 부분을 갖는 항체이다. 본원에서 글리코실화 변이체의 예로는 G0 올리고당류 구조 대신 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 갖는 항체, 그의 1개 또는 2개의 경쇄에 부착된 1개 또는 2개의 탄수화물 부분을 갖는 항체, 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 없는 항체 등, 뿐만 아니라 이러한 글리코실화 변경의 조합을 들 수 있다.

항체가 Fc 영역을 가질 경우, 본원에서 도 9에 나타난 것과 같은 올리고당류 구조는 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에, 예를 들어 잔기 299에 부착될 수 있다(EU 넘버링 잔기로는 298). 페르투주마브에 대해, G0이 우세한 올리고당류 구조였으며, G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 및 G2와 같은 다른 올리고당류 구조는 페르투주마브 조성물에 보다 적은 양으로 발견되었다.

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

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

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

"상동성"은 필요할 경우 최대 퍼센트의 상동성을 달성하기 위해 서열 및 도입 틈(introducing gap)을 정렬한 후에 동일한 아미노산 서열 변이체 중의 잔기의 퍼센트로 정의된다. 정렬 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 하나는 1991년 12월 10일자로 미국 DC 20559 워싱턴에 소재하는 유나이티드 스테이츠 카피라이트 오피스(United States Copyright Office)에 유저 문서로 제출된 제넨테크, 인크(Genentech, Inc.)에 의해 저술된 "얼라인 2(Align 2)"이다.

본원의 목적을 위해, "양이온 교환 분석"은 2개 이상의 화합물을 포함하는 조성물이 양이온 교환제를 사용하여 전하 차이에 기초하여 분리되는 임의의 방법을 지칭한다. 양이온 교환제는 일반적으로 공유 결합된 음으로 하전된 기를 포함한다. 바람직하게는, 본원에서 양이온 교환제는 약 양이온 교환제이며/거나 디오넥스(Dionex)에서 판매하는 프로파크 (PROPAC) WCX-10™ 양이온 교환 컬럼과 같은 카르복실화 관능기를 포함한다.

"난소"는 여성의 자궁의 어느 한쪽에 위치한 두개의 작은 아몬드 모양의 기관 중 하나이다.

"난관" 또는 "수란관"은 암컷 포유동물의 난소로부터 자궁으로 이어지는 두개의 미세한 튜브 중 하나이다.

"복막"은 복부와 같은 체강의 상피 연결이다.

"암" 및 "암성"이라는 용어는 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 이를 묘사한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종 (수모세포종 및 망막모세포종 포함), 육종 (지방육종 및 윤활 세포 육종 포함), 신경내분비세포 종양 (카르시노이드 종양, 가스트린종 및 섬세포 암 포함), 중피종, 신경집종 (청신경종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평 세포 암 (예를 들어, 상피 편평 세포 암), 소세포 폐암(SCLC), 비소세포 폐암(NSCLC)을 비롯한 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포성 암, 위장관암을 비롯한 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암(전이성 유방암 포함), 결장암, 직장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담관의 종양, 뿐만 아니라 두경부암을 들 수 있다.

"난소암"은 잠재적으로 생명을 위협하는 악성종양으로, 한쪽 또는 양쪽 난소에서 발생한다. 난소암의 증후가 나타날 때, 난소 종양은 복부를 통해 암 세포를 흘려 보내기에 충분할 만큼 크게 자라있을 것이다. 난소 밖으로 확장된 난소암 세포는 전이성 난소암으로 지칭된다. 난소 종양은 횡격막, 장 및/또는 장막(복부의 장기를 덮고, 채우고 있는 지방층)으로 확장되는 경향이 있다. 또한, 암 세포는 림프 채널 및 혈류를 통해 다른 기관으로 확산될 수 있다. 본원에서 치료하고자 하는 난소암은 세 종류의 주요 악성 난소 종양, 즉, 상피 종양, 생식 세포 종양 및 간질 종양을 포함한다.

"원발성 복막암종"은 복막에서 발생하는 암을 지칭한다. 원발성 복막암은 현미경적 외관, 증상, 확산의 형태 및 예후 측면에서 상피 난소암과 매우 유사할 수 있다. 난소를 제거한 여성이 여전히 원발성 복막암종에 걸릴 수 있다.

"난관 암종"은 난관 및/또는 넓은 인대의 암을 지칭한다.

"상피 종양"은 난소의 바깥쪽을 둘러싸고 있는 생식 상피로 알려진 큐브 모양의 세포층에서 발생한다. 상피 종양은 난소암의 90%까지 차지한다.

"생식 세포 종양"은 난소의 난자 성숙 세포(들)에서 발견된다. 생식 세포 종양은 난소암의 약 3%를 차지하며, 십대 및 젊은 여성에게서 제일 흔하다.

"간질 종양"은 난소를 한데 묶어주며, 여성 호르몬, 에스트로겐 및 프로게스테론을 생성하는 연결 조직에서 발생한다. 간질 종양은 모든 난소암의 6%를 차지한다.

본원에서 "환자"는 인간 환자이다. 환자는 "암 환자", 즉, 암의 한 가지 이상의 증상을 겪고 있거나, 그럴 위험이 있는 환자, 또는 HER 이량체화 억제제를 사용한 치료법으로 도움을 받을 수 있는 다른 환자일 수 있다.

"생물학적 샘플"은 샘플, 일반적으로 생물학적 출처에서 유래한 세포 또는 조직을 지칭한다.

"환자 샘플"은 환자, 예를 들어, 암 환자에서 얻은 샘플이다.

본원에서 "종양 샘플"은 환자의 종양으로부터 유래하거나, 환자의 종양으로부터의 종양 세포를 포함하는 샘플이다. 본원에서 종양 샘플의 예는 제한되는 것은 아니지만, 종양 생검, 순환 종양 세포, 순환 혈장 단백질, 복수, 종양으로부터 유래하거나 또는 종양 유사 특징을 나타내는 일차 세포 배양물 또는 세포주와 아울러, 보존된 종양 샘플, 예를 들어, 포르말린-고정되거나 파라핀 포매된 종양 샘플 또는 동결된 종양 샘플을 포함한다.

"고정된" 종양 샘플은 고정액을 사용하여 조직학적으로 보존된 것이다.

"포르말린-고정된" 종양 샘플은 포르말데히드를 고정액으로 사용하여 보존된 것이다.

"포매된" 종양 샘플은 단단하고, 일반적으로 딱딱한 매체, 예를 들어, 파라핀, 왁스, 셀로이딘 또는 수지로 둘러싸인 것이다. 포매는 현미경 실험을 위해 또는 조직 마이크로어레이(TMA)를 위해 얇은 절편을 잘라내는 것을 가능하게 한다.

"파라핀-포매된" 종양 샘플은 석유로부터 유래한 고상 탄화수소의 정제된 혼합물로 둘러싸인 것이다.

본원에서, "동결된" 종양 샘플은 동결되어 있는, 또는 동결되었던 종양 샘플이다.

본원에 사용된 경우의 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 특정 세포, 특히 HER 발현성 암 세포의 성장을 억제시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 이러한 성장 억제제는 S 기에서의 HER 발현성 세포의 비율을 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예로는 (S 기 이외의 위치에서) 세포 주기 진행을 차단시키는 제제, 예를 들면 G1 정지와 M-기 정지를 유도하는 제제가 있다. 전통적인 M-기 차단제에는 빈카스 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포 II 억제제, 예를 들면 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 포함된다. G1 정지 여파로 S-기 정지를 가져다 주는 제제는 예를 들면, DNA 알킬화제, 예를 들면 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토크세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C이다. 추가의 정보가 다음 문헌에 제시되어 있다 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p. 13].

"성장 억제성" 항체의 예는 HER2와 결합하여 HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제시키는 것이다. 바람직한 성장 억제성 HER2 항체는 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도에서 세포 배양물 중의 SK-BR-3 유방 종양 세포의 성장을 20% 이상, 바람직하게는 50% 이상 (예를 들면, 약 50% 내지 약 100%) 억제시키는데, 이러한 성장 억제는 SK-BR-3 세포를 상기 항체에 노출시킨지 6일 후에 결정한다 [1997년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 제5,677,171호 참조]. SK-BR-3 세포 성장 억제 검정은 상기 특허 및 다음에 보다 상세히 기재되어 있다. 바람직한 성장 억제성 항체는 무린 모노클로날 항체 4D5의 인간화된 변이체, 예를 들어, 트란스주마브이다.

"아포토시스를 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 분절, 세포 수축, 소포체의 확장, 세포 분절, 및/또는 막 소포 (아포토시체로 불리움)의 형성으로 결정된 바와 같이 계획된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 이러한 세포는 통상적으로, HER2 수용체를 과발현하는 것이다. 바람직하게는, 상기 세포는 종양 세포, 예를 들어, 유방암, 난소암, 위암, 자궁내막암, 타액선암, 폐암, 신장암, 결장암, 갑상선암, 췌장암, 또는 방광암 세포이다. 시험관내에서는, 상기 세포가 SK-BR-3, BT474, Calu 3 세포, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 아포토시스와 연관된 세포성 사건을 평가하기 위한 각종 방법이 이용 가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고; DNA 분절은 DNA 래더링 (laddering)을 통하여 평가할 수 있고, DNA 분절에 따른 핵/크로마틴 축합은 저이배체 세포에서의 어떠한 증가에 의해서도 평가할 수 있다. 바람직하게는, 아포토시스를 유도하는 분자는 BT474 세포를 이용하는 아넥신 결합 검정에 있어서 처리되지 않은 세포와 비교하여 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 유도하는 분자이다 (하기 참조). 아포토시스를 유도하는 HER 항체의 예는 7C2 및 7F3이다.

"에피토프 2C4"는 항체 2C4가 결합되는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위하여, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차-차단성 검정법을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 2C4의 HER2로의 결합을 약 50% 이상 차단한다. 별법으로는, HER2의 2C4 에피토프로 항체가 결합하는지를 평가하기 위해 에피토프 맵핑을 수행할 수 있다. 에피토프 2C4는 HER2의 세포외 도메인 내에서 도메인 II로부터 유래한 잔기를 포함한다. 2C4 및 페르투주마브는 도메인 I, II 및 III의 인접영역에서 HER2의 세포외 도메인에 결합한다. 문헌 [Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)].

"에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463)이 결합되는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 이 에피토프는 HER2의 막관통 도메인에 근접해 있으며, HER2의 도메인 IV 내에 있다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위하여, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차-차단성 검정법을 수행할 수 있다. 별법으로는, 상기 항체가 HER2의 4D5 에피토프 (예를 들면, HER2 ECD를 포함하는 약 529번 잔기에서 약 625번 잔기까지의 영역 내의 하나 이상의 잔기, 잔기 넘버링은 시그널 펩티드를 포함)에 결합하는지를 평가하기 위해, 에피토프 맵핑을 수행할 수 있다.

"에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및/또는 7F3 항체(각각이 ATCC에 기탁되어 있다, 하기 참조)가 결합되는 HER2의 세포외 도메인의 N 말단 영역으로, 도메인 I 내에 있다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위하여, 문헌

[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차-차단성 검정법을 수행할 수 있다. 별법으로는, 상기 항체가 HER2의 7CS/7F3 에피토프(예를 들면, HER2 ECD를 포함하는 약 22번 잔기에서 약 53번 잔기까지의 영역 내의 하나 이상의 잔기, 잔기 넘버링은 시그날 펩티드를 포함)에 결합하는지를 평가하기 위해, 에피토프 매핑을 수행할 수 있다.

"치료"는 치료적 치료 및 방지적 또는 예방적 수단 모두를 지칭한다. 치료가 필요한 것들은 이미 질환을 갖는 것들 뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 것들을 포함한다. 따라서, 본원에서 치료되어야 할 환자는 질환을 갖는 것으로 진단되었을 수 있거나, 질환에 걸리기 쉽거나 민감한 것일 수 있다.

"유효량"이라는 용어는 환자에서 암을 치료하는데 유효한 약물의 양을 지칭한다. 약물의 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고/거나; 종양 크기를 감소시키고/거나; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제하고/거나(즉, 일정 정도로 감속시킴, 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고/거나(즉, 일정 정도로 감속시킴, 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 일정 정도로 억제하고/거나; 암과 관련된 하나 이상의 증상을 일정 정도로 완화시킬 수 있다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 예방하고/거나 이를 사멸시킬 수 있는 정도까지는, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 유효량은 진행 없는 생존을 연장시키고/거나(예를 들어, 충실성 종양에 대한 반응 평가 기준, RECIST 또는 CA-125 변화에 의해 측정됨), 객관적인 반응(부분적 반응(PR) 또는 완전한 반응(CR) 포함)을 초래하고/거나, 전체 생존 시간을 증가시키고/거나, 암의 하나 이상의 증상을 개선시킬 수 있다(예를 들어, FOSI에 의해 평가됨).

"전체 생존"이란 진단 또는 치료 시간으로부터 한정된 시간, 예컨대 1년, 5년 등의 기간 동안 생존한 환자를 지칭한다.

"진행 없는 생존"이란 암이 더 악화되지 않고 생존한 환자를 지칭한다.

"객관적인 반응"이란 완전한 반응(CR) 또는 부분적 반응(PR)을 포함하는 측정가능한 반응을 지칭한다.

"완전한 반응" 또는 "완전한 완화"란 치료에 반응하여 암의 모든 징후가 사라지는 것으로 의도된다. 이는 항상 암이 치료되었음을 의미하는 것은 아니다.

"부분적 반응"이란 치료에 반응하여 신체의 암의 정도에서의 또는 하나 이상의 종양 또는 병변의 크기에서의 감소를 지칭한다.

"HER 수용체 과발현 또는 증폭"이 있는 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해, 상당히 보다 높은 수준의 HER 수용체 단백질 또는 유전자를 갖는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 유발될 수 있다. HER 수용체 과발현 또는 증폭은 세포의 표면 상에 존재하는 HER 단백질의 증가된 수준을 평가함으로써(예를 들어, 면역조직화학 분석법(IHC)을 통해) 진단 또는 예후 분석법으로 측정될 수 있다. 다르게는, 또는 부가적으로, 세포 내의 HER-코딩 핵산의 수준을, 예를 들어 형광 계내 혼성화(FISH; 1998년 10월에 공개된 WO 98/45479 참조), 서던 블롯팅, 또는 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)과 같은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 통해 측정할 수 있다. 또한, HER 수용체 과발현 또는 증폭은 혈청과 같은 생물학적 유체에서 흘러진 항원(예를 들어, HER 세포외 도메인)을 측정함으로써 연구될 수 있다(예를 들어, 1990년 6월 12일자로 허여된 미국 특허 제4,933,294호; 1991년 4월 18일자로 공개된 WO 91/05264; 1995년 3월 28일자로 허여된 미국 특허 제5,401,638호; 및 문헌 [Sias et al. J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)] 참조). 상기 분석법 이외에, 다양한 생체내 분석법이 당업자에게 이용가능하다. 예를 들어, 환자의 체내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시키고, 환자에서 항체의 세포에의 결합을, 예를 들어 방사성 활성화에 대해 외부 스크리닝함으로써 또는 항체에 이전에 노출된 환자로부터 취해진 생검을 분석함으로써 평가할 수 있다.

반대로, "HER2 수용체를 과발현하지 않거나 증폭하지 않는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 정상적인 수준의 HER2 수용체 단백질 또는 유전자보다 더 높지 않은 것이다.

본원에서 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소와 같은 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)® 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파,

카르보쿠온, 메투레도과 및 우레도과; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; TLK 286(TELCYTATM); 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀(드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히신; 베틀린산; 캄토테신(합성 유사체 토포테칸(히캄틴(HYCAMTIN)®, CPT-11(이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸 캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류트레로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제(예를 들어 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 II 및 칼리케아미신 오메가 II (예를 들어 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조) 및 안트라시클린, 예컨대 안나마이신, AD 32, 알카루비신, 텍스라족산, DX-52-1, 에피루비신, GPX-100, 이다루비신, KRN5500, 메노가릴, 디네미신 A를 비롯한 디네미신, 에스페라미신, 네오크지노스타틴 크로모포르 및 관련 크로모포르테인 에네디인 항생제 크로모포르, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오토라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 리포좀 독소루비신, 및 데옥시독소루비신 포함), 에소루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 염산 유사체, 예컨대 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록수리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토락톤; 항-아드레날린제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 및 트릴로스탄; 염산 보충제, 예컨대 프롤린산(류코보린); 아세글라톤; 항-염산 항-종양제, 예컨대 알림타(ALIMTA)®, LY231514 페메트렉세드, 디히드로폴레이트 환원효소 억제제, 예컨대 메토티렉세이트, 항-대사제, 예컨대 5-플루오로우라실(5-FU) 및 그의 전구약물, 예컨대 UFT, S-1 및 카페시타빈, 및 티미딜레이트 합성효소 억제제 및 글리신아미드 리보뉴클레오타이드 포르밀트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 칼티트렉세드(토무덱스(TOMUDEX^{RM}, TDX); 디히드로피리미딘 데하이드로제나제의 억제제, 예컨대 에닐루라실; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (미국 오레곤주 유진 소재의 JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신(엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테과; 탁소이드 및 탁산, 예를 들어 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀(미국 뉴저지주 프린스턴 소재의 브리스톨-마이어스 스쿼브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)), 아브락산(ABRAXANETM) 파클리탁셀의 크레모포어가 없고 알부민-유전자조작된 나노입자 제제(미국 일리노이주 샤움버그 소재의 아메리칸 파마슈티컬 파트너즈(American Pharmaceutical Partners)), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀(프랑스 안토니 소재의 룽-폴랭 로라(Rhone-Poulenc Rorer)); 클로란부실; 젬시타빈(젬자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 백금; 백금 유사체 또는 백금계 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴(벨반(VELBAN)®); 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴(온코빈(ONCOVIN)®); 빈카 알칼로이드; 비노렐빈(나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 것들의 2종 이상의 조합, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴(엘록사틴(ELOXATINTM))을 사용한 치료 처방의 약어 FOLFOX를 들 수 있다.

또한, 상기 정의에는 항-에스트로젠 및 선택적 에스트로젠 수용체 조절제 (SERM)와 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 타목시펜(놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)® 토레미펜; 부신에서의 에스트로젠 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미

노글루테티미드, 메가제(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 이로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비조르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸; 및 항-안드로젠, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 비정상적 세포 증식과 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체(EGF-R); 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 벡시드(VAXID)® 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소메라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

"항대사물 화학요법제"란 대사물질과 구조적으로 유사하지만, 생산적인 방식으로 신체에 의해 사용될 수 없는 제제이다. 다수의 항대사물 화학요법제가 핵산, RNA 및 DNA의 생산에 간섭한다. 항대사물 화학요법제의 예로는 젬시타빈(젬자르(GEMZAR)®), 5-플루오로우라실(5-FU), 카페시타빈(크셀로다(XELODA)®), 6-메르캅토피린, 메토크세이트, 6-티오구아닌, 페메트렉세드, 칼티트렉세드, 아라비노실시토신 ARA-C 시타라빈(시토사르(CYTOSAR)-U®), 다카르바진(DTIC-DOME®), 아조시토신, 데옥시시토신, 피리드미덴, 플루다라빈(플루다라(FLUDARA)®), 클라드라빈, 2-데옥시-D-글루코스 등을 들 수 있다. 바람직한 항대사물 화학요법제는 젬시타빈이다.

"젬시타빈" 또는 "2'-데옥시-2',2'-디플루오로시딘 모노히드로클로라이드(b-이성질체)"는 항종양 활성을 나타내는 뉴클레오시드 유사체이다. 젬시타빈 HCl의 실험식은 C₉H₁₁F₂N₃O₄·HCl이다. 젬시타빈 HCl은 젬자르® 상표명으로 일라이 릴리(Eli Lilly)에 의해 판매된다.

"백금계 화학요법제"는 분자의 내부 부분으로서 백금을 함유하는 유기 화합물을 포함한다. 백금계 화학요법제의 예로는 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라티늄을 들 수 있다.

"백금계 화학요법"은 임의로 하나 이상의 다른 화학요법제와 조합되는 하나 이상의 백금계 화학요법제를 사용하는 요법으로 의도된다.

"백금 내성" 암은 백금계 화학요법을 받는 동안 암 환자가 진행되거나(즉, 환자가 "백금 난치성"임), 백금계 화학요법 치료의 완료 후 12개월 이내(예를 들어 6개월 내)에 환자가 진행되는 것을 의미한다.

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

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

본원에서 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직으로부터 발생하고 그 조직을 대상으로 하는 질환 또는 장애, 이들의 합병증 또는 징후, 또는 이들로부터 초래된 증상이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예로는 관절염(류마티스성 관절염, 연소기 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염 및 강직성 척추염), 건선, 피부염(아토피성 피부염 포함), 만성 특발성 두드러기(만성 자가면역 두드러기 포함), 다발성근염/피부근염, 중독성 표피 괴사증, 경피증(전신성 경피증 포함), 경화증, 예컨대 진행성 전신 경화증, 염증성 장 질환(IBD) (예를 들어, 크론병, 궤양성 대장염, 자가면역 염증성 장 질환), 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염, 호흡 장애 증후군(성인 호흡 장애 증후군(ARDS) 포함), 수막염, IgE-

매개 질환 (예컨대, 과민성 및 알레르기성 및 아토피성 비염), 뇌염 (예컨대, 라스머센(Rasmussen) 뇌염), 포도막염 또는 자가면역 포도막염, 대장염 (예컨대, 미시적 대장염 및 교원성 대장염), 사구체신염(GN) (예컨대, 막성 GN(막성 신증), 특발성 막성 GN, 막 증식성 GN(MPGN) (제I형 및 제II형 포함) 및 고속 진행성 GN), 알레르기 증상, 알레르기 반응, 습진, 천식, T 세포 침윤 및 만성 염증성 반응 관련 증상, 아테롬성동맥경화증, 자가면역 심근염, 백혈구 유착 결핍증, 전신성 홍반성 루푸스(SLE) (예컨대, 피부 SLE), 아급성 피부 홍반성 루푸스, 루푸스 (신장염, 뇌염, 소아, 비-신장성, 원형, 탈모증 포함), 유년발병형 (제I형) 당뇨병 (소아 인슐린의존 당뇨병(IDDM) 포함), 성인발병형 당뇨병 (제II형 당뇨), 다발성 경화증 (MS) (예컨대, 척수-안구 MS), 사이토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연된 과민증 관련 면역 반응, 결핵, 유육종증, 육아종증 (림프종양 육아종증, 베게너 육아종증 포함), 무과립구증, 혈관염 (대혈관염 (다발성 근육통 류마티카(rheumatica) 및 거대세포(다카야스(Takayasu)) 동맥염 포함), 중혈관염 (가와사키병 및 결절성 다발성 동맥염 포함), CNS 혈관염, 전신성 괴사혈관염 및 ANCA-관련 혈관염 (예컨대, 척-스트라우스 혈관염 또는 증후군(CSS)), 측두동맥염, 재생불량성 빈혈, 콕스(Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙판(Diamond Blackfan) 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈 (자가면역 용혈성 빈혈(AIHA) 포함), 악성 빈혈, 순수 적혈구 무형성증(PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구 감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 누출 관련 질환, CNS 염증성 장애, 다중 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병, 케슬만 증후군, 굿 파스튜어 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐스-존슨 증후군, 천포창 (심상, 엽상 및 천포창 점막유천포창 포함), 자가면역 다내분비질환, 라이터병, 면역 복합성 신장염, IgM 다발성 신경병증 또는 IgM 매개 신경병증과 같은 만성 신경병증, 혈소판 감소증 (예를 들어, 심근경색증 환자에서 발생한 혈소판 감소증; 혈전 혈소판 감소성 자반증(TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개 혈소판 감소증, 예컨대 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP) (만성 또는 급성 ITP 포함) 포함), 고환 및 난소의 자가면역 질환 (자가면역 고환염 및 난소염 포함), 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환 (갑상선염, 예컨대 자가면역 갑상선염, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염 포함), 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 아디슨병, 그레이브병, 다선성 증후군, 예컨대 자가면역 다선성 증후군 (또는 다선성 내분비증 증후군), 부종양 증후군 (신경 부종양 증후군, 예컨대 램버트-이튼 근무력증 증후군 또는 이튼-램버트 증후군 포함), 강직-인간 증후군, 뇌척수염, 예컨대 알레르기성 뇌척수염, 중증 근무력증, 소뇌변성, 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 신경 근긴장증, 안간대성 근경련 증후군(OMS), 및 감각 신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루포이드 간염, 만성 활동 간염 또는 자가면역 만성활동 간염, 림프관 간질성 폐렴, 폐쇄성 세기관지염(비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 버거스병 (IgA 신장병), 원발성 담도 경화증, 비열대성 스프루(글루텐 장병증), 불응성 스프루, 피부염 포진, 한성글로불린 혈증, 근위축성 측삭 경화증(ALS; 루게릭병), 관상동맥 질환, 자가면역 내이 질환(AIED), 또는 자가면역 청력 상실, 안간대성 근경련 증후군(OMS), 다발성 연골염 (예컨대, 불응성 다발성 연골염), 폐포 단백증, 아밀로이드증, 거대세포 간염, 공막염, 비암성 림프구증가증, 원발성 림프구증가증 (B 세포 림프구증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 비특정 중요성의 모노클로날 감마글로불린병증(MGUS)) 포함), 말초 신경병증, 부종양 증후군, 채널 병리상태 (channelopathies) (예컨대, 간질, 편두통, 부정맥, 근장애, 청각 장애, 시각 장애, 주기성 사지마비, 및 CNS의 채널 병리상태), 자폐증, 염증성 근질환, 국소 분절성 사구체경화증(FSGS), 내분비 안구병증, 포도막염, 자가면역 간장 장애, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 부신염, 위선 위축, 초로성 치매, 탈수초성 질환, 드레슬러 증후군, 원형 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노 현상, 식도운동장애, 손발가락경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역성 불임증, 강직척추염, 혼합결합조직병, 샤가스병, 류마티스열, 재발성 유산, 농부패, 다형홍반, 심장절개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 새 사육가 폐, 알포트 증후군, 폐포염 (예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유화 폐포염), 간질성 폐 질환, 수혈반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 셴프터 증후군, 케이플란 증후군, 탕기, 심장내막염, 심내막 섬유증, 안구내염, 지속용기홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 섬모체염 (예컨대 만성 섬모체염, 헤테로만성 섬모체염 또는 폭스 섬모체염), 헤노호웬라인 자색반증, 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신화 증후군, 선천 풍진 감염, 엡스타인 바이러스 감염, 볼거리, 에반스 증후군, 자가면역 생식샘 부전, 시텐함 무도병, 연쇄상구균 감염후 신염, 폐쇄성 우비터관스, 갑상선종독증, 척수매독, 및 거대 세포 다발근육통이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

"양성 과다증식성 장애"란 세포 증식과 관련되고 의료계에서 비정상적으로 인식되는 환자의 상태를 의미한다. 비정상적인 상태는 장애를 겪는 생체에서 관찰되는 수준과 통계적으로 상이한 수준의 특성을 특징으로 한다. 세포 증식은 세포의 증대에 의한 성장 또는 확장을 지칭하고, 세포 분열을 포함한다. 세포 증식 속도는 소정의 시간 단위에서 생산되는 세포의 수를 계측하여 측정될 수 있다. 양성 과다증식성 장애의 예로는 건선 및 폴립을 들 수 있다.

"호흡기병"은 호흡기계와 관련되며, 만성 기관지염, 천식 (급성 천식 및 알레르기성 천식 포함), 만성 섬유증, 기관지확장증, 알레르기성 또는 기타 비염 또는 동염, α1-항트립신 결핍, 기침, 폐기종, 폐섬유증 또는 과다반응성 기도, 만성폐쇄폐병, 및 만성폐쇄성 폐장애를 들 수 있다.

"건선"은 제한되고 분리되고 융합된, 적색 은비늘 모양의 반점구진의 발진을 특징으로 하는 증상이다. 건선 병변은 일반적으로 팔꿈치, 무릎, 두피 및 몸통에서 대부분 발생한다. 이 용어는 질환의 홍피성, 농포성, 중등도 중증 및 난치성 형태를 포함하는 건선의 다양한 형태를 포함한다.

"자궁내막증"은 변성 혈액을 함유하는 낭을 주로 형성하는 자궁내막 조직의 이소성 발생을 지칭한다.

본원에서 "혈관 질환 또는 장애"라는 용어는 심장혈관계를 포함하는 혈관계에 영향을 주는 다양한 질환 또는 장애를 지칭한다. 이러한 질환의 예로는 동맥경화증, 혈관 재폐쇄, 죽상동맥경화증, 수술후 혈관 협착증, 재협착, 혈관 폐색 또는 목동맥 폐쇄 질환, 심장동맥 질환, 양기나, 소혈관 질환, 고콜레스테롤혈증, 고혈압 및 혈관 상피세포의 이상 증식 또는 기능에 관련된 증상을 들 수 있다.

"협착증"이란 용어는 체내의 빈 통로 (예를 들어, 관)의 좁아짐 또는 협착을 지칭한다.

"혈관 협착증"이란 용어는 혈관의 폐색 또는 좁아짐을 지칭한다. 혈관 협착증은 종종 지방 침전물(죽상동맥경화증의 경우와 같음) 또는 맥관성 평활근 세포 및 내피세포의 과잉 이동 및 증식으로부터 야기된다. 동맥은 협착증에 특히 걸리기 쉽다. 본원에서 사용되는 "협착증"이란 용어는 구체적으로 초기 협착증 및 재협착을 포함한다.

"재협착"이란 용어는 초기 협착증의 외견적인 성공적인 치료 후 협착증의 재발생을 지칭한다. 예를 들어, 혈관 협착증에서 "재협착"은, 예를 들어 혈관성형술 (예를 들어, 경피경혈관심장동맥 확장술), 방향성 관동맥죽상반제거술 또는 스텐트 등에 의한 지방 침전물의 제거에 의해 외관적으로 성공적으로 치료된 후, 혈관 협착증의 재발생을 지칭한다. 재협착에서 한 가지 원인 인자는 초기 증식이다. "신생내막 증식" 및 "신생내막 형성"과 상호 교환가능하게 사용되는 "초기 증식"이란 용어는 맥관성 평활근 세포 및 내피세포의 과잉 증식 및 이동의 결과로서 혈관, 내막의 내부의 대부분의 층의 비대화를 지칭한다. 재협착 과정 동안 발생하는 다양한 변화는 종종 종합적으로 "혈관벽 리모델링"으로 지칭된다.

"벌룬 혈관성형술" 및 "경피경혈관심장동맥 확장술"(PTCA)이란 용어는 종종 상호 교환가능하게 사용되며, 관상동맥으로부터 플라크를 제거하기 위한 비외과적 카테터 기초 치료를 지칭한다. 협착증 또는 재협착은 종종 혈액 유동에 대한 증가된 저항의 결과로서 고혈압을 일으킨다.

"고혈압"이란 용어는 비정상적인 고혈압, 즉 정상 범위의 상한값보다 높은 것을 지칭한다.

"폴립"이란 정상 표면 수준에서 외부로 또는 상부로 부풀거나 돌출되어, 거시적으로 반구형, 구형 또는 상대적으로 폭넓은 기저 또는 가느다란 대로부터 성장하는 구조와 같은 불규칙한 용기로 보이는 조직 덩어리를 지칭한다. 예로는 결장, 직장 및 비강 폴립을 들 수 있다.

"섬유샘종"이란 샘상피로부터 유도되는 양성 신생물을 지칭하며, 여기에는 증식 섬유모세포 및 결합조직 요소의 뚜렷한 기질이 있다. 이는 대개 가슴 조직에서 발생한다.

"천식"은 호흡 곤란을 일으키는 증상이다. 기관지 천식은 폐의 증상을 지칭하며, 여기에는 기도의 광범위한 좁아짐이 있고, 이는 기관지 및 세기관지의 내강 중의 점액, 점막의 부종 또는 평활근의 수축(연축)에 기인한 것일 수 있다.

"기관지염"이란 기관지의 점막의 염증을 지칭한다.

II. 유전자 발현 분석

본 발명은 HER 억제제를 사용하는 치료법을 위한 환자의 선택 방법을 제공하며, 여기서 환자로부터의 샘플이 2종 이상의 HER 수용체 (바람직하게는 EGFR, HER2 및 HER3으로부터 선택됨) 및 1종 이상의 HER 리간드 (바람직하게는 베타셀룰린, 암피레굴린, 에피레굴린 및 TGF- α , 가장 바람직하게는 베타셀룰린 또는 암피레굴린으로부터 선택됨)의 발현에 대하여 시험된다. 예를 들어, 2종 이상의 HER 수용체는 EGFR 및 HER2, 또는 HER2 및 HER3일 수 있다. 한 실시양태에서, HER2 및 EGFR 또는 HER3, 또한 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현이 측정된다. 샘플은, 단독으로 또는 2종 이상의 HER 수용체의 발현에 대한 시험과 함께, 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현에 대하여 시험될 수 있다. 확인된 유전자(들)의 양성 발현은 환자가 HER 억제제, HER 이량체화 억제제 또는 페리투주마브를 사용하는 요법에 대한 후보임을 나타낸다. 게다가, 상기 유전자(들)의 양성 발현은 이 환자가 이러한 양성 발현을 갖지 않는 환자보다 HER 수용체를 사용하는 요법에 대해 보다 유리하게 반응할 수 있음을 나타낸다.

샘플은 HER 억제제를 사용하는 요법을 필요로 하는 환자로부터 얻어질 수 있다. 대상이 암을 갖는 경우, 샘플은 종양 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, 종양 샘플은 난소, 복막, 난관 암, 전이성 유방암(MBC) 또는 비소세포폐암(NSCLC) 종양 샘플이다. 그러나, HER 억제제에 대한 다양한 다른 비악성의 치료적 증상이 이용가능하며, 본원에 기술되어 있다. 환자가 이들 비악성 증상에 대해 치료되는 경우, 적합한 샘플이 환자로부터 얻어져서 본원에 기술된 바와 같은 유전자 발현 분석을 위해 분석될 수 있다.

본원에서 생물학적 샘플은 고정된 샘플, 예를 들어 포르말린 고정된 파라핀-포매(FFPE) 샘플 또는 동결 샘플인 것이 바람직하다.

바람직하게는, HER 억제제는 HER 이량체화 억제제, 및/또는 HER 항체 (예를 들어, HER2 항체, 예컨대 HER2의 제II 도메인에 결합하는 HER2 항체, 예를 들어 페리투주마브)이다.

mRNA 또는 단백질의 발현을 측정하기 위한 다양한 방법이 이하에서 보다 상세하게 기술된다. 바람직하게는 mRNA가 정량화된다. 이러한 mRNA 분석은 바람직하게는 증합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 사용하여, 또는 마이크로어레이 분석에 의해 수행된다. PCR이 사용되는 경우, PCR의 바람직한 형태는 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 상기한 유전자의 발현이, 예를 들어 동일한 종양형의 다른 샘플과 대비하여 중앙값 이상에서 존재한다면, 양성 발현으로 여겨진다. 중앙 발현 수준은 유전자 발현 측정과 본질적으로 동시에 측정될 수 있거나 또는 그 전에 측정될 수 있다.

본 유전자 발현 분석은 HER 인산화 또는 활성화에 대한 대응으로서 작용한다. 이는 샘플이 고정된 샘플 (예를 들어, 파라핀-포매된 포르말린 고정 종양 샘플)이고, HER 인산화가 신뢰성 있게 정량화하기가 곤란할 수 있는 경우에 특히 유용하다. 따라서, 본 발명은 샘플 중의 2종 이상의 HER 수용체 및 1종 이상의 HER 리간드의 발현을 측정하는 것을 포함하는 생물학적 샘플에서 HER 인산화 또는 활성화의 평가 방법을 제공하며, 여기서 2종 이상의 HER 수용체 및 1종 이상의 HER 리간드의 발현은 샘플 중에서의 양성 HER 인산화 또는 활성화를 나타낸다. 또한, 본 발명은 샘플 중에서의 베타셀룰린 및/또는 암피레굴린의 발현을 측정하는 것을 포함하는 생물학적 샘플 중에서의 HER 인산화 또는 활성화의 평가 방법을 제공하며, 여기서 베타셀룰린 및/또는 암피레굴린 발현은 샘플 중에서의 양성 HER 인산화 또는 활성화를 나타낸다.

본 발명은 환자로부터의 샘플 중의 2종 이상의 HER 수용체 및 1종 이상의 HER 리간드의 발현을 측정하는 것을 포함하는 HER 억제제를 사용하는 요법을 위한 환자의 확인 방법을 제공하며, 여기서 HER 수용체 및 HER 리간드의 발현은 환자가 HER 억제제를 사용하는 요법에 쉽게 반응할 수 있음을 나타낸다. 이 환자는, 2종 이상의 HER 수용체 및 1종 이상의 HER 리간드를 발현시키지 않는 환자보다 HER 억제제에 보다 쉽게 반응하는 것으로 식별될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 단독으로 또는 2종 이상의 HER 수용체의 발현의 측정과 함께, 샘플 중에서의 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현을 측정하는 것을 포함하는 HER 억제제를 사용하는 요법을 위한 환자의 확인 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은, 환자로부터의 난소암 샘플 중에서의, 단독으로 또는 2종 이상의 HER 수용체의 발현의 측정과 함께, 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현을 측정하여 HER 억제제를 사용하는 요법을 위한 난소암 환자의 선택 방법을 제공한다.

유전자 발현을 측정하기 위한 다양한 예시적인 방법이 이하에서 보다 상세하게 기술될 것이다.

(i) 유전자 발현 프로파일링

일반적으로, 유전자 발현 프로파일링 방법은 2가지 대그룹으로 나누어질 수 있다: 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 분석에 기초한 방법과 폴리뉴클레오타이드의 서열분석에 기초한 방법. 샘플 중에서의 mRNA 발현의 정량화에 대하여 당업계에 알려진 가장 통상적으로 사용되는 방법으로는 노던 블롯팅 및 게내 혼성화(문헌 [Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)]); RNA 분해효소 보호 측정(문헌 [Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)]); 및 증합효소 연쇄 반응(PCR)(문헌 [Weis et al., *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)])을 들 수 있다. 다르게는, DNA 두가닥, RNA 두가닥 및 DNA-RNA 하이브리드 두가닥 또는 DNA-단백질 두가닥을 포함하는 특이적 두가닥을 인식할 수 있는 항체가 이용될 수 있다. 서열분석 기초 유전자 발현 분석을 위한 대표적인 방법은 유전자 발현 연속 분석(SAGE) 및 대량 평행 기호 서열분석(MPSS)에 의한 유전자 발현 분석을 들 수 있다.

(ii) 증합효소 연쇄 반응(PCR)

상기 열거된 기술 중 민감하고 유연한 정량적인 방법은 PCR이며, 이는 상이한 샘플 집단에서 정상적인 조직과 종양 조직에서 약물 치료를 하거나 이를 하지 않고 mRNA 수준을 비교하여 유전자 발현 패턴을 특징화하여, 밀접하게 관련된 mRNA들을 구별하고 RNA 구조를 분석하는데 사용될 수 있다.

제1 단계는 표적 샘플로부터 mRNA의 단리이다. 출발 물질은 전형적으로 인간 종양 또는 종양 세포주 및 상응하는 정상적인 조직 또는 세포주 각각으로부터 단리된 전체 RNA이다. 따라서, RNA는 가슴, 폐, 결장, 전립샘, 뇌, 간, 신장, 췌장, 비장, 가슴샘, 고환, 난소, 자궁 등의 종양을 포함하는 다양한 원발성 종양 또는 종양 세포주로부터 건강한 공여체로부터 모아진 DNA를 사용하여 단리될 수 있다. mRNA의 원천이 원발성 종양이면, mRNA는 예를 들어 동결되거나 또는 저장된 파라핀-포매되고 고정된 (예를 들어, 포르말린 고정) 조직 샘플로부터 추출될 수 있다.

mRNA 추출을 위한 일반적인 방법은 당업계에서 잘 알려져 있으며, 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)]를 비롯한 분자 생물학의 표준 교과서에 개시되어 있다. 파라핀 포매 조직으로부터의 RNA 추출을 위한 방법은, 예를 들어 문헌 [Rupp and Locker, Lab Invest. 56:A67 (1987)], 및 [De Andres et al., BioTechniques 18:42044 (1995)]에 개시되어 있다. 특히, RNA 단리는 키아젠과 같은 상업적인 제조업자로부터, 제조자의 지시에 따라, 정제 키트, 완충액 세트 및 단백질 분해효소를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 배양 중의 세포로부터의 전체 RNA는 키아젠 RNeasy 미니-칼럼을 사용하여 단리될 수 있다. 다른 상업적으로 입수가능한 RNA 단리 키트는 마스터퓨어(MASTERPURE)® 컴플리트 DNA 앤드 RNA 퓨리피케이션 키트(Complete DNA and RNA Purification Kit) (에피센터(EPICENTRE)®, 미국 위스콘신주 매디슨), 및 파라핀 블록 RNA 아이솔레이션 키트(Paraffin Block RNA Isolation Kit; 암비온 인크(Ambion, Inc.))를 들 수 있다. 조직 샘플로부터의 전체 RNA는 RNA 스탯(Stat)-60 (텔-테스트(Tel-Test))를 사용하여 단리될 수 있다. 종양으로부터 준비된 RNA는 예를 들어 세슘 클로라이드 밀도 구배 원심분리에 의해 단리될 수 있다.

RNA가 PCR에 대한 주형으로서 작용할 수 없으므로, PCR에 의한 유전자 발현 프로파일링에서 제1 단계는 cDNA로의 RNA 주형의 역전사 후, PCR 반응에서 이의 지수적 증폭이다. 2가지의 가장 통상적으로 사용되는 역전사효소는 아빌로 골수아세포증 바이러스 역전사효소(AMV-RT) 및 몰로니 마우스 백혈병 바이러스 역전사효소(MMLV-RT)이다. 역전사 단계는, 발현 프로파일링의 상황 및 목적에 따라, 전형적으로 특이적인 프라이머, 랜덤 헥사머 또는 올리고-dT 프라이머를 사용하여 프라이밍된다. 예를 들어, 추출된 RNA는 제조자의 지시 다음에 GENEAMPTM RNA PCR 키트 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 미국 캘리포니아주)를 사용하여 역전사될 수 있다. 그 다음에, 유도된 cDNA는 후속하는 PCR 반응에서 주형으로서 사용될 수 있다.

PCR 단계는 다양한 열안정성 DNA-의존 DNA 중합효소를 사용할 수 있지만, 이는 전형적으로 Taq DNA 중합효소를 이용하여, 이는 5'-3' 뉴클레아제 활성을 갖지만 3'-5' 프루프리딩(proofreading) 엔도뉴클레아제 활성은 없다. 따라서, TAQMAN® PCR은 전형적으로 Taq 또는 Tth 중합효소의 5'-뉴클레아제 활성을 이용하여 이의 표적 앰플리콘(amplicon)에 결합한 혼성화 프로브를 가수분해할 수 있지만, 동등한 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 임의의 효소가 사용될 수 있다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 PCR 반응의 전형적인 앰플리콘을 생성시키는데 사용된다. 제3의 올리고뉴클레오타이드 또는 프로브는 2개의 PCR 프라이머 사이에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 탐지하도록 설계된다. 프로브는 Taq DNA 중합효소에 의해 확장되지 않으며, 리포터 형광 염료 및 소광제(quencher) 형광 염료를 사용하여 표지된다. 리포터 염료로부터의 임의의 레이저 유도 방출은 2개의 염료가 프로브 상에 있으므로 서로 근접하게 위치하면 소광 염료에 의해 소광된다. 증폭 반응 동안, Taq DNA 중합효소는 주형에 의존하는 방식으로 프로브를 절단한다. 생성된 프로브 단편은 용액 중에 해리되고, 방출된 리포터 염료로부터의 신호는 제2 형광단의 소광 효과를 받지 않는다. 리포터 염료의 한 분자는 합성된 각각의 새로운 분자로부터 유리되고, 비소광된 리포터 염료의 탐지는 데이터의 정량적인 해석의 기초를 제공한다.

TAQMAN® PCR은 상업적으로 입수가능한 장치, 예를 들어 ABI PRISM 7700® 시퀀스 디텍션 시스템(Sequence Detection System)®(퍼킨-엘머-어플라이드 바이오시스템즈(Perkin-Elmer-Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티), 또는 라이트사이클러(Lightcycler)(로체 몰레큘라 바이오케미칼즈(Roche Molecular Biochemicals), 독일 만하임)를 사용하여 수행될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 5' 뉴클레아제 절차는 정량적 실시간 PCR 장치, 예컨대 ABI PRISM 7700® 시퀀스 디텍션 시스템 상에서 수행된다. 이 시스템은 열순환기, 레이저, 전하결합소자(CCD), 카메라 및 컴퓨터로 이루어진다. 이 시스템은 열순환기 상의 96-웰 포맷으로 샘플을 증폭시킨다. 증폭 동안, 레이저 유도 형광 신호가 모든 96 웰에 대해 광섬유 케이블을 통해 실시간으로 수집되고, CCD에서 탐지된다. 이 시스템은 기구를 실행하고 데이터를 분석하기 위한 소프트웨어를 포함한다.

5'-뉴클레아제 측정 데이터는 초기에 Ct, 또는 역치 주기로 나타난다. 상기에서 검토한 바와 같이, 형광치가 모든 주기 동안 기록되고, 증폭 반응에서 그 지점으로 증폭된 생성물의 양을 나타낸다. 형광 신호가 통계적으로 현저하게 처음 기록된 지점이 역치 주기(Ct)이다.

예러와 샘플-대-샘플 변동 효과를 최소화하기 위해, PCR은 대개 내부 표준을 사용하여 수행된다. 이상적인 내부 표준은 상이한 조직 중에서 일정한 수준에서 나타나고, 실험적인 처리에 의해 영향받지 않는다. 유전자 발현 패턴을 정상화하는데 가장 최근에 사용되는 RNA는 하우스키핑 유전자 글리세르알데히드-3-포스페이트-데하이드로제나제 (GAPDH) 및 P-액틴에 대한 mRNA이다.

PCR 기술의 보다 최근의 변형은 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)이며, 이는 이중으로 표지된 플루오르 유전자 프로브(즉, TAQMAN® 프로브)를 통한 PCR 생성 축적을 측정한다. 실시간 PCR은, 각각의 표적 서열에 대한 내부 길항제가 정상화를 위해 사용되는 정량적 길항적 PCR 및 샘플 내에 함유된 정상화 유전자 또는 PCR을 위한 하우스키핑 유전자를 사용하는 정량적 대비 PCR 모두와 융화성이 있다. 보다 상세한 사항은 예를 들어 문헌 [Held et al., Genome Research 6:986-994 (1996)]을 참조한다.

mRNA 단리, 정제, 프라이머 확장 및 증폭을 포함하며, RNA 원천으로서 고정되고 파라핀-포매 조직을 사용하는 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 대표적인 프로토콜의 단계는 다양한 간행된 저널에 나타나 있다(예를 들어, 문헌 [Godfrey et al., J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000)]; [Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)]). 요약하면, 대표적인 방법은 파라핀-포매 종양 조직 샘플의 약 10 µg 비후 부분을 절단하는 것으로 시작한다. 그 다음에, RNA는 추출되고, 단백질 및 DNA는 제거된다. RNA 농도의 분석 후, RNA 복구 및/또는 증폭 단계가 필요한 경우 포함될 수 있고, RNA는 유전자 특이적 프로모터를 사용하여 역전사된 후, PCR을 수행한다.

본 발명의 한 측면에 따르면, PCR 프라이머 및 프로브는 증폭될 유전자에 존재하는 인트론 서열에 기초하여 설계된다. 이 실시양태에서, 프라이머/프로브 설계에서의 제1 단계는 유전자 내의 인트론 서열의 묘사이다. 이는 공중에서 입수가 가능한 소프트웨어, 예컨대 문헌 [Kent, W., Genome Res. 12(4):656-64 (2002)]에 의해 개발된 DNA BLAT 소프트웨어에 의해, 또는 이의 변형을 포함하는 BLAST 소프트웨어에 의해 수행될 수 있다. 후속 단계는 잘 발달된 PCR 프라이머 및 프로브 설계 방법을 뒤따른다.

비특이적인 신호를 피하기 위해, 프라이머와 프로브를 설계할 때 인트론 내의 반복적인 서열을 마스킹하는 것이 중요하다. 이는 베일러 칼리지 오브 메디신(Baylor College of Medicine)을 통해 온라인으로 입수가 가능한 리피트 마스커(Repeat Masker) 프로그램을 사용하여 쉽게 달성할 수 있으며, 이 프로그램은 반복적인 요소의 라이브러리에 대한 DNA 서열을 스크리닝하고, 반복적인 요소가 마스킹되는 조회 서열을 회복시킨다. 그 다음에, 마스킹된 인트론 서열은, 임의의 상업적으로 또는 다르게 입수가 가능한 프라이머/프로브 설계 패키지, 예컨대 프라이머 익스프레스(Primer Express)(어플라이드 바이오시스템즈); MGB 어세이-바이-디자인(assay-by-design)(어플라이드 바이오시스템즈); 프라이머3(문헌 [Rozen and Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386])을 사용하여 프라이머 및 프로브 서열을 설계하는데 사용될 수 있다.

PCR 프라이머 설계에서 고려되는 인자는 프라이머 길이, 용융 온도(Tm) 및 G/C 함량, 특이성, 상보 프라이머 서열, 및 3'-말단 서열을 포함한다. 일반적으로, 최적의 PCR 프라이머는 일반적으로 17 내지 30 염기의 길이를 갖고, 약 20 내지 80%, 예를 들어 50 내지 60% G+C 염기를 함유한다. 50 내지 80°C, 예를 들어 약 50 내지 70°C의 Tm이 전형적으로 바람직하다.

PCR 프라이머 및 프로브 설계에 대한 추가의 가이드라인은, 예를 들어 문헌 [Dieffenbach et al., "General Concepts for PCR Primer Design" in: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp.133-155]; [Innis and Gelfand, "Optimization of PCRs" in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp.5-11]; 및 [Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997)]을 참조하며, 이의 전체 개시사항은 본원에 참고문헌으로 인용된다.

(iii) 마이크로어레이

차별적 유전자 발현 또한 마이크로어레이 기술을 사용하여 식별되거나 또는 확인될 수 있다. 따라서, 유방암 관련 유전자의 발현 프로파일은 마이크로어레이 기술을 사용하여 새로운 또는 파라핀-포매된 종양 조직에서 측정될 수 있다. 이 방법

에서, 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열(cDNA 및 올리고뉴클레오티드 포함)은 마이크로칩 기판 상에 플레이팅되거나 또는 어레이된다. 그 다음에, 어레이된 서열은 목적하는 세포 또는 조직으로부터 특이적 DNA 프로브를 사용하여 혼성화된다. PCR 방법에서와 같이, mRNA의 원천은 전형적으로 인간 종양 또는 종양 세포주 및 상응하는 정상적인 조직 또는 세포주로부터 단리된 전체 RNA이다. 따라서, RNA는 다양한 원발성 종양 또는 종양 세포주로부터 단리될 수 있다. mRNA의 원천이 원발성 종양인 경우, mRNA는 예를 들어 동결되거나 또는 저장된 파라핀-포매되고 고정된(예를 들어, 포르말린 고정) 조직 샘플로부터 추출될 수 있으며, 이는 매일의 임상에서 일상적으로 준비되고 보존되는 것이다.

마이크로어레이 기술의 특정 실시양태에서, cDNA 클론의 PCR 증폭 삽입물이 조밀한 어레이 중 기질에 가해진다. 바람직하게는, 10,000 이상의 뉴클레오티드 서열이 기질로 가해진다. 각각 10,000 요소에서 마이크로칩 상에 고정된 마이크로어레이된 유전자는 엄격한 조건 하에서의 혼성화에 적합하다. 형광으로 표지된 cDNA 프로브는 목적하는 조직으로부터 추출된 RNA의 역전사에 의해 형광 뉴클레오티드의 혼입을 통해 생성될 수 있다. 칩에 가해진 표지된 cDNA 프로브는 어레이 상의 각각의 DNA 지점에서 특이적으로 혼성화한다. 비특이적으로 결합한 프로브를 제거하기 위한 엄격한 세척 후, 동일 초점 레이저 현미경에 의해 또는 다른 탐지법, 예컨대 CCD 카메라에 의해 칩을 스캔한다. 각각의 어레이된 요소의 혼성화의 정량화는 상응하는 mRNA 과다를 평가할 수 있게 한다. 이중 색상 형광으로, 2가지 RNA 원천으로부터 생성된 구별되게 표지된 cDNA 프로브는 한 쌍으로 혼성화된다. 따라서, 각각의 특이적인 유전자에 상응하는 2개의 원천으로부터의 전사체의 상대적인 양이 동시에 측정된다. 혼성화의 축소된 규모는 상당한 수의 유전자에 대한 발현 패턴의 편리하고 빠른 평가를 가능케 한다. 이러한 방법은, 세포 당 적은 수의 복제로 나타나는 드문 전사체를 탐지하고, 발현 수준으로 대략 2배 이상의 차이를 재현가능하게 탐지하는데 필요한 민감도를 갖는 것으로 나타났다(문헌 [Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2):106-149 (1996)]). 마이크로어레이 분석은, 예컨대 어픽시메트릭스 젠칩(Affymetrix GENCHIP™) 기술, 또는 인사이트(Incyte)의 마이크로어레이 기술을 사용하여, 상업적으로 입수가능한 장비에 의해 수행될 수 있으며, 이후 제조자의 프로토콜을 따른다.

유전자 발현의 대규모 분석을 위한 마이크로어레이 방법의 개발은 암 분류의 분자 마커 및 다양한 종양형에서의 결과 예측의 체계적인 조사를 가능케 한다.

(iv) 유전자 발현 연속 분석(SAGE)

유전자 발현 연속 분석(SAGE)은 각각의 전사에 대한 개별 혼성화 프로브를 제공할 필요 없이 상당한 수의 유전자 전사의 동시적이고 정량적인 분석을 가능하게 하는 방법이다. 먼저, 전사체를 특이적으로 식별할 수 있는 충분한 정보를 함유한 단서열 태그(약 10 내지 14 bp)를 생성시키되, 이 태그는 각각의 전사체 내에서 특이적인 위치에서 얻어지는 것이다. 그 다음에, 다수의 전사체가 서로 연결되어 서열분석될 수 있는 긴 연속 분자를 형성하며, 동시에 다수의 태그의 동일성(identity)을 드러낸다. 임의의 전사체 집단의 발현 패턴은 개별 태그의 양을 측정하고, 각각의 태그에 상응하는 유전자를 식별함으로써 정량적으로 평가될 수 있다. 보다 상세한 사항은 예를 들어 문헌 [Velculescu et al., Science 270:484-487 (1995)]; 및 [Velculescu et al., Cell 88:243-51 (1997)]을 참조한다.

(v) 매스어레이(MassARRAY) 기술

매스어레이(시퀀놈(Sequenom), 미국 캘리포니아주 샌디에고) 기술은 탐지를 위해 질량 분석법(MS)을 사용하는, 자동화된 고처리량의, 유전자 발현 분석 방법이다. 이 방법에 따르면, RNA의 단리, 역전사 및 PCR 증폭 후, cDNA가 프라이머 확장을 겪는다. cDNA 유도 프라이머 확장 생성물은 정제되고, MALDI-TOF MS 샘플 준비를 위해 필요한 성분을 갖는 예비로딩된 칩 어레이 상에 투여된다. 반응에서 다양한 cDNA가 얻어진 질량 스펙트럼에서의 피크 영역을 분석하여 정량화된다.

(vi) 대량 평행 특이 서열분석(MPSS)에 의한 유전자 발현 분석

문헌 [Brenner et al., Nature Biotechnology 18:630-634 (2000)]에 기술된 이 방법은 개별적인 5 μ g 직경의 마이크로비드 상의 수만개의 주형의 시험관내 클로닝과 겔에 기초하지 않는 특이 서열분석을 조합한 서열분석 접근법이다. 먼저, DNA 주형의 마이크로비드 라이브러리를 시험관내 클로닝으로 구축한다. 고밀도의 (전형적으로 3×10^6 마이크로비드/ cm^2) 유동 세포에서 주형을 함유하는 마이크로비드의 평면 어레이의 어셈블리가 뒤따른다. 각각의 마이크로비드 상의 클로닝된 주형의 자유 말단은 DNA 단편 분리를 요구하지 않는 형광 기초 특이 서열분석법을 사용하여 동시에 분석된다. 이 방법은 단일 조작으로 효모 cRNA 라이브러리로부터의 수십만개의 유전자 특이 서열분석을 동시에 그리고 정확하게 제공하는 것임을 보여주었다.

(vii) 면역조직화학

면역조직화학법 또한 본 발명의 예후 마커의 발현 수준을 탐지하기에 적합하다. 따라서, 항체 또는 항혈청, 바람직하게는 폴리클로날 항혈청, 가장 바람직하게는 각각의 마커에 특이적인 모노클로날 항체가 발현을 탐지하는데 사용된다. 항체는 예를 들어, 방사성 표지, 형광 표지, 합텐 표지, 예컨대 비오틴, 또는 효소, 예컨대 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 인산분해효소를 사용하여 항체 자체의 직접 표지에 의해 탐지될 수 있다. 다르게는, 표지되지 않은 일차 항체가 일차 항체에 특이적인 항혈청, 폴리클로날 항혈청 또는 모노클로날 항체를 포함하는 표지된 이차 항체와 함께 사용된다. 면역조직화학 프로토콜 및 키트는 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 입수가능하다.

(viii) 프로테오믹스(Proteomics)

"프로테오믹스(Proteome)"이란 용어는 특정 시간의 지점에서 샘플(예를 들어, 조직, 유기체 또는 세포 배양)에 존재하는 단백질 전체를 정의된다. 프로테오믹스는 다른 것들 중 샘플 중에서 단백질 발현의 전체적인 변화를 연구하는 것을 포함한다("발현 프로테오믹스"로도 지칭됨). 프로테오믹스는 전형적으로 이하의 단계를 포함한다: (1) 2-D 젤 전기영동(2-D PAGE)에 의한 샘플에서 개별 단백질의 분리; (2) 예를 들어 질량 분석법 또는 N-종결 서열분석에 의한 겔로부터 회수된 개별 단백질의 식별, 및 (3) 생물정보학을 사용한 데이터의 분석. 프로테오믹스법은 유전자 발현 프로파일링의 다른 방법에 대한 유용한 보충법이며, 단독으로 또는 다른 방법과 함께 사용되어 본 발명의 예후 마커의 생성물을 탐지할 수 있다.

(ix) mRNA 단리, 정제 및 증폭의 일반적인 기술

mRNA 단리, 정제, 프라이머 확장 및 증폭을 포함하는, RNA 원천으로서 고정되고 파라핀-포매된 조직을 사용하는 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 대표적인 프로토콜 단계는 다양한 간행된 저널에 나타나 있다(예를 들어, 문헌 [Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000)]; [Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)]). 요약하면, 대표적인 방법은 파라핀-포매 종양 조직 샘플의 약 10 μ g 비후 부분을 절단하는 것으로 시작한다. 그 다음에, RNA는 추출되고, 단백질 및 DNA는 제거된다. RNA 농도의 분석 후, RNA 복구 및/또는 증폭 단계가 필요한 경우 포함될 수 있고, RNA는 유전자 특이적 프로모터를 사용하여 역전사된 후, PCR을 수행한다. 최종적으로, 데이터를 분석하여 분석된 종양 샘플에서 확인된 특징적인 유전자 발현 패턴에 기초하여 환자에게 이용가능한 가장 최상의 선택할 수 있는 치료 방법(들)을 확인한다.

III. 항체의 생산

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

(i) 폴리클로날 항체

폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하(sc) 또는 복막내(ip) 주사에 의해 동물에서 발생된다. 이는 면역화되어야 할 중, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 이관능성 또는 유도체화제를 이용한 대두 트립신 억제제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 컨쥬게이션), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통해), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)에서 관련 항원을 면역원성인 단백질에 컨쥬게이션하는데 유용할 수 있다.

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

(ii) 모노클로날 항체

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

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

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

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

하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 항원에 대해 지정된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법에 의해, 또는 방사성면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석법에 의해 측정된다.

모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.

목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법에 의해 성장시킨다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 상기 목적에 적합한 배양 배지로는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 들 수 있다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서의 복수 종양으로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.

서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 적합하게는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 항체 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 분리한다.

모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고, 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 단리하면, DNA를 발현 벡터 내에 위치시킨 후, 이. 콜라이(*E. Coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 다르게는 항체 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포 내의 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 해설 논문으로는 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)]을 들 수 있다.

추가 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여, 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에는 각각 파지 라이브러리를 이용한 무린 및 인간 항

체의 단리가 기재되어 있다. 후속 간행물에는 사슬 셔플링(shuffling)에 의한 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합이 기재되어 있다 (문헌 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)]). 따라서, 상기 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.

DNA는 또한 예를 들어 동종 뮤린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다.

전형적으로, 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 이들로 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.

(iii) 인간화 항체

비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되었다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 그로 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라, 추가 변 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행된다 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 비손상인 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 제4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 추가 변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

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

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

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

본원에서 관심의 예시적인 인간화 항체는 가변 중쇄 상보성 결정 잔기 GFTFTDYTMX (여기서, X는 바람직하게는 D 또는 S임) (서열 7); DVNPNSSGSIYNQRFKG (서열 8); 및/또는 NLGPSFYFDY (서열 9)를 포함하며, 임의로 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 포함하고, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 관심있는

항체 변이체는 상기 가변 중쇄 CDR 서열에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 4의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

인간화 항체는 예를 들어 선행 문단의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에 가변 경쇄 상보성 결정 잔기 KASQDVSIGVA (서열 10); SASYX¹X²X³ (여기서, X¹은 바람직하게는 R 또는 L이고, X²는 바람직하게는 Y 또는 E이고, X³은 바람직하게는 T 또는 S임) (서열 11); 및/또는 QQYYIYPYT (서열 12)를 포함할 수 있다. 이러한 인간화 항체는 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 임의로 포함하며, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 관심있는 항체 변이체는 상기 가변 경쇄 CDR 서열에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 3의 가변 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

본 출원은 또한 HER2에 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 친화도 성숙된 항체를 고려한다. 모 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체, 예를 들어 각각 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및/또는 가변 중쇄 서열을 포함하는 것 (즉, 변이체 574)일 수 있다. 친화도 성숙된 항체는 바람직하게는 뮤린 2C4 또는 변이체 574의 것보다 우수한 친화도 (예를 들어 HER2-세포의 도메인 (ECD) ELISA를 이용하여 평가된 바로, 예를 들어 약 2배 또는 4배 내지 약 100배 또는 약 1000배 개선된 친화도)로 HER2 수용체에 결합한다. 치환을 위한 예시적인 가변 중쇄 CDR 잔기로는 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 또는 2종 이상 (상기 잔기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 조합을 들 수 있다. 변형을 위한 가변 경쇄 CDR 잔기의 예로는 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97, 또는 2종 이상 (상기 잔기 2 내지 3, 4, 5개 또는 약 10개 이하)의 조합을 들 수 있다.

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

(iv) 인간 항체

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

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

상기 논의한 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

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

(v) 항체 단편

1 이상의 항원 결합 영역을 포함하는 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비손상 항체의 단백질을 분해성 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어 문헌 [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 상기 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]). 또다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택의 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

(vi) 이중특이적 항체

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

WO 96/16673에는 이중특이적 HER2/FcγRIII 항체가 기재되어 있으며, 미국 특허 제5,837,234호에는 이중특이적 HER2/FcγRI 항체 IDM1 (오시템(Osidem))이 기재되어 있다. 이중특이적 HER2/Fcα 항체는 WO 98/02463에 나타나 있다. 미국 특허 제5,821,337호는 이중특이적 HER2/CD3 항체를 교시한다. MDX-210은 이중특이적 HER2-FcγRIII Ab이다.

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

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

상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성 면역글로불린 중쇄, 및 다른 팔에 혼성 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 단지 절반 내의 면역글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 목적하는 이중특이적 화합

물의 원하지 않는 면역글로불린 쇠 조합물로부터의 분리를 용이하게 한다. 상기 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 보다 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)]을 참조한다.

미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또다른 접근법에 따르면, 항체 분자의 쌍 사이의 계면을 유전자조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수된 이중이량체의 퍼센트를 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 적어도 일부의 C_H3 도메인을 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)으로 대체된다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보충적 "공동"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

이중특이적 항체는 가교된 또는 "헤테로컨쥬게이트" 항체를 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨쥬게이트 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위한 것으로 제안된다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 또한 문헌에 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]에는 비손상 항체를 단백질을 분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 상기 단편을 티올 작용화제 나트륨 아르세나이트의 존재하에서 환원시켜 근접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민을 사용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 다른 Fab'-TNB 유도체의 동물량과 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.

최근의 진보는 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접적 회수를 용이하게 했다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 제조가 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분리하고, 지정 시험관내 화학적 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체 및 정상 인간 T 세포를 과발현하는 세포에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

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

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

(vii) 다른 아미노산 서열 변형

본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산 내로 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또

는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구조물이 목적하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구조물에 도달한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 항체의 번역후 과정을 변화시킬 수 있다.

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

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

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

[표 1]

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

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

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

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

(3) 산성: Asp (D), Glu (E)

(4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

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

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

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) 산성: Asp, Glu;

(4) 염기성: His, Lys, Arg;

(5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원으로 또다른 구성원을 교환하는 것을 수반할 것이다.

또한, 일반적으로 항체의 완전한 형태를 유지하는데 관련되지 않는 임의의 시스테인 잔기를 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)을 항체에 첨가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편일 경우).

특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어 인간화 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 체시를 사용한 친화도 성숙을 포함한다. 간략히, 몇몇 추가변 영역 부위 (예를 들어 6 내지 7 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노치환을 생성할 수 있다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물체의 융합으로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 일가 형태로 제시된다. 그 후, 파지-제시된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발법을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법으로, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 인간 HER2 사이의 접촉 지점을 확인하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에 설명된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.

항체의 또다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 원래 글리코실화 패턴을 변경한다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분을 결실시키고/거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다.

항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에

상기 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당, 즉 N-아세틸 갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록실리신도 사용될 수 있다.

글리코실화 부위의 항체와의 첨가는 편리하게는 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대해). 변경은 또한 원래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 그것으로의 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해).

항체가 Fc 영역을 포함할 경우, 그에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체는 프레스타, 엘.(Presta, L.)의 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 A1 (교와 하코 고교 가부시끼가이샤(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))를 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내에 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 장-메레(Jean-Mairet) 등의 WO 03/011878 및 우마나(Umana) 등의 미국 특허 제6,602,684호에 기재되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 파텔(Patel) 등의 WO 97/30087에 보고되어 있다. 또한, 그의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관한 WO 98/58964 (라주, 에스.(Raju, S.) 및 WO 99/22764 (라주, 에스.)를 참조한다.

예를 들어 항체의 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 상보적 의존성 세포독성 (CDC)을 증진시키기 위해, 본 발명의 항체를 효과기 기능에 대해 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 시스템 잔기(들)을 Fc 영역에 도입하여 상기 영역에서 쇠간 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체성 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 상보적-매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 증진된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체성 항체는 또한 문헌 [Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이중이 관능성 가교제를 사용하여 제조될 수 있다. 별법으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖고 그에 의해 증진된 상보적 용해 및 ADCC 능력을 가지도록 유전자조작될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

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

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

항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편) 내로 혼입할 수 있다. 본원에서 사용된 "구조 수용체 결합 에피토프"라는 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 개선된 결합 및 증가된 반감기를 갖는 항체들은 WO 00/42072 (프레스타, 엘.)에 기재되어 있다. 이들 항체들은 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환을 가지는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들면, Fc 영역은 1개 이상의 위치 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434에 치환을 가질 수 있다. 개선된 FcRn 결합을 가지는 바람직한 Fc 영역-포함 항체 변이체는 그의 Fc 영역의 위치 307, 380 및 434의 1, 2 또는 3개에 아미노산 치환을 포함한다.

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

항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 상기 방법으로는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드-매개된 (또는 부위-지정된) 돌연변이유발법, PCR 돌연변이유발법, 및 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이유발법에 의한 제조를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

(viii) 목적하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝

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

HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체를 확인하기 위해, HER 수용체를 발현하는 세포에의 HER 리간드 결합을 차단하는 (예를 들어 관심의 HER 수용체가 HER 헤테로-올리고머를 형성하는 또다른 HER 수용체와의 컨주게이션으로) 항체의 능력을 측정할 수 있다. 예를 들어, 천연 발현하거나 HER 헤테로-올리고머의 HER 수용체를 발현하도록 형질감염된 세포를 항체와 함께 인큐베이션한 후, 표지된 HER 리간드에 노출시킨다. 그 후, 항체가 HER 헤테로-올리고머 내의 HER 수용체에의 리간드 결합을 차단하는 능력을 평가할 수 있다.

예를 들어, HER2 항체에 의한 MCF7 유방 종양 세포주에의 HER 결합의 억제제는 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 24-웰-플레이트 포맷으로 얼음 상에서 단층 MCF7 배양물을 사용하여 수행될 수 있다. HER2 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 그 후, ^{125}I -표지된 rHRG $\beta 1_{177-224}$ (25 pm)을 첨가하고, 인큐베이션을 4 내지 16시간 동안 계속할 수 있다. 투여량 반응 곡선을 작성할 수 있고, IC_{50} 값을 관심있는 항체에 대해 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, MCF7 세포에의 HRG 결합 억제제에 대한 IC_{50} 을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석법에서 MCF7 세포에의 HRG 결합의 억제제에 대한 IC_{50} 은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

별법으로, 또는 부가적으로, 항체가 HER 헤테로-올리고머에 존재하는 HER 수용체의 HER 리간드-자극된 티로신 인산화를 차단하는 능력을 평가할 수 있다. 예를 들어, HER 수용체를 내인성으로 발현하거나 이를 발현하도록 형질감염된 세포를 항체와 함께 인큐베이션한 후, 항-포스포티로신 모노클로날 (검출가능한 표지와 임의로 컨주게이션됨)을 사용하여 HER 리간드-의존성 티로신 인산화 활성에 대해 분석할 수 있다. 미국 특허 제5,766,863호에 기재된 키나제 수용체 활성화 분석법은 또한 HER 수용체 활성화 및 항체에 의한 활성의 차단을 측정하는데 이용가능하다.

일 실시양태에서, 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같이 MCF7 세포 내의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, MCF7 세포를 24-웰 플레이트에 플레이트링하고, HER2에 대한 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, rHRG $\beta 1_{177-244}$ 를 각각의 웰에 최종 농도 0.2 nM로 첨가하고, 인큐베이션을 8분 동안 계속할 수 있다. 배지를 각각의 웰로부터 흡인하고, SDS 샘플 완충액 (5% SDS, 25 mM DTT 및 25 mM 트리스(Tris)-HCl, pH 6.8) 100 μL 의 첨가에 의해 반응을 중단시킬 수 있다. 각각의 샘플 (25 μL)을 4 내지 12% 구배 겔 (노벡스(Novex)) 상에서 전기영동한 후, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전기영동적으로 옮길 수 있다. 항포스포티로신 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 이뮤노블롯을 전개시키고, $M_r \sim 180,000$ 에서 우세한 반응 밴드의 강도를 반사도 음영계측기에 의해 정량할 수 있다. 선별된 항체는 바람직하게는 상기 분석법에서 대조군의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 약 0 내지 35%까지 유의하게 억제할 것이다. 반사도 음영계측기에 의해 측정된 바로 p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 억제에 대한 투여량-반응 곡선을 작성하고, 관심있는 항체에 대한 IC_{50} 을 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석법에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 억제에 대한 IC_{50} 을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석법에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하기 위한 IC_{50} 은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

또한, MDA-MB-175 세포에 대한 항체의 성장 억제 효과를 예를 들어 본질적으로 문헌 [Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]에 기재된 바와 같이 평가할 수 있다. 상기 분석법에 따르면, MDA-MB-175 세포를 HER2 모노클로날 항체 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 4일 동안 처리하고, 크리스탈 바이올렛으로 염색할 수 있다. HER2 항체와 함께 인큐베이션하는 것은 모노클로날 항체 2C4에 의해 제시된 것과 유사한 상기 세포주에 대한 성장 억제 효과를 나타낼 수 있다. 추가의 실

시양태에서, 외인성 HRG는 상기 억제제를 상당히 반전시킬 것이다. 바람직하게는, 항체는 MDA-MB-175 세포의 세포 증식을 외인성 HRG의 존재 및 부재 둘다 하에서 모노클로날 항체 4D5보다 더 큰 정도로 (및 임의로 모노클로날 항체 7F3보다 큰 정도로) 억제할 수 있다.

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

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

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

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

(ix) 페르투주마브 조성물

일 실시양태에서, HER2 항체 조성물은 주요종 페르투주마브 항체 및 1 이상의 그의 변이체의 혼합물을 포함한다. 본원의 페르투주마브 주요종 항체의 바람직한 실시양태는 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열 (서열 3 및 4)을 포함하는 것이며, 가장 바람직하게는 서열 13 및 17로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열 및 서열 14 및 18로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 (이들의 탈아미드화 및/또는 산화된 변이체를 포함)을 포함하는 것이다. 일 실시양태에 있어서, 조성물은 주요종 페르투주마브 항체 및 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체의 혼합물을 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체 변이체의 경쇄 상에 (예를 들어 항체 변이체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에) 있다. 주요종 HER2 항체 또는 항체 변이체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 F(ab')_2 단편의 Fab)일 수 있지만, 바람직하게는 둘다 전장 항체이다. 본원의 항체 변이체는 그의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 상에 아미노-말단 선도자 연장물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 있다. 아미노-말단 선도자 연장물은 바람직하게는 VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다. 조성물 중의 아미노-말단 선도자 연장물의 존재는 N-말단 서열 분석, 전하 이질성에 대한 분석법 (예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동법), 질량 분광

법 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 분석 기술에 의해 검출될 수 있다. 조성물 중의 항체 변이체의 양은 일반적으로 변이체를 검출하는데 사용되는 임의의 분석법 (바람직하게는 N-말단 서열 분석)의 검출 하한을 구성하는 양 내지 주요 종 항체의 양 미만의 양의 범위이다. 일반적으로, 조성물 중의 약 20% 이하 (예를 들어 약 1% 내지 약 15%, 예를 들어 5% 내지 약 15%)의 항체 분자가 아미노-말단 선도자 연장물을 포함한다. 이러한 퍼센트 양은 바람직하게는 정량적 N-말단 서열 분석 또는 양이온 교환 분석을 사용하여 (바람직하게는 프로파크(PROPAC) WCX-10™ 양이온 교환 컬럼과 같은 고분해능 약 양이온-교환 컬럼을 사용하여) 측정된다. 아미노-말단 선도자 연장물 변이체 이외에, 그의 중쇄 하나 또는 둘 다 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체, 탈아미드화 항체 변이체 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, 주요종 항체 및/또는 변이체의 추가의 아미노산 서열 변경이 고려된다.

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

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

(x) 이뮤노컨쥬게이트

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

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

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

관심의 또다른 이뮤노컨쥬게이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 컨쥬게이션된 항체를 포함한다. 항생제의 칼리케아미신 측은 서브-피코몰 농도에서 이중-가닥 DNA 파쇄를 생성할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체로는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 θ_1^I (문헌 [Hinman et al. *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993)] 및 [Lode et al. *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)])을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본원에 명백히 참고로 도입된 미국 특허 제5,714,586호; 제5,712,374호; 제5,264,586호; 및 제5,773,001호를 참조한다.

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

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

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

항체와 세포독성제의 컨쥬게이트는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄 벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨릴렌 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)와 같은 다양한 이관능성 단백질 커플링제를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드의 항체에의 컨쥬게이션을 위한 예시적인 킬레이트제화이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다제-감수성 링커, 디메틸 링커 또는 디설피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)])를 사용할 수 있다.

별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

다른 이뮤노컨쥬게이트들이 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다.

본원에 개시된 항체는 또한 이뮤노리포솜으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 미국 특허 제 4,485,045호 및 제 4,544,545호; 및 1997년 10월 23일자로 공개된 WO 97/38731에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 제 5,013,556호에 개시되어 있다.

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

IV. 제약 제제

본 발명에 따라 사용되는 항체의 치료 제제는 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 바람직한 정도의 순도를 갖는 항체를 혼합함으로써 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]) 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로펠 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터-이온; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 들 수 있다. 동결건조된 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있으며, 이는 참고문헌으로서 본원에 의해 명시적으로 인용되고 있다. 치료 용도로 바람직한 페르투주마브 제제는 pH 6.0에서, 20 mM 히스티딘 아세테이트 중 30 mg/mL 페르투주마브, 120 mM 수크로스, 0.02 % 폴리소르베이트 20을 포함한다. 다른 페르투주마브 제제는 pH 6.0에서, 25 mg/mL 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl 완충액, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함한다.

본원의 제제는 또한 치료될 특정 증상에 필요한 2종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 보충적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. HER 억제제와 조합될 수 있는 다양한 약물들은 하기 치료 방법 부분에 설명되어 있다. 그러한 분자들은 적합하게는, 의도되는 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 존재한다.

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

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

생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

V. HER 억제제를 이용한 치료

상기 언급된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는 환자는 페르투주마브와 같은 HER 억제제를 이용한 치료에 대한 후보자이다. 치료될 수 있는 다양한 암들의 예들은 상기 정의 부분에 열거되어 있다. 본 방법은 난소암, 복막암 또는 난관암; 유방암, 예를 들어 전이성 유방암(MBC), 비-HER2 과발현 유방암; 및 비소세포 폐암(NSCLC)의 치료에 특히 이용가능한 것으로 여겨진다. 한 가지 실시양태에서, 치료되는 암은 화학치료-내성 암 또는 백금-내성 암이다. 상기 발현 프로파일을 갖는 환자의 치료는 암의 징후 또는 증상들의 개선을 야기할 것이다. 예를 들어, 그러한 치료법은 상기 발현 프로파일을 보이지 않는 환자에 비해 생존(전체 생존 및/또는 진행 없는 생존)의 개선을 야기하고/하거나, 객관적인 임상적 반응(부분적 또는 완전한)을 야기할 수 있다.

암 뿐 아니라, HER 억제제는 상기 언급한 발현 프로파일을 갖는 다양한 비-악성 질환 또는 장애들을 치료하는데 사용될 수 있다. 그러한 비-악성 질환 또는 장애들에는 자가면역 질환(예를 들어 건선; 상기 정의 참조); 자궁내막증; 피부경화증; 재협착; 결장 폴립, 비폴립 또는 위장관 폴립과 같은 폴립; 섬유선종; 호흡기 질환(상기 정의 참조); 담낭염; 신경섬유종증; 다낭성 신병; 염증성 질환; 건선 및 피부염을 비롯한 피부 장애; 혈관 질환(상기 정의 참조); 혈관 상피 세포의 비정상적 증식과 관련된 상태; 위장관 궤양; 메네트리에병, 젯분비호르몬비 선종 또는 단백질 소실 증후군; 신장 장애; 혈관신생 장애; 연령 관련된 황반 퇴행, 안 히스토플라즈마 증후군, 증식성 당뇨병성 망막병증으로부터의 망막 혈관신생, 망막 혈관신생, 당뇨병성 망막병증, 또는 연령 관련된 황반 퇴행과 같은 안 장애; 골관절염, 구루병 및 골다공증과 같은 관련된 병리학; 뇌 허혈 이벤트 후 손상; 간 경화증, 폐 섬유증, 카르코이도시스(caroidosis), 갑상선염, 과다점성 증후군, 전신 오슬러 웨버-렌두(Osler Weber-Rendu)병, 만성 폐쇄성 폐 질환, 또는 화상, 외상, 방사선, 뇌졸중, 저산소증 또는 허혈 후 부종과 같은 섬유성 또는 부종성 질환; 피부의 과민성 반응; 당뇨병성 망막병증 및 당뇨병성 신장병증; 길랑-바레 증후군; 이식편 대 숙주 질환 또는 이식 거부반응; 과체중; 골 또는 관절 염증; 광노화 (예를 들어 인간 피부의 UV 방사선에 의해 유발됨); 양성 전립선 비대증; 아테노바이러스, 한타바이러스, 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 예르시니아(Yersinia) 종 및 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis)로부터 선택된 미생물 병원균을 비롯한 특정 미생물 감염; 혈소판 응고에 의해 유발된 혈전; 자궁내막증, 난소 과다자극 증후군, 자간전증, 기능부전 자궁 출혈, 또는 불규칙과다월경과 같은 생식기 상태; 윤활막염; 죽종; 급성 및 만성 신장병증 (증식성 사구체신염 및 당뇨병-유도된 신장 질환 포함); 습진; 비대성 흉터 형성; 내독소성 쇼크 및 진균 감염; 가족성 선종증 폴립증; 신경퇴행성 질환 (예를 들어 알츠하이머병, AIDS-관련된 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 망막 색소변성, 척수 근육 위축증 및 소뇌 변성); 골수형성이상 증후군; 재생불량성 빈혈; 허혈 손상; 폐, 신장 또는 간의 섬유증; T-세포 매개된 과민 질환; 영아 비후성 유문 협착증; 요로 폐쇄증; 건선성 관절염; 및 하지모도 갑상선염이 포함된다. 본원에서 치료요법을 위한 바람직한 비-악성증양 증상으로는 건선, 자궁내막증, 피부경화증, 혈관 질환 (예를 들어 재협착, 아테롬성동맥경화증, 심장 동맥 질환 또는 고혈압), 결장 폴립, 섬유선종 또는 호흡기 질환 (예를 들어 천식, 만성 기관지염, 기관지확장증 또는 만성 섬유증)이 포함된다.

바람직하게는, 투여되는 항체는 네이키드(naked) 항체이다. 그러나, 투여되는 항체는 세포독성제와 컨쥬게이션될 수 있다. 바람직하게는, 결합된 이뮤노컨쥬게이트 및/또는 항원은 세포에 의해 내재화되어 이것이 결합하는 암 세포를 사멸시키

는 이뮤노컨쥬게이트의 증가된 치료 효능을 초래한다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포 내의 핵산을 표적화하거나 간섭한다. 이러한 세포독성제의 예로는 마이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 들 수 있다.

HER2 억제제는 예를 들어 식피로서 정맥내 투여, 또는 시간의 경과에 따른 연속 주입, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 동맥내, 윤향막내, 수막강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해서와 같은 공지된 방법에 따라 인간 환자에게 투여된다. 항체의 정맥내 투여가 바람직하다.

질환의 예방 또는 치료를 위해, HER 억제제의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 질환의 종류, 질환의 중증도 및 과정, 약물이 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료요법, 환자의 임상적 병력 및 약물에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 의존할 것이다. HER2 억제제는 적합하게는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 종류 및 중증도에 따라, HER 억제제 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 mg/kg (예를 들어 0.1 내지 20 mg/kg)이 예를 들어 하나 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. HER 항체의 바람직한 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 하나 이상의 투여량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 투여량은 간헐적으로, 예를 들어 매주마다 또는 매 3주마다 (예를 들어 환자가 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 투여량의 HER 항체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 초기의 보다 높은 부하 투여량 후 하나 이상의 보다 낮은 투여량이 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, HER 항체는 대략 매 3주마다 대략 840 mg 후 대략 420 mg의 부하 투여량으로서 투여된다. 다른 실시양태에서, HER 항체는 대략 매 3주마다 대략 1050 mg의 투여량으로서 투여된다.

질환이 암인 경우, 환자는 바람직하게는, HER 억제제, 및 하나 이상의 화학요법제(들)의 조합물로 치료된다. 바람직하게는, 하나 이상의 화학요법제는 젬시타빈과 같은 항대사물 화학요법제이다. 조합 투여에는 별도 제제 또는 하나의 제약학적 제제를 이용한 공투여 또는 동시 투여, 및 연속 투여(순서 무관)가 포함되며, 여기서 바람직하게는 두 활성제 모두(또는 모든 활성제)가 동시에 그들의 생물학적 활성을 수행하는 기간이 존재한다. 따라서, 항대사물 화학요법제는 HER 억제제가 투여되기 전에, 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 이 실시양태에서, 적어도 한 번의 항대사물 화학요법제 투여 및 적어도 한 번의 HER 억제제 투여 사이의 시간은 바람직하게는 약 1달 이하, 가장 바람직하게는 약 2주 이하이다. 다르게는, 항대사물 화학요법제 및 HER 억제제는 단일 제제 또는 별도의 제제들로 환자에게 동시에 투여된다. 화학요법제(예를 들어, 젬시타빈과 같은 항대사물 화학요법제) 및 HER 억제제(예를 들어, 페르투주마브)의 조합을 이용한 치료는 환자에게 상승적이거나, 부가적 이상의 치료적 이점을 야기할 수 있다.

항대사물 화학요법제는, 투여된다면, 보통 그에 대해 공지된 투여량으로 투여되거나, 임의적으로는 약물들의 조합 작용 또는 항대사물 화학요법제의 투여 때문일 수 있는 부정적 부작용 때문에 감소된 투여량으로 투여된다. 그러한 화학요법제의 제조 및 투여 계획은 제작자의 지침에 따라 이용되거나, 당업자에게 경험적으로 측정되는 바와 같이 이용될 수 있다. 항대사물 화학요법제가 젬시타빈인 경우, 바람직하게는, 예를 들어 3주 주기 중 1일째와 8일째에 약 600 mg/m² 내지 1250 mg/m²(예를 들어, 약 1000 mg/m²) 사이의 투여량으로 투여된다.

HER 억제제 및 항대사물 화학요법제 뿐 아니라, 다른 치료 계획들이 그와 조합될 수 있다. 예를 들어, 제2(제3, 제4 등)의 화학요법제(들)이 투여될 수 있으며, 여기서 제2 화학요법제는 다른 상이한 항대사물 화학요법제이거나, 항대사물질이 아닌 화학요법제이다. 예를 들어, 제2 화학요법제는 타산(예를 들어, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 카페시타빈, 또는 백금계 화학요법제(예를 들어, 카르보플라틴, 시스플라틴, 또는 옥살리플라틴), 안트라시클린(예를 들어, 독소루비신, 예를 들어 리포솜 형태의 독소루비신), 토포테칸, 페메트렉세드, 빈카 알칼로이드(예를 들어 비노렐빈), 및 TLK 286일 수 있다. 상이한 화학요법제들의 "칵테일"이 투여될 수 있다.

HER 억제제와 조합될 수 있는 다른 치료제들에는 다음의 것들 중 임의의 하나 이상이 포함된다: 제2의 상이한 HER2 항체 (예를 들어, 성장 억제성 HER2 항체, 예를 들어 트라스투주마브, 또는 HER2-과발현 세포의 아포토시스를 유도하는 HER2 항체, 예를 들어 7C2, 7F3 또는 그의 인간화 변이체); 상이한 중앙 관련된 항원에 대해 지정된 제2 항체, 예를 들어 EGFR, HER3, HER4; 항-호르몬성 화합물, 예를 들어, 항에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜, 또는 아로마타제 억제제; 심장보호제 (치료요법과 관련된 임의의 심근 기능부전을 예방하거나 감소시킴); 사이토킨; EGFR-표적된 약물 (예를 들어 타르세마(TARCEVA)®, 이레사(IRESSA)® 또는 세톡시마브); 항-혈관신생제 (특히 제넨테크에서 상표명 아바스틴(AVASTIN)™으로 판매하는 베바시주마브); 티로신 키나제 억제제; COX 억제제 (예를 들어 COX-1 또는 COX-2 억제제); 비-스테로이드성 항염증성 약물, 셀레코시브 (셀레브렉스(CELEBREX)®); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (예를 들어, 존슨 앤드 존슨(Johnson and Johnson)에서 시판되는 티피파르니브/자르네스트라(ZARNESTRA)® R115777 또는 쉐링-플루(Schering-Plough)에서 시판되는 로나파르니브 SCH66336); 중앙태아성 단백질 CA125에 결합하는 항체, 예를

들어 오레고보마브 (MoAb B43.13); HER2 백신 (예를 들어 파르멕시아(Pharmexia)의 HER2 오토 백신(Auto Vac) 백신, 또는 덴드레온(Dendreon)의 APC8024 단백질 백신, 또는 GSK/코릭사(Corixa)의 HER2 펩티드 백신); 또다른 HER 표적화 요법 (예를 들어 트라스투주마브, 세툽시마브, 게피티니브, 에를로티니브, CI1033, GW2016 등); Raf 및/또는 ras 억제제 (예를 들어, WO 2003/86467 참조); 독살; 토페데칸; 탁산; GW572016; TLK286; EMD-7200; 구역을 치료하는 의약, 예를 들어 세로토닌 길항제, 스테로이드 또는 벤조디아제핀; 국소 또는 경구 항생제를 비롯한 피부 발진을 예방 또는 치료하는 의약 또는 표준 여드름 요법; 체온-감소 의약, 예를 들어 아세트아미노펜, 디펜히드라민 또는 메페리딘; 조혈 성장 인자 등 중 임의의 1종 이상을 들 수 있다.

임의의 상기 공동투여되는 약제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 투여량이며, 상기 약제 및 HER 억제제의 조합된 작용(상승작용)에 기인하여 보다 낮아질 수 있다.

상기 치료 계획에 더하여, 환자는 암 세포의 수술 제거 및/또는 방사선 치료를 받을 수 있다.

환자에 대한 항체 단백질 투여 외에도, 본 출원은 유전자 요법에 의한 항체 또는 단백질 억제제의 투여를 고려하고 있다. 예를 들어, 유전자 요법을 이용하여 세포내 항체를 생성시키는 것에 대한 WO96/07321(1996년 3월 14일 공개)을 참고할 수 있다.

환자의 세포 내로 핵산(임의적으로는 벡터 내에 함유됨)을 도입시키는 두 가지 주된 접근법이 있다: 생체 내 및 생체 외. 생체 내 전달을 위해서는, 핵산이 보통 항체가 요구되는 부위에서, 환자에게 직접 주입된다. 생체 외 치료를 위해서는, 환자의 세포가 제거되고, 핵산이 이들 분리된 세포 내로 도입되며, 변형된 세포가 환자에게 직접 투여되거나, 또는 예를 들어 환자에게 이식되는 다공성 막 내에 캡슐화되어(예를 들어 미국 특허 제4,892,538호 및 제5,283,187호 참고) 투여된다. 생존가능한 세포 내로 핵산을 도입하는데 이용가능한 다양한 기법들이 있다. 이 기법들은 핵산이 시험관 내에서 배양된 세포 내로 전달되느냐, 또는 의도되는 숙주의 세포 내에서 생체 내 전달되느냐에 따라 달라진다. 시험관 내에서 포유동물 세포 내로 핵산을 전달하는데 적합한 기법에는 리포솜의 사용, 전기천공, 미세주입, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산칼슘 침전법 등이 포함된다. 유전자의 생체 외 전달을 위해 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

현재 바람직한 생체 내 핵산 전달 기법에는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 I 바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스) 및 지질계 시스템(유전자의 지질-매개된 전달에 유용한 지질은 예를 들어, DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 이용한 형질감염이 포함된다. 일부 경우에 있어서는, 표적 세포를 표적화하는 물질, 예를 들어 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 공급원에 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우, 엔도시토시스와 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질들, 예를 들어 특정 세포 유형에 친화적인 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 주기(cycling) 중 내부화를 수행하는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 위치화를 표적화하고, 세포내 반감기를 증가시키는 단백질이 표적화 및/또는 흡수 촉진에 사용될 수 있다. 수용체 매개 엔도시토시스의 기법은, 예를 들어 문헌 [Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)]; 및 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990)]에 설명되어 있다. 현재 공지된 유전자 표지 및 유전자 요법 프로토콜의 해설에 관해서는 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)]을 참고할 수 있다. 또한, WO 93/25673 및 그에 인용된 참고문헌들을 참고할 수 있다.

VI. 재료의 기탁

하기 하이브리도마 세포주를 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불바드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁하였다.

항체 지칭 ATCC 번호 기탁일

7C2 ATCC HB-12215 1996년 10월 17일

7F3 ATCC HB-12216 1996년 10월 17일

4D5 ATCC CRL 10463 1990년 5월 24일

2C4 ATCC HB-12697 1999년 4월 8일

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

실시예

실시예 1

HER2 인산화와 관련된 유전자 발현 프로파일

페르투주마브로 처리된 난소암 환자들로부터의 새로운 난소 종양 표본들을 선택된 유전자 하위세트들에 대한 아피메트릭스® 마이크로어레이 분석을 사용하여 유전자 발현에 대해 프로파일링하였다. 아피메트릭스® 마이크로어레이 분석은 제작자의 지침에 따라 수행하였다.

마이크로어레이 발현 데이터를 분석하여 HER2 인산화 상태와 관련되어 있을 유전자 패턴을 확인하였다. 현저하게도, EGFR, HER2, HER3, 및 HER 리간드인 베타셀룰린은 비교적 높은 수준으로 발현된 종양들이 또한 HER2 인산화에 양성인 패턴이 나타났다. 도 10은 6개의 인산화 양성 종양들 중 6개가 함께 군집화되도록 한 앞서 언급한 유전자들을 이용한 종양들의 비교사(unsupervised) 군집화를 보여준다. 도 11은 중앙값 이상의 베타셀룰린 및 HER2 발현 및/또는 중앙값 이상의 EGFR 및/또는 HER3 발현을 갖는 샘플이 양성으로 예측되는 알고리즘을 이용함으로써 난소 종양의 인산화 상태를 예측할 수 있다는 것을 보여준다. 마이크로어레이 발현 데이터를 알고리즘의 기초로 사용하였을 때, 상관관계는 6개의 HER2 인산화가 양성인 경우들 중 6개에서 양성이었고, HER2 인산화가 음성인 경우들 중 어느 것도 양성으로 예측되지 않았다.

두 번째 분석에서, HER2 인산화 상태 예측은 단일 유전자, 즉 베타셀룰린만을 이용하여 수행하였다. 도 12는 역시 마이크로어레이 발현 데이터를 사용하였을 때, 6개의 HER2 인산화 양성 종양 모두가 중앙값보다 높은 베타셀룰린 발현을 보임을 보여주었다.

실시예 2

유전자 발현 측정을 위한 마이크로어레이 분석 및 qRT-PCR의 비교

본 실시예에서는, 유전자 발현을 정량화하기 위한 두 번째 방법인 정량적 실시간 증합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 사용하여 마이크로어레이 데이터를 검증하고, 그와 비교하였다. qRT-PCR은 임상 세팅에서 입수가 가능한 전형적인 환자 샘플에서의 유전자 발현을 측정하는 바람직한 방법일 것이다. 진단 기법 플랫폼은 이 방법에 대해 이미 확립되어 있다.

qRT-PCR은 문헌 [Cronin et al., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004)]; 및 [Ma et al., Cancer Cell 5:607-616 (2004)]에 설명된 바와 같이 수행하였다. 캘리포니아주 발렌시아에 소재한 키아젠(Qiagen)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 시약들을 사용하여, RNA를 동결 난소 종양으로부터 추출하였다. 택만(TAQMAN)™ qRT-PCR 분석을 위한 프라이머 및 프로브들은 약 100 염기 이하의 앰플리콘 길이를 갖도록 설계하였다. 택만™ 기기(어플라이드 바이오시스템스(Applied BioSystems))를 이용하여 전사체를 qRT-PCR에 의해 정량화하였으며, 시험 유전자의 발현 수준을 기준 유전자의 발현 수준으로 정규화하였다. 도 13은 확립된 qRT-PCR 분석법의 기본적인 특징들을 보여준다. "하우스 키팅" 유전자인 GUS를 그 낮은 변이도 및 높은 발현 때문에 대조 유전자로 선택하였다.

먼저 마이크로어레이 측정을 검증하기 위해, qRT-PCR 결과들을 마이크로어레이에 의해 얻어진 결과들과 비교하여, 밀접한 상관관계가 존재하는지 평가하고, 이 방법에 의해서도 HER2 인산화를 예측할 수 있는지 결정하였다. 상기 논의된 유전자들을 모두 비교하였을 때, 우수한 상관관계들이 얻어졌다.

도 14는 EGFR, HER2, HER3 및 베타셀룰린을 이용한 종양의 비교사 군집화를 보여준다. 6개의 인산화 양성 종양 중 5개가 qRT-PCR 데이터를 이용하였을 때, 함께 군집화되었다.

도 15는 중앙값 이상의 베타셀룰린 및 HER2 발현 및/또는 중앙값 이상의 EGFR 및/또는 HER3 발현을 갖는 샘플이 양성으로 예측되는 알고리즘을 이용함으로써 난소 종양의 인산화 상태를 예측할 수 있다는 것을 보여준다. 6개의 HER2 인산화가 양성인 경우들 중 4개에서 상관관계가 양성이었다. qRT-PCT 발현 데이터를 알고리즘의 기초로 사용하였을 때, 19개의 HER2 인산화가 음성인 경우들 중 5개만이 양성으로 예측되었다.

도 16에 도시된 두 번째 분석에서, HER2 인산화 상태 예측은 단일 유전자, 즉 베타셀룰린만을 이용하여 수행하였다. 이 도면에서 보여지는 바와 같이, 역시 마이크로어레이 발현 데이터를 사용하였을 때, 6개의 HER2 인산화가 양성인 경우들 중 5개가 중앙값보다 높은 베타셀룰린 발현을 보였다.

또다른 HER 리간드, 즉 에피레굴린, 암피레굴린 및 TGF-알파를 평가함으로써, 암피레굴린을 HER2 인산화 상태와 상관 관계 있는 베타셀룰린과 유사한 유용성을 갖는 두 번째 리간드로서 확인하였다. 도 17 참조.

실시예 3

HER2 인산화와 관련된 유전자 발현 프로파일을 갖는 환자들의 치료

상기 실시예 1 및 2는 유전자 발현 프로파일이 HER2 인산화에 대한 대용자로서 사용될 수 있음을 보여준다. 본 실시예에서는, HER2 인산화와 관련된 구체적인 유전자 발현 프로파일을 갖는 종양이 있는 환자들을 HER 억제제인 페르투주마브로 치료하였다.

qT-PCR을 문헌 [Cronin et al., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004)]; 및 [Ma et al., Cancer Cell 5:607-616 (2004)]에 설명되어 있는 바와 같이 수행하였다. 캘리포니아주 발렌시아에 소재한 키아젠으로부터 상업적으로 입수가 가능한 시약들을 사용하여, RNA를 동결 난소 종양으로부터 추출하였다. 텍만™ qRT-PCR 분석을 위한 프라이머 및 프로브들은 약 100 염기 이하의 앰플리콘 길이를 갖도록 설계하였다. 텍만™ 기기(어플라이드 바이오시스템스(Applied BioSystems))를 이용하여 전사체를 qRT-PCR에 의해 정량화하였으며, 시험 유전자의 발현 수준을 기준 유전자의 발현 수준으로 정규화하였다.

ELISA에 의해 공지된 HER2 인산화 상태를 갖는 실시예 1 및 2에서의 종양들의 유전자 발현 프로파일링 데이터에 기초하여 알고리즘을 개발하였다. 중앙값 이상의 베타셀룰린 또는 암피레굴린 및 HER2 발현 및/또는 중앙값 이상의 HER3 발현을 갖는 종양은 HER2 인산화와 관련된 유전자 발현 프로파일에 대해 양성으로 간주된다. 다르게는, 베타셀룰린 또는 암피레굴린만의 발현이 qRT-PCR에 의해 측정되어 예측된 HER2 인산화를 갖는 종양을 확인할 수 있다.

백금계 화학치료 계획을 받으면서 진행된 환자, 또는 백금계 치료 계획을 완료한 후 6개월 내에 진행된 환자들이 본 연구에 적합할 것이다. 환자들은 페르투주마브와 조합하여 젬시타빈을 받거나, 플라시보와 조합되어 젬시타빈을 받도록 랜덤화될 것이다.

젬시타빈은 최대 8번의 주기 동안, 21일 주기 중 1일 및 8일에 1000 mg/m²로 투여될 것이다. 젬시타빈은 처음에 30분에 걸쳐 주입될 것이다. 독성으로 인한 투여량 감소가 허용될 것이다. 플라시보 또는 페르투주마브는 21일 주기 중 1일에 투여될 것이다. 페르투주마브를 받도록 랜덤화된 환자들은 840 mg의 초기 부하 투여량(제1 주기)에 이어서 제2 주기 및 그 이후에 420 mg의 부하 투여량으로 투여될 것이다. 플라시보를 받도록 랜덤화된 환자들은 제1 주기, 제2 주기 및 그 이후에 페르투주마브 암(arm)으로 투여된 것과 동일한 부피로 플라시보를 투여받을 것이다. 젬시타빈, 페르투주마브 또는 플라시보의 8번의 주기 후에, 최대 9번의 추가 주기가 계속될 것이다(총 1년).

환자들은 혈구감소증의 결과로서 표준적인 젬시타빈 투여량 감소 및 투여량 보류(holding)를 받을 것이다. 페르투주마브 또한 임의의 1일째 젬시타빈의 보류된 투여량으로 보류될 것이다. 후속 투여량은 감소된 투여량일 것이고, 증가되지 않을 것이다. 투여량 감소 또는 투여량 보류가 4회 넘도록 요구되거나, 투여량이 3주 넘도록 보류된다면, 젬시타빈은 투여 중지될 것이고, 처치 의사의 승인 및 의학적 모니터링과 함께, 질환이 진행될 때까지 위약 투여가 계속될 수 있다. 8일째 젬시타빈 투여량이 보류된다면, 8일째 투여량은 생략되고, 후속 처치가 다음 주기로 시작할 것이다(이전 주기의 22일째).

젬시타빈은 하기 표에 의해 추천되는 바와 같이, 보류되고 투여량 감소될 것이다:

절대 과립구 카운트 (x10 ⁶ /L)	혈소판 카운트 (x10 ⁶ /L)	% 총 투여량
>1000	>100,000	100
500-999	50,000-99,000	75
<500	<50,000	보류(hold)

투여량 감소를 필요로 하는 임의의 환자에 대한 후속 투여는 감소된 투여량으로 투여될 것이다. 투여량이 혈구감소증의 결과로서 3주 넘게 보류된다면, 환자는 허용될 수 없는 독성을 가진 것으로 추측될 것이며, 젬시타빈 투여를 중지할 것이다. 다른 추가적인 등급 III 또는 IV 독성이 존재하지 않는다면, 의사의 판단 및 의학적 모니터링 하에 위약 투여가 계속될 것이다. 젬시타빈의 혈액계 독성은 투여 속도에 관련되어 있다. 젬시타빈은 총 투여량에 무관하게 30분에 걸쳐 주어질 것이다. NCI-CTC 등급 2 혈구감소증에 대한 콜로니-자극제를 사용하는 것이 처치 의사의 판단 하에 이루어질 수 있다. 단일제 페르투주마브에 대한 교차 선택사항이 제공될 것이다. 840 mg의 부하 투여량이 투여될 것이고, 다음 주기에서 420 mg이 계속될 것이며, 매 21일마다 후속 주기들이 이어질 것이다.

반응은 제3, 5, 7, 9, 13, 17 주기에서 평가될 것이다. 측정가능한 질환은 임상 평가 및 CT 주사 또는 동등한 방법에 의해, 고형 종양에 대한 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria for Solid Tumors(RECIST))을 사용하여 평가될 것이다. 평가가능한 질환을 갖는 환자의 반응은 CA-125에 대한 변화 및 질환의 임상적, 방사선적 증거에 따라 평가될 것이다. 반응은 반응의 초기 기록 후 4-8주에 확인되어야 한다.

하기 치료 성과 척도가 평가될 것이다.

일차 효능 종결점

진행 없는 생존. 각 암에서 모든 환자들의 지정된 연구 처치를 개시한 후, RECIST 또는 CA-125 변화를 이용한 조사자 평가에 의해 결정됨.

이차 효능 종결점

객관적 반응(부분적 반응(PR) 또는 완전한 반응(CR))

반응 기간

생존 시간

4달째에서의 진행 여부

FOSI에 의해 측정된, 증상 개선 시간

가능한 구욕 및 구토를 방지하거나 치료하기 위해, 환자는 세로토닌 길항제, 스테로이드, 및/또는 벤조디아제핀으로 예비 처리될 수 있다. 가능한 발진을 방지하거나 치료하기 위해, 표준 여드름 치료법, 예를 들어 국소 및/또는 경구 항생제가 사용될 수 있다. 다른 가능한 부수적인 약물처리는 임의의 처방 약물처리 또는 1일째보다 7일 전에 시작하고, 다음 기간의 마지막 날까지 계속되는 간격 중에 환자에 의해 사용되는 처방 없이 판매되는 제제들이다. 38.5°C보다 높은 주입-관련 온도 상승 또는 다른 주입-관련 증상들을 경험하는 환자들은 아세트아미노펜, 디펜히드라민, 또는 메데리딘으로 증상에 관해 처리될 수 있다. 비-실험적인 조혈 성장 인자들이 NCI-CTC 등급 2 혈구감소증에 대해 투여될 수 있다.

상기 설명된 바와 같이 처리된 환자는 임의의 하나 이상의 일차 또는 이차 효능 종결점에 의해 평가된 바와 같은, 난소암, 원발성 복막암 또는 난관암의 징후 또는 증상의 개선을 보일 것이다. HER2 인산화와 관련된 유전자 발현 프로파일을 갖는 환자는 이러한 발현 프로파일을 갖지 않는 환자들에 비해, 페르투주마브를 이용한 치료로부터 보다 우수한 임상적 이점을 보일 것이다.

도면의 간단한 설명

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

도 2A 및 2B는 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 가변 경쇄 (V_L) (도 2A) 및 가변 중쇄 (V_H) (도 2B) 도메인 (각각 서열 1 및 2); 인간화 2C4 형태 574의 V_L 및 V_H 도메인 (각각 서열 3 및 4), 및 인간 V_L 및 V_H 컨센서스 프레임워크(consensus

framework) (hum κ 1, 경쇄 카파 하위군 I; humIII, 중쇄 하위군 III) (각각 서열 5 및 6)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 별표는 인간화 2C4 형태 574와 뮤린 모노클로날 항체 2C4 사이 또는 인간화 2C4 형태 574와 인간 프레임워크 사이의 차이를 확인한다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 괄호 안에 있다.

도 3A 및 3B는 페르투주마브 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열(각각, 서열 13 및 14)을 나타낸다. CDR은 굵은 글씨로 표시된다. 경쇄 및 중쇄의 계산된 분자량은 23,526.22 Da 및 49,216.56 Da이다(환원된 형태의 시스테인). 탄수화물 부분은 중쇄의 Asn 299에 부착된다.

도 4는 HER2의 이중이량체 결합 부위에서의 2C4의 결합, 및 그로 인한 활성화된 EGFR 또는 HER3와의 이중이량체화의 방지를 개략적으로 나타낸다.

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

도 6은 트라스투주마브와 페르투주마브의 다양한 활성들을 비교한다.

도 7A 및 7B는 각각 트라스투주마브 경쇄(도 7A; 서열 15) 및 중쇄(도 7B; 서열 16)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8A 및 8B는 각각 변이체 페르투주마브 경쇄 서열(도 8A; 서열 17) 및 변이체 페르투주마브 중쇄 서열(도 8B; 서열 18)을 도시한다.

도 9A 및 9B는 IgG 항체에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조를 나타낸다.

도 10은 아피메트릭스(AFFYMETRIX)® 마이크로어레이 발현 프로파일링에 의해 측정된 HER2, EGFR, HER3 및 베타셀룰린의 mRNA 발현값들을 이용하여, 공지된 HER2 인산화 상태를 갖는 난소암 환자들로부터의 25개의 종양을 위계적으로 군집화(clustering)한 것을 나타낸다.

도 11은 아피메트릭스® 마이크로어레이 발현 프로파일링에 의해 측정된 HER2, EGFR, HER3 및 베타셀룰린 mRNA 발현을 이용하여 HER2 인산화 상태를 예측하는 것을 도시한다.

도 12는 아피메트릭스® 마이크로어레이 발현 프로파일링에 의해 측정된 베타셀룰린 mRNA 발현과 HER2 인산화 상태의 상관관계를 도시한다.

도 13은 qRT-PCR 측정을 위한 분석법 특징들을 나타낸다. 역치 주기(Cycle Threshold(CT))는 절대적인 mRNA 발현을 정량화한다.

도 14는 qRT-PCR에 의해 측정된 HER2, EGFR, HER3 및 베타셀룰린의 mRNA 발현값들을 이용하여, 공지된 HER2 인산화 상태를 갖는 난소암 환자들로부터의 25개의 종양들을 위계적으로 군집화한 것을 보여준다.

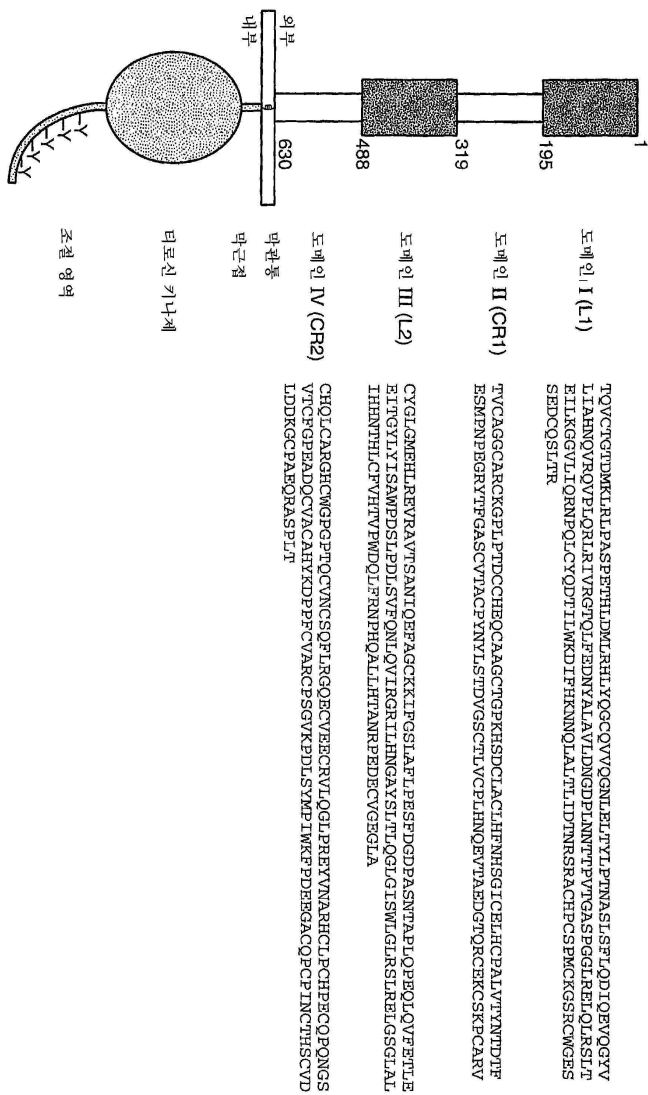
도 15는 qRT-PCR에 의해 측정된 HER2, EGFR, HER3 및 베타셀룰린 mRNA 발현을 이용하여 HER2 인산화 상태를 예측하는 것을 도시한다.

도 16은 qRT-PCR에 의해 측정된 베타셀룰린 mRNA 발현과 HER2 인산화 상태의 상관관계를 도시한다.

도 17은 qRT-PCR에 의해 측정된 암피레굴린 mRNA 발현과 HER2 인산화 상태의 상관관계를 도시한다.

도면

도면1



도면2A

가변 경계			
	10	20	30
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP
	**	**** *	*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP
		* ** **	
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	[RASQISNYLA]	WYQQRP
	50	60	70
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA	
	**	* *	* **
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
	* *****		
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (서열 1)	
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (서열 3)	
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (서열 5)	

도면2B

가변 중쇄

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

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

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

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(서열 6)

도면3A

페르투주마브 경쇄에 대한 아미노산 서열

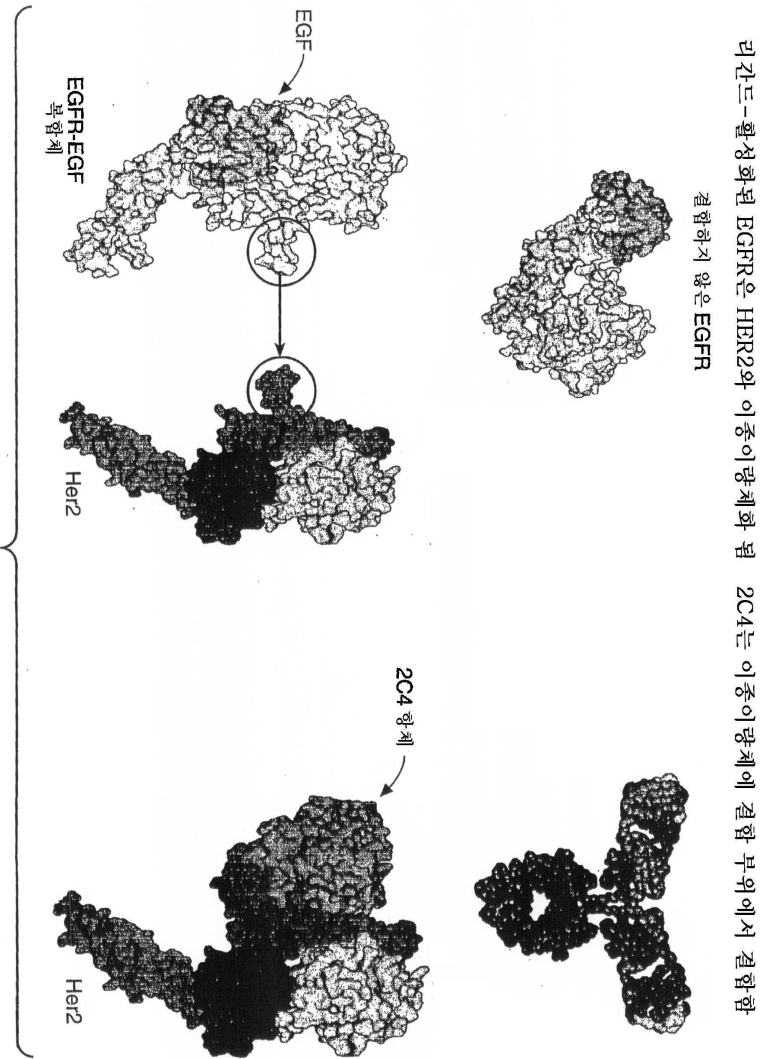
1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDV	SIGVAWYQKPKAPKLLIYSAS	RYRTGVPS				
	70	80	90	100	110	120
RFSGSGSGTDFTLT	ISSLPEDFATYYCQ	QYYIYPYTFGQ	TKVEIKRTVAAPSVFIFPP			
	130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	STYSL	STLT				
	190	200	210			
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT	KSFNRGEC					

도면3B

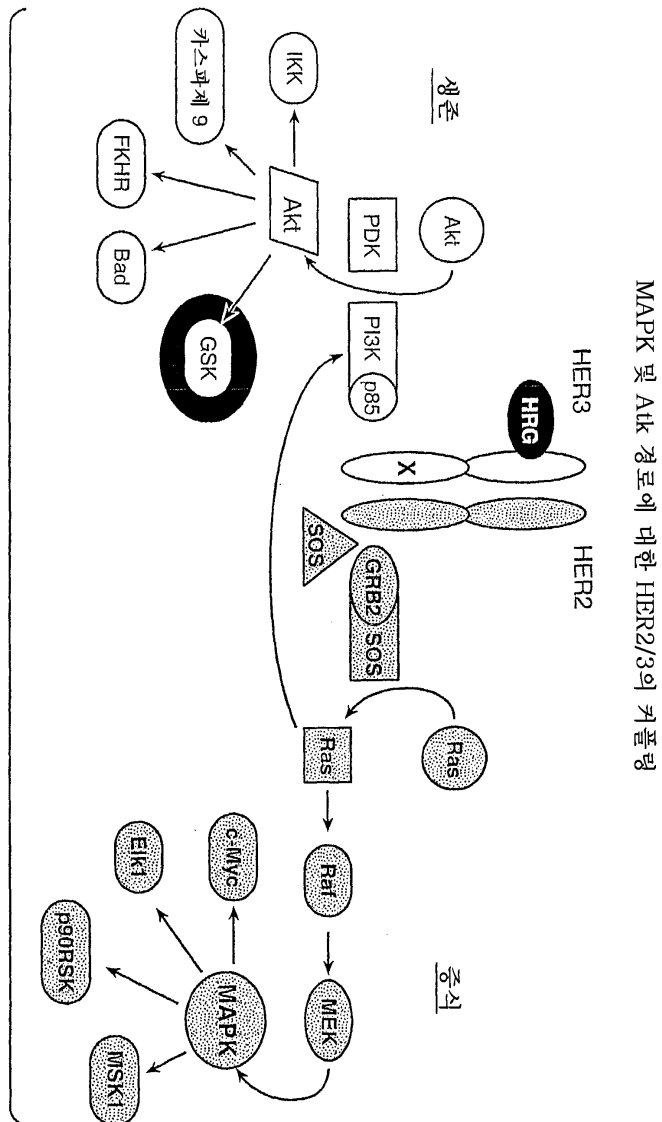
페르투주마브 중쇄에 대한 아미노산 서열

1	10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVA	DVNPNSGGSIY				
	70	80	90	100	110	120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCARNL	GPSFYFDYWGQGTTLTVSSA				
	130	140	150	160	170	180
STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG					
	190	200	210	220	230	240
LYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAPELGGP					
	250	260	270	280	290	300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA	KTPREEQYNS					
	310	320	330	340	350	360
TYRVVSVLT	TVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY	TLPPSREEM				
	370	380	390	400	410	420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ					
	430	440	448			
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG						

도면4

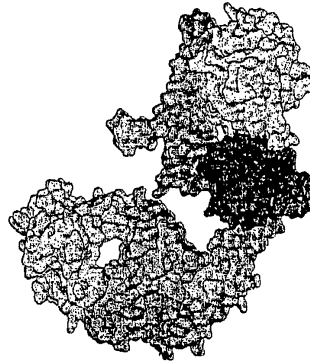


도면5



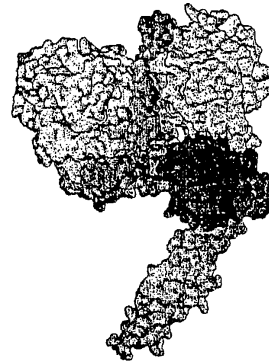
도면6

트라스투주마브
헤르셉틴



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

페르투주마브
옵니타르그



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

도면7A

경쇄

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	K	P	G	K	A	P	K	45	
46	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	90	
91	H	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C									214			

도면7B

중쇄

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGL 45
 15
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90
 60
 91 TAVY YCSRWG GDFYAMD YWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA P S S 135
 105
 136 KSTSGGTAA LGC L VKDY FPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPA VLQSS 180
 150
 181 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 195
 226 THTCPCPAP ELLG GP S VFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVS 270
 240
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY^NSTYRVVSVLTVLHQD 315
 285
 316 WLN GKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVY TLPSSRE E 360
 330
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT P PVLDS DG 405
 375
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG 449
 420

도면8A

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

도면8B

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
 46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
 91 T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449

도면9A

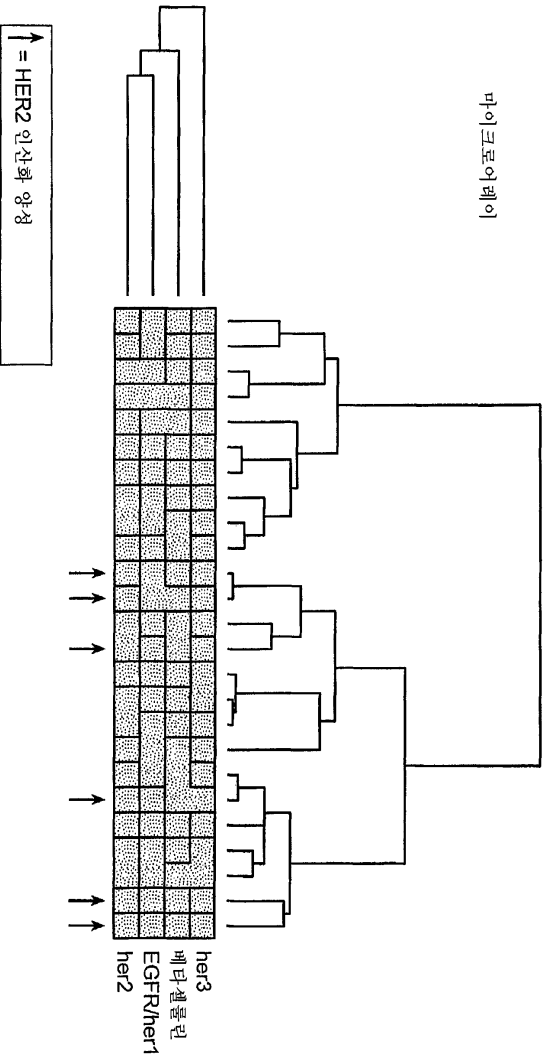
IgG 항체에서 통상적으로 관찰되는 올리고당류 구조			
구조	약어	질량	
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \bigg\rangle \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \bigg\rangle \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man5	1235	
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)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

도면9B

구조	약어	질량
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G1-1	1423
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G1 (1-6)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G2	1788

상기 도면에 나타낸 질량은 (M+Na)⁺ 값에 상응함

도면10



도면11

ELISA에 대한 생존 종양 세포%	전체 HER2 ng/mL	인산화 HER2 U/mL	pher2	예측	마이크로어레이에 의한 유전자 발현				
					her2	베타셀룰린	EGFR/her1	her3	
90	62.7	246.8	pos	pos	2509	7664.7	453.1	8605.4	
50	62.1	154.6	pos	pos	3580.1	443.4	545.9	1540.5	
70	83.8	74.5	pos	pos	4027.1	963.4	1707	1785	
80	100.3	74.2	pos	pos	1812.633	537.033333	216.6667	2606	
60	59.6	71.9	pos	pos	3115.8	645.1	1529.8	2441.2	
95	140.6	59.0	pos	pos	2915.8	584.9	273.3	5094.2	
95	24.2	<54	neg	neg	736.1	2764.3	529	413.2	
95	25.6	<54	neg	neg	1089.1	174.8	138.5	2756	
80	11.2	<54	neg	neg	1198.8	155.3	1534.1	284.6	
30	34.8	<54	neg	neg	1209.2	431.1	345.5	3429.2	
30	22.2	<54	neg	neg	1234.9	711.3	344	3285.5	
80	71.0	<54	neg	neg	1302.1	99.2	424.4	2719	
80	35.7	<54	neg	neg	1309.4	241.1	331.5	5443.8	
75	36.5	<54	neg	neg	1336.1	459.8	507.1	2977.3	
60	23.0	<54	neg	neg	1441.1	916.4	518.5	4587.9	
50	84.0	<54	neg	neg	1618.9	338.3	509.8	1848.2	
70	55.9	<54	neg	neg	1647	205.6	177.9	2029	
70	52.5	<54	neg	neg	1696.4	54	354.6	1432	
70	32.4	<54	neg	neg	1719.4	215.7	344	3111.5	
80	46.6	<54	neg	neg	1723.3	271.4	452.7	3770.3	
75	46.1	<54	neg	neg	1725.2	300.3	749.8	899.7	
70	23.2	<54	neg	neg	2004.7	200.7	611.6	4305.3	
40	39.3	<54	neg	neg	2557.9	211.4	609.2	2516.1	
60	42.3	<54	neg	neg	2765.5	193.8	256.9	964.3	
30	25.8	<54	neg	neg	3321.3	456.3	356.9	2520	
중앙값 이상의 발현을 보이는 샘플 =					1719.4	338.3	452.7	2606	중앙값

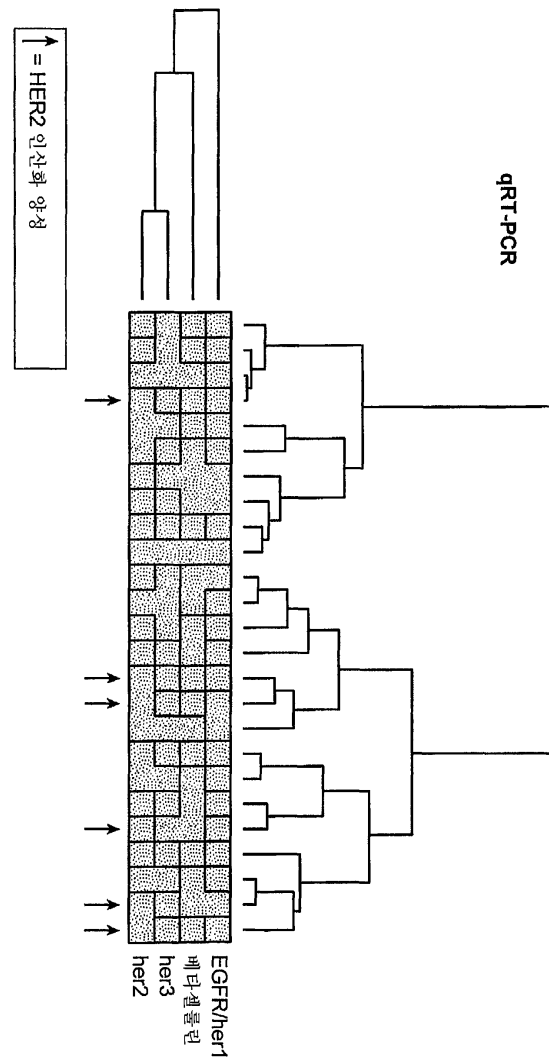
도면12

ELISA에 대한 생존 종양 세포%	전체 HER2 ng/mL	인산화 HER2 U/mL	pher2	마이크로어레이에 의한 유전자 발현		
				베타셀룰린		
90	62.7	246.8	pos	7664.7		
95	24.2	<54	neg	2764.3		
70	83.8	74.5	pos	963.4		
60	23.0	<54	neg	916.4		
30	22.2	<54	neg	711.3		
60	59.6	71.9	pos	645.1		
95	140.6	59.0	pos	584.9		
80	100.3	74.2	pos	537.0333		
75	36.5	<54	neg	459.8		
30	25.8	<54	neg	456.3		
50	62.1	154.6	pos	443.4		
30	34.8	<54	neg	431.1		
50	84.0	<54	neg	338.3		
75	46.1	<54	neg	300.3		
80	46.6	<54	neg	271.4		
80	35.7	<54	neg	241.1		
70	32.4	<54	neg	215.7		
40	39.3	<54	neg	211.4		
70	55.9	<54	neg	205.6		
70	23.2	<54	neg	200.7		
60	42.3	<54	neg	193.8		
95	25.6	<54	neg	174.8		
80	11.2	<54	neg	155.3		
80	71.0	<54	neg	99.2		
70	52.5	<54	neg	54		
중앙값 이상의 발현을 보이는 샘플 =				338.3	중앙값	
예측 오류=						

도면13

유전자	평균 \pm STD (CT)	범위 (CT)
GUS	26.76 \pm 0.70	3.92
EGFR	28.09 \pm 1.11	4.94
HER2	26.09 \pm 1.09	4.72
HER3	28.30 \pm 1.68	8.43
HER4	29.26 \pm 2.62	10.84
베타셀룰린	31.92 \pm 1.72	8.42
에티레플린	33.45 \pm 2.28	12.22
암피레플린	33.58 \pm 1.82	8.21
TGF-알파	31.44 \pm 1.51	7.12

도면14



도면15

ELISA에 대한 생존 중앙 세포%	전체 HER2 ng/mL	인산화 HER2 U/mL	pher2	qRT-PCR에 의한 유전자 발현					
				예측	her2	암피레글린	EGFR/her1	her3	
90	62.7	246.8	pos	neg	4.59	11.6644	3.20	148.78	
50	62.1	154.6	pos	pos	9.28	45.39798	5.97	24.12	
70	83.8	74.5	pos	pos	9.59	67.88056	14.01	27.54	
80	100.3	74.2	pos	pos	5.60	37.01868	1.60	51.02	
60	59.6	71.9	pos	neg	3.59	9.201785	5.54	21.77	
95	140.6	59	pos	pos	6.51	17.23189	1.99	88.96	
95	24.2	<54	neg	neg	1.26	61.28652	3.15	5.79	
95	25.6	<54	neg	pos	14.41	7.756674	2.49	116.55	
80	11.2	<54	neg	neg	1.49	3.237223	19.45	2.16	
30	34.8	<54	neg	pos	10.19	11.10794	5.59	110.83	
30	22.2	<54	neg	neg	2.09	5.582936	3.92	26.72	
80	71	<54	neg	neg	4.66	7.790626	6.09	47.88	
80	35.7	<54	neg	neg	3.83	15.56794	1.39	47.39	
75	36.5	<54	neg	pos	6.38	2.183314	8.05	39.54	
60	23	<54	neg	neg	3.70	10.77946	4.66	41.67	
50	84	<54	neg	neg	5.25	32.68562	5.31	15.31	
70	55.9	<54	neg	neg	5.77	13.99794	1.52	44.04	
70	52.5	<54	neg	neg	2.38	3.985562	1.01	18.23	
70	32.4	<54	neg	neg	10.03	5.808624	3.44	97.62	
80	46.6	<54	neg	neg	3.10	1.884399	3.09	35.74	
75	46.1	<54	neg	neg	3.96	14.63391	6.89	18.10	
70	23.2	<54	neg	neg	6.21	1.307397	6.97	67.03	
40	39.3	<54	neg	pos	10.78	14.82455	10.63	53.66	
60	42.3	<54	neg	neg	6.93	6.42934	1.71	17.07	
30	25.8	<54	neg	pos	12.62	42.9983	3.58	44.73	
중앙값 이상의 발현을 보이는 샘플 =					5.60	11.10794	3.92	41.67	중앙값
예측 오류 =									

도면16

ELISA에 대한 생존 중앙 세포%	전체 HER2 ng/mL	인산화 HER2 U/mL	qRT-PCR에 의한 유전자 발현		
			pher2	베타셀룰린	
90	62.7	246.8	pos	233.63	
95	24.2	<54	neg	114.96	
60	23	<54	neg	41.28	
70	83.8	74.5	pos	34.07	
75	36.5	<54	neg	31.65	
30	22.2	<54	neg	27.51	
30	25.8	<54	neg	24.68	
80	100.3	74.2	pos	23.62	
30	34.8	<54	neg	23.51	
95	140.6	59	pos	19.26	
95	25.6	<54	neg	15.35	
50	62.1	154.6	pos	15.23	
40	39.3	<54	neg	12.62	
50	84	<54	neg	12.51	
70	55.9	<54	neg	11.18	
75	46.1	<54	neg	11.03	
70	32.4	<54	neg	10.48	
60	59.6	71.9	pos	8.85	
70	23.2	<54	neg	7.05	
80	46.6	<54	neg	6.71	
80	35.7	<54	neg	5.47	
60	42.3	<54	neg	4.88	
80	11.2	<54	neg	3.41	
80	71	<54	neg	2.32	
70	52.5	<54	neg	1.02	
중앙값 이상의 발현을 보이는 샘플 =				12.62	중앙값
예측 오류 =					

도면17

qRT-PCR에 의한 유전자 발현				
ELISA에 대한 생존 종양 세포%	전체 HER2 ng/mL	인산화 HER2 U/mL	phor2	암피레클린
70	83.8	74.5	pos	67.8805624
95	24.2	<54	neg	61.2865153
50	62.1	154.6	pos	45.3979781
30	25.8	<54	neg	42.9982985
80	100.3	74.2	pos	37.0186829
50	84	<54	neg	32.6856186
95	140.6	59	pos	17.2318938
80	35.7	<54	neg	15.5679394
40	39.3	<54	neg	14.8245463
75	46.1	<54	neg	14.6339112
70	55.9	<54	neg	13.9979409
90	62.7	246.8	pos	11.6644023
30	34.8	<54	neg	11.1079374
60	23	<54	neg	10.7794592
60	59.6	71.9	pos	9.20178485
80	71	<54	neg	7.7906265
95	25.6	<54	neg	7.75667358
60	42.3	<54	neg	6.42934028
70	32.4	<54	neg	5.80862367
30	22.2	<54	neg	5.58293613
70	52.5	<54	neg	3.98556197
80	11.2	<54	neg	3.23722253
75	36.5	<54	neg	2.18331441
80	46.6	<54	neg	1.88439857
70	23.2	<54	neg	1.30739693
				11.1079374
중양값 이상의 발현을 보이는 샘플 =				중양값
예측 오류 =				

서열목록

Sequence Listing

<110> Amler, Lukas C.
Januario, Thomas E.

<120> Selecting Patients for Therapy with a HER Inhibitor

<130> P2148R1

<141> 2005-12-06

<150> US 60/633,941

<151> 2004-12-07

<160> 22

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val

1

5

10

15

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

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

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

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

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
65 70 75

Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
80 85 90

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

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

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr

50	55	60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser		
65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr		
95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
110	115	

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

<220>
 <223> sequence is synthesized

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

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

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 6

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

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa is preferably D or S

<400> 7

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

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 8

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

Lys Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 9

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

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 10

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

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is preferably R or L

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is preferably Y or E

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is preferably T or S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 13

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 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 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			

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

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 15

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

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

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

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

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

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120

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

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

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
410 415 420

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
425 430 435

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
95 100 105

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

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

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
140 145 150

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
155 160 165

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

170	175	180
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys Val Tyr	
185	190	195
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
200	205	210
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
215		

<210> 18
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 18

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

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

```

425                               430                               435

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440                               445

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

<400> 19
Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
  1                               5                               10                               15

Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
                               20                               25                               30

Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
                               35                               40                               45

Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
                               50                               55                               60

Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
                               65                               70                               75

Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
                               80                               85                               90

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
                               95                               100                               105

Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
                               110                               115                               120

Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
                               125                               130                               135

Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
                               140                               145                               150

Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
                               155                               160                               165

Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
                               170                               175                               180

Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
                               185                               190                               195

<210> 20
<211> 124
<212> PRT

```


<213> Homo sapiens

<400> 20

```

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

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

Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
              35              40              45

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg Val

```

<210> 21

<211> 169

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

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

Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
              35              40              45

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

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
              65              70              75

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile

```

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

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

<400> 22

Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro		
1	5	10
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