



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년04월11일  
 (11) 등록번호 10-1253576  
 (24) 등록일자 2013년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2007-7019194  
 (22) 출원일자(국제) 2006년02월21일  
 심사청구일자 2011년02월16일  
 (85) 번역문제출일자 2007년08월22일  
 (65) 공개번호 10-2007-0110298  
 (43) 공개일자 2007년11월16일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/006334  
 (87) 국제공개번호 WO 2006/091693  
 국제공개일자 2006년08월31일  
 (30) 우선권주장  
 60/655,277 2005년02월23일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 PROC AM SCO CLIN ONCOL. vol.22, 2003, page  
 ABS 771, XP009070506

(73) 특허권자  
**제넨테크, 인크.**  
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1  
 (72) 발명자  
**데린크, 미카, 케이.**  
 미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 힐탑 로드 27  
**켈시, 스테판, 엠.**  
 미국 94037 캘리포니아주 몬타라 14쓰 스트리트  
 360  
 (74) 대리인  
**위혜숙, 양영준**

전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **HER 이량체화 억제제를 이용한 암 환자에서의 질환진행까지의 시간 또는 생존의 연장**

**(57) 요약**

본 출원은 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제로 환자를 치료함으로써, 환자의 암이 HER 활성화를 나타내는 암 환자에서 질환 진행까지의 시간 또는 생존을 연장시키는 것을 기재한다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

암 환자에서 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존을 연장시키기 위한 방법에 사용하기 위한 의약으로서, 상기 방법은 암 환자에서 TTP 또는 생존을 연장시키는 양으로 페르투주마브를 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 환자의 암은 HER 활성화를 나타내고, 상기 암은 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암 및 직장결장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고, 상기 의약이 420 mg의 페르투주마브를 함유하는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 환자의 암이 HER2 활성화를 나타내는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자의 암이 HER2 인산화를 나타내는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 환자의 암이 인-ELISA 분석으로 평가시 HER2 인산화를 나타내는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자의 암이 유전자 발현 프로파일링으로 평가시 HER2 활성화를 나타내는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 네이키드(naked) 항체인 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 비손상(intact) 항체인 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 있어서, 비손상 페르투주마브의 항원 결합 영역을 포함하는 항체 단편인 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 난소암, 복막암 또는 난관암인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 암이 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 11**

제1항 또는 제2항에 있어서, 페르투주마브가 단일 항종양제로서 투여되기 위한 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 12**

제1항 또는 제2항에 있어서, 페르투주마브가 제2 치료제와 함께 투여되기 위한 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제, 페르투주마브 이외의 HER 항체, 종양 관련된 항원에 대한 항체, 항

-호르몬 화합물, 심장보호제, 사이토킨, EGFR-표적화된 약물, 항혈관신생제, 티로신 키나제 억제제, COX 억제제, 비-스테로이드성 항염증 약물, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 중앙태아성 단백질 CA 125에 결합하는 항체, HER2 백신, HER 표적화 요법, Raf 또는 ras 억제제, 리포좀성 독소루비신, 토포테칸, 탁산, 이중 티로신 키나제 억제제, TLK286, EMD-7200, 구역을 치료하는 의약, 피부 발진을 예방 또는 치료하는 의약 또는 표준 여드름 요법, 설사를 치료 또는 예방하는 의약, 체온-감소 의약 및 조혈 성장 인자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 화학요법제가 항대사물 화학요법제인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 항대사물 화학요법제가 겐시타빈인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 제2 치료제가 트라스투주마브, 에를로티니브 또는 베마시주마브인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 18**

제1항 또는 제2항에 있어서, TTP가 연장되는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 19**

제1항 또는 제2항에 있어서, 생존이 연장되는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 방법에서 페르투주마브의 투여가, 암 환자에게 승인된 항종양제의 투여에 의해 달성되는 TTP 또는 생존보다 20% 이상 더 많이 TTP 또는 생존을 연장시키는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 21**

난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존을 연장시키기 위한 방법에 사용하기 위한 의약으로서, 상기 방법은 페르투주마브를 난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서 TTP 또는 생존을 연장시키는 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 환자의 암은 HER2 활성화를 나타내고, 의약은 420 mg의 페르투주마브를 함유하는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 환자가 난소암을 갖는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, 환자가 진행성, 난치성 또는 재발성 암을 갖는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 24**

제21항 또는 제22항에 있어서, 환자에 대한 페르투주마브의 투여가, 토포테칸 또는 리포좀성 독소루비신을 환자에 투여하여 달성되는 TTP 또는 생존보다 20% 이상 더 많이 TTP 또는 생존을 연장시키는 것인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 25**

제21항 또는 제22항에 있어서, 환자에게 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 화학요법제가 항대사물 화학요법제인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 항대사물 화학요법제가 겐시타빈인, 페르투주마브를 포함하는 의약.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**명세서**

[0001] 본 출원은 2005년 2월 23일자로 출원된 미국 가출원 제60/655,277호의 이익을 청구하며, 상기 출원의 전체 개시 사항은 본원에 참고로 도입된다.

**기술분야**

[0002] 본 발명은 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제로 환자를 치료함으로써, 환자의 암이 HER 활성화를 나타내는 암 환자에서 질환 진행까지의 시간 또는 생존을 연장시키는 것에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] HER 수용체 및 그에 대한 항체
- [0004] 수용체 티로신 키나제의 HER 족은 세포 성장, 분화 및 생존의 중요한 매개자이다. 수용체 족은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1 또는 HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 비롯한 4가지 특징적인 구성원을 포함한다.
- [0005] *erbB1* 유전자에 의해 코딩되는 EGFR은 인간 악성종양과 원인으로 관련되었다. 특히, EGFR의 발현의 증가는 유방암, 방광암, 폐암, 두부암, 경부암 및 위암, 뿐만 아니라 교모세포종에서 관찰되었다. 증가된 EGFR 수용체 발현은 종종 자가분비성 자극 경로에 의한 수용체 활성화를 초래하는 동일한 종양 세포에 의해, EGFR 리간드, 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ )의 생성의 증가와 관련된다 (문헌 [Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)]). EGFR 또는 그의 리간드, TGF- $\alpha$  및 EGF에 대한 모노클로날 항체는 이러한 악성종양의 치료에 있어서 치료제로서 평가되었다. 예를 들어, [Baselga and 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.
- [0006] HER 족의 제2 구성원인 p185<sup>neu</sup>는 원래 화학적으로 처리된 래트의 신경모세포종으로부터의 형질전환 유전자의 생성물로서 확인되었다. *neu* 원발암유전자의 활성화된 형태는 코딩된 단백질의 막관통 영역 내의 점 돌연변이 (발린이 글루탐산으로)로부터 초래된다. *neu*의 인간 동족체의 증폭은 유방암 및 난소암에서 관찰되며, 나쁜 예후와 상호관련된다 (문헌 [Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)]; [Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989)]; 및 미국 특허 제4,968,603호). 지금까지, 인간 종양에 대해 *neu* 원발암유전자에서의 것과 유사한 점 돌연변이는 보고되지 않았다. HER2의 과발현 (빈번하지만 균일하지는 않게 유전자 증폭에 기인함)은 또한 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 및 방광의 암종을 비롯한 기타 암종에서 관찰되었다. 다른 것들 중에서, 문헌 [King et al., *Science*, 229:974 (1985)]; [Yokota et al., *Lancet*. 1:765-767 (1986)]; [Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986)]; [Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988)]; [Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989)]; [Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991)]; [Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990)]; [Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990)]; [Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990)]; [Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989)]; [Zhou et al., *Mol Carcinog.*, 3:254-257 (1990)]; [Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988)]; [Williams et al. *Pathobiology* 59:46-52 (1991)]; 및 [McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990)]을 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)]).
- [0007] 래트 p185<sup>neu</sup> 및 인간 HER2 단백질 생성물에 대한 항체가 기재되었다.
- [0008] 드레빈(Drebin)과 동료들은 래트 *neu* 유전자 생성물인 p185<sup>neu</sup>에 대한 항체를 발생시켰다. 예를 들어, 문헌 [Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985)]; [Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991)]; 및 WO 94/22478을 참조한다. 문헌 [Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988)]은 p185<sup>neu</sup>의 2개의 별개의 영역과 반응성인 항체의 혼합물이, 누드 마우스 내로 이식된 *neu*-형질전환된 NIH-3T3 세포에 대한 상승적인 항종양 효과를 초래함을 보고하고 있다. 또한, 1998년 10월 20일자로 허여된 미국 특허 제5,824,311호를 참조한다.
- [0009] 문헌 [Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)]에는 인간 유방 종양 세포주 SK-BR-3을 이용하여 특성화된 HER2 항체 패널의 생성이 기재되어 있다. 항체에 노출시킨 후 SK-BR-3 세포의 상대적 세포 증식을 72시간 후 단층의 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 측정하였다. 상기 분석을 이용하여, 세포 증식을 56%까지 억제한 4D5로 지칭되는 항체로 최대 억제율을 수득하였다. 상기 분석에서 패널 내의 다른 항체는 보다 적은 정도로 세포 증식을 감소시켰다. 항체 4D5는 또한 TNF- $\alpha$ 의 세포독성 효과에 대해 HER2-과발현 유방 종양 세포주를 감작화하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 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.

[0010] 무린 HER2 항체 4D5의 재조합 인간화 형태 (huMab4D5-8, rhuMab HER2, 트라스투주마브 또는 헤르셉틴 (HERCEPTIN)(등록상표); 미국 특허 제5,821,337호)는 항암 요법 전에 대량으로 투여받은 HER2-과발현 전이성 유방암을 갖는 환자에서 임상적으로 활성이다 (문헌 [Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)]). 트라스투주마브는 그의 종양이 HER2 단백질을 과발현하는 전이성 유방암을 갖는 환자의 치료에 대해 1998년 9월 25일자로 식품 의약품 안전청으로부터 시판 승인을 받았다.

[0011] 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.

[0012] 상동성 스크리닝으로 2가지 다른 HER 수용체 족 구성원, 즉 HER3 (미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호, 및 문헌 [Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)]) 및 HER4 (유럽 특허 출원 제599,274호; 문헌 [Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)]; 및 [Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)])를 확인하였다. 상기 수용체 둘다는 적어도 일부의 유방암 세포주에 대해 증가된 발현을 나타낸다.

[0013] HER 수용체는 일반적으로 세포 내의 다양한 배합물에서 발견되며, 이종이량체화는 다양한 HER 리간드에 대한 세포 반응의 다양성을 증가시키는 것으로 여겨진다 (문헌 [Earp et al. *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132 (1995)]). EGFR은 6가지 상이한 리간드에 의해 결합된다: 표피 성장 인자 (EGF), 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ ), 암피레굴린, 헤파린 결합 표피 성장 인자 (HB-EGF), 베타셀룰린 및 에피레굴린 (문헌 [Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]). 단일 유전자의 별도의 스플라이싱으로부터 초래되는 헤레굴린 단백질의 족은 HER3 및 HER4에 대한 리간드이다. 헤레굴린 족은 알파, 베타 및 감마 헤레굴린 (문헌 [Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)]; 미국 특허 제5,641,869호; 및 [Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)]); neu 분화 인자 (NDF), 아교 성장 인자 (GGF); 아세틸콜린 수용체 유도 활성 (ARIA); 및 감각 및 운동 뉴런 유래된 인자 (SMDF)를 포함한다. 검토를 위해, 문헌 [Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)]; [Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996)] 및 [Lee et al. *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995)]을 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.

[0014] EGF 및 TGF- $\alpha$ 는 HER2에 결합하지 않는 반면, EGF는 EGFR 및 HER2를 자극하여 이종이량체를 형성하고, 이는 EGFR을 활성화시키며 이종이량체 내의 HER2의 인산전달을 초래한다. 이량체화 및/또는 인산전달은 HER2 티로신 키나제를 활성화시키는 것으로 보인다. [Earp et al.]의 상기 문헌을 참조한다. 또한, HER3이 HER2와 공동발현될 경우, 활성 신호전달 복합체가 형성되며, HER2에 대한 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)]).

[0015] HER 항체와 관련된 특허 공보로는 US 5,677,171, US 5,720,937, US 5,720,954, US 5,725,856, US 5,770,195,

US 5,772,997, US 6,165,464, US 6,387,371, US 6,399,063, US 2002/0192211 A1, US 6,015,567, US 6,333,169, US 4,968,603, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213, US 6,719,971, US 6,800,738, US 2004/0236078A1, US 5,648,237, US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,515, WO 98/17797, US 6,127,526, US 6,333,398, US 6,797,814, US 6,339,142, US 6,417,335, US 6,489,447, WO 99/31140, US 2003/0147884 A1, US 2003/0170234A1, US 2005/0002928 A1, US 6,573,043, US 2003/0152987 A1, WO 99/48527, US 2002/0141993 A1, WO 01/00245, US 2003/0086924, US 2004/0013667A1, W000/69460, WO 01/00238, WO 01/15730, US 6,627,196 B1, US 6,632,979 B1, WO 01/00244, US 2002/0090662 A1, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 04/24866, US 2004/0082047, US 2003/0175845 A1, WO 03/087131, US 2003/0228663, WO 2004/008099 A2, US 2004/0106161, WO 2004/048525, US 2004/0258685 A1, US 5,985,553, US 5,747,261, US 4,935,341, US 5,401,638, US 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, US 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527 A1, WO 91/02062, US 5,571,894, US 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, US 5,288,477, US 5,514,554, US 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5,856,089, WO 94/22478, US 5,910,486, US 6,028,059, WO 96/07321, US 5,804,396, US 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, US 5,783,404, US 5,977,322, US 6,512,097, WO 97/00271, US 6,270,765, US 6,395,272, US 5,837,243, WO 96/40789, US 5,783,186, US 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6,214,388, US 5,925,519, WO 98/02463, US 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5,994,071, WO 98/45479, US 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, W002/05791, WO 02/11677, US 6,582,919, US 2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO 03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5,705,157, US 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 및 WO 03/86467 을 들 수 있다.

[0016]

진단법

[0017]

HER2 항체 트라스투주마브로 치료되는 환자는 HER2 과발현/증폭을 기초로 한 요법을 위해 선택된다. 예를 들어, WO 99/31140 (Paton et al.), US 2003/0170234A1 (Hellmann, S.) 및 US 2003/0147884 (Paton et al.); 및 WO 01/89566, US 2002/0064785 및 US 2003/0134344 (Mass et al.)를 참조한다. 또한, HER2 과발현 및 증폭을 검출하는 면역조직화학 (IHC) 및 형광 동일계내 혼성화 (FISH)에 관한 US 2003/0152987 (Cohen et al.)을 참조한다.

[0018]

WO 2004/053497 및 US 2004/024815A1 (Bacus et al.), 및 US 2003/0190689 (Crosby and Smith)는 트라스투주마브 요법에 대한 반응의 검출 또는 예측에 관한 것이다. US 2004/013297A1 (Bacus et al.)은 ABX0303 EGFR 항체 요법에 대한 반응의 측정 또는 예측에 관한 것이다. WO 2004/000094 (Bacus et al.)는 소분자, EGFR-HER2 티로신 키나제 억제제인 GW572016에 대한 반응의 측정에 관한 것이다. WO 2004/063709 (Amler et al.)은 EGFR 억제제인 에를로티니브 HCl에 대한 감수성의 측정을 위한 바이오마커 및 방법에 관한 것이다. US 2004/0209290 (Cobleigh et al.)은 유방암 진단용 유전자 발현 마커에 관한 것이다. 페르투주마브로 치료되는 환자는 HER 활성화 또는 이량체화를 기초로 한 요법을 위해 선택될 수 있다. 페르투주마브 및 이를 사용한 요법을 위한 환자의 선택에 관한 특허 공보로는 WO 01/00245 (Adams et al.); US 2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US 2004/0013667 A1 (Sliwkowski, M.); 및 WO 2004/008099A2 및 US 2004/0106161 (Bossenmaier et al.)을 들 수 있다.

[0019]

문헌 [Cronin et al. *Am. J. Path.* 164(1):35-42 (2004)]에는 기록용의 파라핀-포매된(embedded) 조직에서의 유전자 발현의 측정이 기재되어 있다. 문헌 [Ma et al. *Cancer Cell* 5:607-616 (2004)]에는 기록된 일차 생검으로부터 취해진 중앙-조직 섹션으로부터 단리된 RNA를 이용한 유전자 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이에 의한 유전자 프로파일링이 기재되어 있다.

[0020]

페르투주마브 (재조합 인간 모노클로날 항체 2C4로도 공지됨; 옵니타르그(OMNTARG)(상표명), 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 제네펜테크, 인크.(Genentech, Inc.))는 HER 이량체화 억제제 (HDI)로서 공지된 작용제의 신규한

부류 중 첫번째를 대표하고, HER2가 다른 HER 수용체와 활성 이중이량체를 형성하는 능력을 억제하는 기능을 하며, HER2 발현 수준과 관계없이 활성이다. 예를 들어, 문헌 [Harari and Yarden *Oncogene* 19:6102-14 (2000)]; [Yarden and Sliwkowski. *NatRev Mol Cell Biol* 2:127-37 (2001)]; [Sliwkowski *Nat Struct Biol* 10:158-9 (2003)]; [Cho et al. *Nature* 421:756-60 (2003)]; 및 [Malik et al. *Pro Am Soc Cancer Res* 44:176-7 (2003)]을 참조한다.

[0021] 종양 세포에서 HER2-HER3 이중이량체의 형성의 페르투주마브 차단은 종양 증식 및 생존을 감소시키는 중요한 세포 신호전달을 억제하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-37 (2002)]).

[0022] 페르투주마브는 임상에서 단일 작용제로서 진행성 암을 갖는 환자에서 Ia상 시험 및 난소암 및 유방암 뿐만 아니라 폐암 및 전립선암을 갖는 환자에서 II상 시험으로 시험되었다. I상 연구에서, 표준 요법 동안 또는 후에 진행된 불치성 국소 진행성, 재발성 또는 전이성 고형 종양을 갖는 환자를 매 3주마다 정맥내로 주어진 페르투주마브로 치료하였다. 페르투주마브는 일반적으로 잘 용인되었다. 종양 퇴행은 반응에 대해 평가가능한 20명의 환자 중 3명에서 달성되었다. 2명의 환자는 부분적 반응으로 확인되었다. 2.5개월 초과 동안 지속된 안정된 질환은 21명의 환자 중 6명에서 관찰되었다 (문헌 [Agus et al. *Pro Am Soc Clin Oncol* 22:192 (2003)]). 2.0 내지 15 mg/kg의 투여량에서, 페르투주마브의 약물동력학은 선형이며, 평균 청소율은 2.69 내지 3.74 mL/일/kg의 범위이고, 평균 최종 제거 반감기는 15.3 내지 27.6일 범위였다. 페르투주마브에 대한 항체는 검출되지 않았다 (문헌 [Allison et al. *Pro Am Soc Clin Oncol* 22:197 (2003)]).

[0023] 발명의 요약

[0024] 본 발명은 HER 이량체화 억제제인 페르투주마브로 치료된 인간 암 환자로부터의 임상 데이터를 제공한다. 환자를 인-ELISA 생물분석을 이용하여 측정된 바와 같이 HER 활성화에 대해 평가하였다. 질환 진행까지의 시간 (TTP) 및 생존에 의해 측정된 바와 같이 임상적 이익은 HER 활성화를 나타내는 환자에서 관찰되었다.

[0025] 따라서, 본 발명은 HER 이량체화 억제제를 암 환자에서 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존을 연장시키는 양으로 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이 HER 활성화를 나타내는 암 환자에서의 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존의 연장 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 페르투주마브를 난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존을 연장시키는 양으로 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이 HER 활성화를 나타내는 난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서의 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존의 연장 방법에 관한 것이다.

**발명의 상세한 설명**

[0050] I. 정의

[0051] 본원에서 "질환 진행까지의 시간" 또는 "TTP"는 (예를 들어, 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제를 사용한) 초기 치료의 시간으로부터 암이 진행되거나 악화될 때까지의, 일반적으로 주 또는 개월로 측정된 시간을 지칭한다. 이러한 진행은 숙련된 임상가에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어 난소암의 경우, 진행은 RECIST에 의해 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Therasse et al., *J. Nat. Cancer Inst.* 92(3):205-216 (2000)] 참조).

[0052] "TTP를 연장시키는"은 비치료된 환자에 비해 (즉, 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제로 치료되지 않은 환자에 비해), 또는 HER 활성화를 나타내지 않는 환자에 비해, 및/또는 승인된 항종양제 (예를 들어, 토포테칸 또는 리포솜성 독소루비신, 여기서 암은 난소암임)로 치료된 환자에 비해, 치료된 환자에서 질환 진행까지의 시간을 증가시키는 것을 의미한다.

[0053] "생존"은 환자가 살아 있는 것을 지칭하며, 전체 생존 뿐만 아니라 진행이 없는 생존을 포함한다.

[0054] "전체 생존"은 진단 또는 치료의 시간으로부터 1년, 5년 등과 같은 한정된 시기 동안 환자가 살아 있는 것을 지칭한다.

[0055] "진행이 없는 생존"은 암 진행 또는 악화가 없이 환자가 살아 있는 것을 지칭한다.

[0056] "생존을 연장시키는"은 비치료된 환자에 비해 (즉, 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제로 치료되지 않은 환자에 비해), 또는 HER 활성화를 나타내지 않는 환자에 비해, 및/또는 승인된 항종양제 (예를 들어, 토포테칸 또는 리포솜성 독소루비신, 여기서 암은 난소암임)로 치료된 환자에 비해, 치료된 환자에서 전체 생존 또는 진행이 없는 생존을 증가시키는 것을 의미한다.



- [0057] "객관적 반응"은 완전 반응 (CR) 또는 부분적 반응 (PR)을 비롯한 측정가능한 반응을 지칭한다.
- [0058] "완전 반응" 또는 "CR"은 치료에 대한 반응으로 암의 모든 징후의 소멸로 의도된다. 이는 항상 암이 치료되는 것을 의미하지는 않는다.
- [0059] "부분적 반응" 또는 "PR"은 치료에 대한 반응으로 하나 이상의 종양 또는 병변의 크기, 또는 신체 중 암의 정도의 감소를 지칭한다.
- [0060] "HER 수용체"는 HER 수용체 족에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이며, EGFR, HER2, HER3 및 HER4 수용체를 포함한다. HER 수용체는 일반적으로 HER 리간드에 결합하고/거나 또다른 HER 수용체 분자와 이량체화될 수 있는 세포외 도메인, 친지질성 막관통 도메인, 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 몇몇 티로신 잔기를 갖는 카르복실-말단 신호전달 도메인을 포함할 것이다. HER 수용체는 "천연 서열" HER 수용체 또는 그의 "아미노산 서열 변이체"일 수 있다. 바람직하게는, HER 수용체는 천연 서열 인간 HER 수용체이다.
- [0061] "ErbB1," "HER1", "표피 성장 인자 수용체" 및 "EGFR"이라는 용어는 본원에서 호환적으로 사용되며, 예를 들어 그의 천연 발생 돌연변이체 형태 (예를 들어 문헌 [Humphrey et al. *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)]에서와 같은 결실 돌연변이체 EGFR)를 비롯한, 문헌 [Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987)]에 개시된 바와 같은 EGFR을 지칭한다. *erbB1*은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 지칭한다.
- [0062] "ErbB2" 및 "HER2"라는 표현은 본원에서 호환적으로 사용되며, 예를 들어 문헌 [Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985)] 및 [Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986)]에 기재된 인간 HER2 단백질 (Genebank 수탁 번호 X03363)을 지칭한다. "*erbB2*"라는 용어는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 지칭하며, "*neu*"는 래트 p185<sup>neu</sup>를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 바람직한 HER2는 천연 서열 인간 HER2이다.
- [0063] 본원에서 "HER2 세포외 도메인" 또는 "HER2 ECD"는 세포막에 부착되거나 순환하는 세포의 외부에 있는 그의 단편을 비롯한 HER2의 도메인을 지칭한다. 일 실시양태에서, HER2의 세포외 도메인은 4가지 도메인을 포함할 수 있다: "도메인 I" (대략 1 내지 195의 아미노산 잔기; 서열 19), "도메인 II" (대략 196 내지 319의 아미노산 잔기; 서열 20), "도메인 III" (대략 320 내지 488의 아미노산 잔기; 서열 21) 및 "도메인 IV" (대략 489 내지 630의 아미노산 잔기; 서열 22) (신호 펩티드가 없는 잔기 넘버링). 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)], 및 본원의 도 1을 참조한다.
- [0064] "ErbB3" 및 "HER3"은 예를 들어 미국 특허 제5,183,884호 및 제5,480,968호, 및 문헌 [Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0065] 본원에서 "ErbB4" 및 "HER4"라는 용어는 예를 들어 유럽 특허 출원 제599,274호; 문헌 [Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)]; 및 [Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드, 및 예를 들어 1999년 4월 22일자로 공개된 WO 99/19488에 개시된 바와 같은 그의 이소형(isoform)을 지칭한다.
- [0066] "HER 리간드"는 HER 수용체에 결합하고/거나 이를 활성화시키는 폴리펩티드를 의미한다. 본원에서 특정 관심의 HER 리간드는 표피 성장 인자 (EGF) (문헌 [Savage et al., *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)]); 전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ ) ([Marquardt et al., *Science* 223:1079-1082 (1984)]); 신경초종 또는 각질세포 자가분비성 성장 인자로도 공지된 암피레굴린 ([Shoyab et al. *Science* 243:1074-1076 (1989)]; [Kimura et al. *Nature* 348:257-260 (1990)]; 및 [Cook et al. *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)]); 베타셀룰린 ([Shing et al., *Science* 259:1604-1607 (1993)]; 및 [Sasada et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)]); 헤파린-결합 표피 성장 인자 (HB-EGF) ([Higashiyama et al., *Science* 251:936-939 (1991)]); 에피레굴린 ([Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995)]; 및 [Komurasaki et al. *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)]); 헤레굴린 (하기 참조); 뉴레굴린-2 (NRG-2) ([Carraway et al., *Nature* 387:512-516 (1997)]); 뉴레굴린-3 (NRG-3) ([Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)]); 뉴레굴린-4 (NRG-4) ([Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)]); 및 크립토 (CR-1) ([Kannan et al. *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)])와 같은 천연 서열 인간 HER 리간드이다. EGFR에 결합하는 HER 리간드로는 EGF, TGF- $\alpha$ , 암피레굴린, 베타셀룰린, HB-EGF 및 에피레굴린을 들 수 있다. HER3에 결합하는 HER 리간드로는 헤레굴린을 들 수 있다. HER4에 결합할 수 있는 HER 리간드로는 베타셀룰린, 에피레굴린, HB-EGF, NRG-2, NRG-3,

NRG-4 및 헤레글린을 들 수 있다.

- [0067] 본원에 사용될 경우 "헤레글린" (HRG)은 미국 특허 제5,641,869호 또는 문헌 [Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]에 개시된 바와 같은 헤레글린 유전자 생성물에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 헤레글린의 예로는 헤레글린- $\alpha$ , 헤레글린- $\beta$ 1, 헤레글린- $\beta$ 2 및 헤레글린- $\beta$ 3 (문헌 [Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992)]; 및 미국 특허 제5,641,869호); *neu* 분화 인자 (NDF) ([Peles et al. *Cell* 69:205-216 (1992)]); 아세틸콜린 수용체-유도 활성화 (ARIA) ([Falls et al. *Cell* 72:801-815 (1993)]); 아교 성장 인자 (GGF) ([Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)]); 감각 및 운동 뉴런 유래된 인자 (SMDF) ([Ho et al. *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)]);  $\gamma$ -헤레글린 ([Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)])을 들 수 있다.
- [0068] 본원에서 "HER 이량체"는 2개 이상의 HER 수용체를 포함하는 비공유 결합된 이량체이다. 이러한 복합체는 예를 들어 문헌 [Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]에 기재된 바와 같이 2개 이상의 HER 수용체를 발현하는 세포를 HER 리간드에 노출시키고, 면역침전법에 의해 단리하고, SDS-PAGE에 의해 분석할 경우 형성될 수 있다. 사이토킨 수용체 서브유닛 (예를 들어, gp130)과 같은 다른 단백질은 이량체와 결합될 수 있다. 바람직하게는, HER 이량체는 HER2를 포함한다.
- [0069] 본원에서 "HER 이종이량체"는 EGFR-HER2, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이종이량체와 같은, 2개 이상의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유 결합된 이종이량체이다.
- [0070] "HER 억제제"는 HER 활성화 또는 기능을 간섭하는 작용제이다. HER 억제제의 예로는 HER 항체 (예를 들어, EGFR, HER2, HER3 또는 HER4 항체); EGFR-표적화된 약물; 소분자 HER 길항제; HER 티로신 키나제 억제제; HER2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 억제제, 예를 들어, 라파티니브/GW572016; 안티센스 분자 (예를 들어, WO 2004/87207 참조); 및/또는 MAPK 또는 Akt와 같은 하류 신호전달 분자에 결합하거나 그의 기능을 간섭하는 작용제 (도 5 참조)를 들 수 있다. 바람직하게는, HER 억제제는 HER 수용체에 결합하는 항체 또는 소분자이다.
- [0071] "HER 이량체화 억제제"는 HER 이량체 또는 HER 이종이량체의 형성을 억제하는 작용제이다. 바람직하게는, HER 이량체화 억제제는 항체, 예를 들어 그의 이종이량체 결합 부위에서 HER2에 결합하는 항체이다. 본원에서 가장 바람직한 HER 이량체화 억제제는 페르투주마브 또는 MAb 2C4이다. HER2의 이종이량체 결합 부위의 2C4의 결합은 도 4에 설명되어 있다. HER 이량체화 억제제의 다른 예로는 EGFR에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체 (예를 들어, 활성화된 또는 "비속박된" EGFR에 결합하는 EGFR 모노클로날 항체 806, MAb 806; 문헌 [Johns et al., *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)] 참조); HER3에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체; HER4에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체; 펩티드 이량체화 억제제 (미국 특허 제6,417,168호); 안티센스 이량체화 억제제 등을 들 수 있다.
- [0072] "HER2 이량체화 억제제"는 HER2를 포함하는 이량체 또는 이종이량체의 형성을 억제하는 작용제이다.
- [0073] "HER 항체"는 HER 수용체에 결합하는 항체이다. 임의로, HER 항체는 또한 HER 활성화 또는 기능을 간섭한다. 바람직하게는, HER 항체는 HER2 수용체에 결합한다. 본원에서 특정 관심의 HER2 항체는 페르투주마브이다. HER2 항체의 또다른 예는 트라스투주마브이다. EGFR 항체의 예로는 세투시마브 및 ABX0303을 들 수 있다.
- [0074] "HER 활성화"는 임의의 하나 이상의 HER 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 당해 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 있으며, 예를 들어 도 5를 참조한다.
- [0075] "인산화"는 HER 수용체 또는 그의 기질과 같은 단백질에의 하나 이상의 포스페이트기(들)의 첨가를 지칭한다.
- [0076] "HER 이량체화를 억제하는" 항체는 HER 이량체의 형성을 억제하거나 간섭하는 항체이다. 바람직하게는, 이러한 항체는 그의 이종이량체 결합 부위에서 HER2에 결합한다. 본원에서 가장 바람직한 이량체화 억제 항체는 페르투주마브 또는 MAb 2C4이다. HER2의 이종이량체 결합 부위의 2C4의 결합은 도 4에 설명되어 있다. HER 이량체화 억제제의 다른 예로는 EGFR에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체 (예를 들어, 활성화된 또는 "비속박된" EGFR에 결합하는 EGFR 모노클로날 항체 806, MAb 806; 문헌 [Johns et

al., *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)] 참조); HER3에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체; HER4에 결합하고 그와 하나 이상의 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하는 항체를 들 수 있다.

[0077] "HER 수용체의 리간드 활성화를 트라스투주마브보다 효과적으로 차단하는" 항체는 HER 수용체(들) 또는 HER 이량체(들)의 HER 리간드 활성화를 트라스투주마브보다 효과적으로 (예를 들어, 약 2배 이상 더 효과적으로) 감소 시키거나 제거하는 것이다. 바람직하게는, 이러한 항체는 적어도 대략 무린 모노클로날 항체 2C4 또는 그의 Fab 단편만큼, 또는 페르투주마브 또는 그의 Fab 단편만큼 효과적으로 HER 수용체의 HER 리간드 활성화를 차단한다. 항체가 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 능력은 HER 이량체를 직접적으로 연구함으로써, 또는 HER 이량체화로부터 초래되는 HER 활성화 또는 하류 신호전달을 평가함으로써, 및/또는 항체-HER2 결합 부위를 평가함으로써 등에 의해 평가될 수 있다. HER 수용체의 리간드 활성화를 트라스투주마브보다 효과적으로 억제하는 능력을 갖는 항체를 스크리닝하기 위한 분석은 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 (Adams et al.)에 기재되어 있다. 단지 예로써, HER 이량체 형성의 억제 (예를 들어, 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 1A 내지 B; 및 WO 01/00245 참조); HER 이량체를 발현하는 세포의 HER 리간드 활성화의 감소 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2A 내지 B); HER 이량체를 발현하는 세포에 결합하는 HER 리간드의 차단 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2E); HER 리간드의 존재 (또는 부재) 하에서 HER 이량체를 발현하는 암 세포 (예를 들어, MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D 세포)의 세포 성장 억제 (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 3A 내지 D); 하류 신호전달의 억제 (예를 들어, HRG-의존성 AKT 인산화의 억제 또는 HRG- 또는 TGF $\alpha$ -의존성 MAPK 인산화의 억제) (예를 들어, WO 01/00245 및 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)]의 도 2C 내지 D)를 분석할 수 있다. 또한, 항체가 HER 이량체화를 억제하는지 여부는 항체-HER2 결합 부위를 연구함으로써, 예를 들어 HER2에 결합된 항체의 결정체 구조와 같은 구조 또는 모델을 평가함으로써 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)] 참조).

[0078] HER2 상의 "이종이량체 결합 부위"는 그와의 이량체의 형성시 EGFR, HER3 또는 HER4의 세포외 도메인 내의 영역과 접촉하거나 그와 경계하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역을 지칭한다. 상기 영역은 HER2의 도메인 II에서 발견된다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).

[0079] HER2 항체는 "HRG-의존성 AKT 인산화를 억제할" 수 있고/거나 "HRG- 또는 TGF $\alpha$ -의존성 MAPK 인산화"를 트라스투주마브보다 효과적으로 (예를 들어, 2배 이상 더 효과적으로) 억제할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Agus et al. *Cancer Cell* 2:127-137 (2002)] 및 WO 01/00245 참조).

[0080] HER2 항체는 페르투주마브처럼 "HER2 엑토도메인 절단을 억제하지 않는" 것일 수 있다 (문헌 [Molina et al. *Cancer Res.* 61:4744-4749(2001)]). 반면, 트라스투주마브는 HER2 엑토도메인 절단을 억제할 수 있다.

[0081] HER2의 "이종이량체 결합 부위에 결합하는" HER 항체는 도메인 II 내의 잔기에 결합하며 (임의로 또한 도메인 I 및 III과 같은 HER2 세포외 도메인의 다른 도메인 내의 잔기에 결합하며), HER2-EGFR, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이종이량체의 형성을 적어도 어느 정도까지 억제할 수 있다. 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]은 HER2의 이종이량체 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 예시하면서, RCSB 단백질 데이터뱅크에 기탁된 (ID 코드 IS78) HER2-페르투주마브 결정체 구조를 특성화한다.

[0082] 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.

[0083] 단백질 "발현"은 유전자에서 전령 RNA (mRNA)로, 그 후 단백질로 코딩된 정보의 전환을 지칭한다.

[0084] 본원에서, 당해 단백질 (예를 들어, HER 수용체 또는 HER 리간드)을 "발현하는" 샘플 또는 세포는 단백질을 코딩하는 mRNA, 또는 그의 단편을 비롯한 단백질이 샘플 또는 세포에 존재하는 것으로 측정된 것이다.

[0085] 본원에 사용된 "증폭효소 연쇄 반응" 또는 "PCR"의 기술은 일반적으로 특정 조각의 핵산, RNA 및/또는 DNA의 미소한 양이 1987년 7월 28일자로 허여된 미국 특허 제4,683,195호에 기재된 바와 같이 증폭되는 절차를 지칭한다. 일반적으로, 당해 영역의 말단으로부터 또는 그 이상의 서열 정보는, 올리고뉴클레오티드 프라이머가 설계될 수 있도록 이용가능할 필요가 있으며, 상기 프라이머는 증폭될 주형의 반대 가닥과 서열이 동일하거나 유사할 것이다. 2개의 프라이머의 5' 말단 뉴클레오티드는 증폭된 물질의 말단과 일치할 수 있다. PCR은

총 게놈 DNA, 및 총 세포 RNA, 박테리오파지 또는 플라스미드 서열 등으로부터 전사된 cDNA로부터 특정 RNA 서열, 특정 DNA 서열을 증폭하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 문헌 [Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)]을 참조한다. 본원에 사용된 PCR은 프라이머로서 공지된 핵산 (DNA 또는 RNA)의 사용을 포함하는, 핵산 시험 샘플을 증폭시키는 핵산 증합효소 반응 방법의 유일하지는 않지만 한 가지 예인 것으로 간주되며, 특정 조각의 핵산을 증폭하거나 생성하는데 또는 특정 핵산과 상보적인 특정 조각의 핵산을 증폭하거나 생성하는데 핵산 증합효소를 이용한다.

[0086] "정량적 실시간 증합효소 연쇄 반응" 또는 "qRT-PCR"은 PCR 생성물의 양이 PCR 반응의 각각의 단계에서 측정되는 PCR의 형태를 지칭한다. 상기 기술은 문헌 [Cronin et al., *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004)]; 및 [Mat et al., *Cancer Cell* 5:607-616 (2004)]을 비롯한 다양한 간행물에 기재되었다.

[0087] "마이크로어레이"라는 용어는 기재 상의 혼성화가능한 어레이 요소, 바람직하게는 폴리뉴클레오티드 프로브의 정돈된 정렬을 지칭한다.

[0088] 단수로 또는 복수로 사용될 경우 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 일반적으로 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드로는 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-가닥, 보다 전형적으로 이중-가닥일 수 있거나, 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 DNA 및 RNA를 포함하는 혼성 분자를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본원에 사용된 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA 및 DNA 둘다를 포함하는 삼중-가닥 영역을 지칭한다. 이러한 영역에서 가닥은 동일한 분자 또는 상이한 분자로부터의 것일 수 있다. 상기 영역은 하나 이상의 분자의 모두를 포함할 수 있지만, 보다 전형적으로 일부 분자의 한 영역만을 포함한다. 삼중-나선 영역의 분자 중 하나는 종종 올리고뉴클레오티드이다. "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 구체적으로 cDNA를 포함한다. 상기 용어는 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA (cDNA 포함) 및 RNA를 포함한다. 따라서, 안정성을 위해 또는 다른 이유로 변형된 골격을 갖는 DNA 또는 RNA는 상기 용어가 그 안에 포함되기 때문에 "폴리뉴클레오티드"이다. 더욱이, 이노신과 같은 비통상적인 염기, 또는 삼중화된 염기와 같은 변형된 염기를 포함하는 DNA 또는 RNA는 본원에 정의된 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"라는 용어 내에 포함된다. 일반적으로, "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 비변형된 폴리뉴클레오티드의 모든 화학적, 효소적 및/또는 대사적으로 변형된 형태, 뿐만 아니라 단순 및 복합 세포를 비롯한 바이러스 및 세포의 DNA 및 RNA 특징의 화학적 형태를 포함한다.

[0089] "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 상대적으로 짧은 폴리뉴클레오티드를 지칭하며, 단일-가닥 데옥시리보뉴클레오티드, 단일- 또는 이중-가닥 리보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 이중-가닥 DNA를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 단일-가닥 DNA 프로브 올리고뉴클레오티드와 같은 올리고뉴클레오티드는 종종 화학적 방법에 의해, 예를 들어 시판되는 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 이용하여 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오티드는 시험관내 재조합 DNA-매개된 기술을 비롯한 다양한 다른 방법에 의해, 및 세포 및 유기체에서의 DNA의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0090] "유전자 증폭"이라는 어구는 유전자 또는 유전자 단편의 다중 카피가 특정 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 지칭한다. 복제된 영역 (증폭된 DNA의 스트레치)은 종종 "앰플리콘"으로 지칭된다. 통상적으로, 생성된 전령 RNA (mRNA)의 양은 또한 발현된 특정 유전자로 이루어진 카피의 수의 비율로 증가된다.

[0091] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 용이하게 측정가능하며, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따른 경험적인 계산이다. 일반적으로, 보다 긴 프로브는 완전한 어닐링을 위해 보다 높은 온도를 요구하는 반면, 보다 짧은 프로브는 보다 낮은 온도를 필요로 한다. 혼성화는 일반적으로 상보적 가닥이 그의 용융 온도 미만의 환경에 존재할 경우 변성된 DNA가 재어닐링되는 능력에 의존한다. 프로브 및 혼성화가능한 서열 사이의 목적하는 상동성이 보다 높은 정도이면, 사용될 수 있는 상대 온도도 보다 높다. 결과적으로, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 하는 경향이 있는 반면, 보다 낮은 온도는 덜 그렇다. 혼성화 반응의 엄격성의 추가의 상세사항 및 설명에 대해서는 문헌 [Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.

[0092] 본원에 정의된 "엄격한 조건" 또는 "고 엄격성 조건"은 전형적으로 (1) 낮은 이온화 농도 및 높은 세척 온도, 예를 들어 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 황산도데실나트륨을 사용하거나 (50°C); (2) 혼성화 동안 포름아미드와 같은 변성화제, 예를 들어 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피

폴리돈/750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 갖는 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.5)을 갖는 50% (v/v) 포름아미드를 사용하거나 (42°C); (3) 50% 포름아미드, 5xSSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5x 덴하르츠(Denhardt) 용액, 초음파처리된 연어 혈청 DNA (50 &g/g/mL), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 술페이트 (42°C), 0.2xSSC (염화나트륨/시트르산나트륨 중에서 42°C에서 세척 및 50% 포름아미드 (55°C)를 사용한 후, EDTA를 함유하는 0.1xSSC로 이루어진 고-염격성 세척 (55°C)을 사용한다.

[0093] "온건하게 엄격한 조건"은 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인될 수 있으며, 상기 기재된 것보다 덜 엄격한 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온화 농도 및 % SDS)의 사용을 포함한다. 온건하게 엄격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5x 덴하르츠 용액, 10% 텍스트란 술페이트 및 20 mg/mL 변성된 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액에서 밤새 인큐베이션 (37°C)한 후, 1xSSC에서 여액을 세척하는 것 (약 37 내지 50°C)을 포함한다. 당업자는 필요에 따라 프로브 길이 등과 같은 요인을 조정하기 위해 온도, 이온화 농도 등을 조정하는 방법을 인지할 것이다.

[0094] "천연 서열" 폴리펩티드는 천연 발생 또는 대립유전자 변이체를 비롯한, 천연으로부터 유래된 폴리펩티드 (예를 들어, HER 수용체 또는 HER 리간드)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이다. 이러한 천연 서열 폴리펩티드는 천연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성적 수단에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 천연 서열 폴리펩티드는 천연 발생 인간 폴리펩티드, 무린 폴리펩티드, 또는 임의의 다른 포유동물 종으로부터의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0095] 본원에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포괄한다.

[0096] 본원에 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터의 항체를 지칭하며, 즉 집단에 포함되는 개별 항체는 모노클로날 항체의 생성 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 (이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재함) 동일하고/거나 동일한 에피토프(들)에 결합한다. 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터의 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선별을 포함하는 과정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선별 과정은 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀과 같은 다수의 클론으로부터 고유한 클론을 선별하는 것일 수 있다. 선별된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양물에서의 그의 생성을 개선시키고, 생체내에서 그의 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체를 생성하는 등을 위해 추가로 변경될 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 모노클로날 항체이다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조물과 반대로, 모노클로날 항체 제조물의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대한 것이다. 그의 특이성 이외에, 모노클로날 항체 제조물은 이들이 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 변형어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특징을 나타내며, 항체의 생성이 임의의 특정 방법에 의할 것을 요구하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]; [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조), 파지 제시 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]; [Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004)]; [Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)]; [Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)]; 및 [Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 좌위 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서의 인간 또는 인간-유사 항체의 제조 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,591,669호 (모두 젠팜(GenPharm)); 제5,545,807호; WO 1997/17852; 미국 특허 제 5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호; [Marks et

al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0097] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면,쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체, 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 당해 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 에이프 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체, 뿐만 아니라 "인간화" 항체를 포함한다.

[0098] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역으로부터의 잔기가, 목적하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수여자 항체)이다. 일부의 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 상기 변형이 이루어져 항체 성능을 추가로 개량한다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프가 비-인간 이뮤노글로불린의 그것과 상응하는, 실질적으로 모든 하나 이상의, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것을 포함할 것이다. 추가의 상세사항에 대해서는 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0099] 인간화 HER2 항체로는 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8, 본원에 특별히 참고로 도입된 미국 특허 제5,821,337호의 표 3에 기재된 바와 같은 트라스투주마브 (헤르셉틴(등록상표)); 인간화 520C9 (WO 93/21319); 및 본원에 기재된 바와 같은 페르투주마브와 같은 인간화 2C4 항체를 들 수 있다.

[0100] 본원의 목적을 위해, "트라스투주마브," "헤르셉틴(등록상표)" 및 "huMAb4D5-8"은 각각 서열 15 및 16의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0101] 본원에서, "페르투주마브" 및 "옵니타르그(상표명)"는 각각 서열 13 및 14의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0102] 트라스투주마브 및 페르투주마브 기능 사이의 차이는 도 6에 설명되어 있다.

[0103] 본원에서 "비손상(intact) 항체"는 2개의 항원 결합 영역 및 Fc 영역을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 비손상 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다.

[0104] "항체 단편"은 바람직하게는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 비손상 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

[0105] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종 사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설피드 결합의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 많은 불변 도메인에 이어지는 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 하나의 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 (V<sub>L</sub>) 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 믿어진다.

[0106] "가변"이라는 용어는 가변 도메인의 특정 부분이 항체 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을

지칭하며, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘다에 있는 초가변 영역이라 불리는 3개의 절편에 집약되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은  $\beta$ -쉬트 구조를 연결하고 일부의 경우 그의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된  $\beta$ -쉬트 형태를 크게 채택하는 4개의 FR을 각각 포함한다. 각각의 쇠의 초가변 영역은 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 FR에 의해 가까이 근접하여 함께 수용되어 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여하지는 않지만, 항체가 항체 의존성 세포독성 (ADCC)에 참여하는 것과 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

- [0107] 본원에 사용될 경우 "초가변 영역"이라는 용어는 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24 내지 34 (L1), 50 내지 56 (L2) 및 89 내지 97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 31 내지 35 (H1), 50 내지 65 (H2) 및 95 내지 102 (H3); 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 상기 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26 내지 32 (L1), 50 내지 52 (L2) 및 91 내지 96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내의 잔기 26 내지 32 (H1), 53 내지 55 (H2) 및 96 내지 101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0108] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 잔여 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성한다.
- [0109] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 영역은 단단한 비-공유 결합의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정하는 것은 이러한 형태이다. 집합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 낮은 친화도이기 는 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절편)도 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0110] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 소수의 잔기가 첨가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 본원의 지칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.
- [0111] 임의의 척추동물 중으로부터의 항체의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 지칭되는 2가지 명백히 구별되는 형태 중 하나로 분류될 수 있다.
- [0112] 본원에서 "Fc 영역"이라는 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 비롯한 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기, 또는 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지 연장되는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따라 잔기 447)은 예를 들어 항체의 생성 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합적 유전자조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 비손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.
- [0113] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 이뮤노글로불린 중쇄의 잔기의 넘버링은 본원에 특별히 참고로 도입된 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 EU 색인의 것이다. "카바트에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.
- [0114] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 갖는다. 예시적인 "효과기 기능"으로는 C1q 결합;

보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 들 수 있다. 이러한 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합될 것을 요구하며, 예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 다양한 분석을 이용하여 평가될 수 있다.

- [0115] "천연 서열 Fc 영역"은 천연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역으로는 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역, 뿐만 아니라 그의 천연 발생 변이체를 들 수 있다.
- [0116] "변이체 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 그것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 가질 것이다.
- [0117] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 비손상 항체는 상이한 "부류"로 분류될 수 있다. 비손상 항체에는 5가지 주요한 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이는 "하위부류" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 더 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 삼차원 형태는 널리 공지되어 있다.
- [0118] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 중성구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 당해 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다.
- [0119] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 들 수 있으며; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 그의 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 단리될 수 있다.
- [0120] "Fc 수용체" 또는 "FcR"이라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재하는데 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이며, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체, 및 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 별법으로 스플라이싱된 형태를 들 수 있다. Fc $\gamma$ RII 수용체로는 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는, Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 들 수 있다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (검토를 위해 문헌 [M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]을 참조한다). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)]에서 검토되었다. 장래에 확인될 것들을 비롯한 다른 FcR은 본원에서 "FcR"이라는 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 모체 IgG를 태아에 전달하는 것을 담당하며 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).
- [0121] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활



성화 경로는 보체 시스템 (C1q)의 제1 성분의 동족체 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어, 항체)에의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

[0122] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 상기 도메인이 단일 폴리펩티드 쇠에 존재하는 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하도록 하는  $V_H$ 과  $V_L$  도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해서는 문헌 [Plueckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. HER2 항체 scFv 단편은 WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다.

[0123] "디아바디"라는 용어는 동일한 폴리펩티드 쇠 ( $V_H - V_L$ ) 내의 가변 경쇄 도메인 ( $V_L$ )에 연결된 가변 중쇄 도메인 ( $V_H$ )을 포함하는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이룰 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루며, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 충분히 기재되어 있다.

[0124] "네이키드(naked) 항체"는 세포독성 부분 또는 방사성표지와 같은 이중 분자와 컨주게이션되지 않은 항체이다.

[0125] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리되고/거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 간섭할 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바와 같이 항체 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 15 잔기 이상의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 획득하는데 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 동일계내에서 재조합 세포 내의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0126] "친화도 성숙된" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 초래하는 하나 이상의 그의 초가변 영역 내에 하나 이상의 변경을 갖는 것이다. 바람직한 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]에는  $V_H$  및  $V_L$  도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 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 기재되어 있다.

[0127] 본원에서 "주요종 항체"라는 용어는 조성물 중에 양적으로 우세한 항체 분자인, 조성물 중의 항체 아미노산 서열 구조를 지칭한다. 일 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.

[0128] 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 내의 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 선도자 연장물 (예를 들어, VHS-)을 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 관심의 항체 변이체는 그의 1개 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하며, 임의로 주요종 항체에 대해 다른 아미노산 서열 및/또는 글리코실화 차이를 추가로 포함하는 항체이다.

- [0129] 본원에서 "글리코실화 변이체" 항체는 주요중 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.
- [0130] 항체가 Fc 영역을 가질 경우, 올리고당류 구조는 항체의 1개 또는 2개의 중쇄에, 예를 들어 잔기 299 (잔기의 Eu 넘버링에서는 298)에 부착될 수 있다. 페르투주마브에 대해, G0이 우세한 올리고당류 구조였으며, G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 및 G2와 같은 다른 올리고당류 구조는 페르투주마브 조성물에서 보다 적은 양으로 발견되었다.
- [0131] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 "G1 올리고당류 구조"는 G-1, G1-1, G1(1-6) 및 G1(1-3) 구조를 포함한다.
- [0132] 본원에서 "아미노-말단 선도자 연장물"은 항체의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에 존재하는 아미노-말단 선도자 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 예시적인 아미노-말단 선도자 연장물은 항체 변이체의 경쇄 하나 또는 둘다 상에 존재하는 3개의 아미노산 잔기, VHS를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0133] "탈아미드화된" 항체는 그의 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 예를 들어 아스파르트산, 숙신이미드 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.
- [0134] "암" 및 "암성"이라는 용어는 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 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, 신경김종 (청신경종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 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.
- [0135] "진행성" 암은 국소 침입 또는 전이에 의해 기원의 부위 또는 기관 외부로 번지는 것이다.
- [0136] "난치성" 암은 화학요법제와 같은 항종양제가 암 환자에게 투여되고 있음에도 불구하고 진행되는 것이다. 난치성 암의 예는 백금 난치성인 것이다.
- [0137] "재발성" 암은 초기 요법에 대한 반응 후 초기 부위 또는 멀리 떨어진 부위에서 재성장하는 것이다.
- [0138] 본원에서 "환자"는 인간 환자이다. 환자는 "암 환자", 즉 암의 하나 이상의 증상을 앓고 있거나 그에 대한 위험에 있는 환자일 수 있다.
- [0139] 본원에서 "종양 샘플"은 환자의 종양으로부터 유래되거나 환자의 종양으로부터의 종양 세포를 포함하는 샘플이다. 본원에서 종양 샘플의 예로는 종양 생검, 순환성 종양 세포, 순환성 혈장 단백질, 복수액, 종양으로부터 유래되거나 종양-유사 특성을 나타내는 일차 세포 배양물 또는 세포주, 뿐만 아니라, 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 종양 샘플 또는 동결된 종양 샘플과 같은 보존된 샘플을 들 수 있다.
- [0140] "고정된" 종양 샘플은 고정제를 이용하여 조직학적으로 보존된 것이다.
- [0141] "포르말린-고정된" 종양 샘플은 고정제로서 포르말데히드를 이용하여 보존된 것이다.
- [0142] "포매된" 종양 샘플은 파라핀, 왁스, 셀로이딘 또는 수지와 같은 단단하고 일반적으로 견고한 매질에 의해 둘러싸인 것이다. 포매는 현미경적 검사 또는 조직 마이크로어레이 (TMA)의 생성을 위한 얇은 섹션의 절단을 가능하게 한다.
- [0143] "파라핀-포매된" 종양 샘플은 석유로부터 유래된 고형 탄화수소의 정제된 혼합물에 의해 둘러싸인 것이다.
- [0144] 본원에서, "동결된" 종양 샘플은 동결되거나 동결되었던 종양 샘플을 지칭한다.
- [0145] "HER 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서 HER 수용체를 발현하고/거나, HER 유전자를 증폭하고/거나, 다르게는 HER 수용체의 활성화 또는 인산화를 입증하는 것이다.

이러한 활성화는 직접적으로 (예를 들어, ELISA에 의한 HER 인산화를 측정함으로써) 또는 간접적으로 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 발현 프로파일링에 의해 또는 HER 이종이량체를 검출함으로써) 측정될 수 있다.

- [0146] 본원에서, "유전자 발현 프로파일링"은 직접적으로 HER 인산화를 측정하는 대리체로서 하나 이상의 유전자의 발현의 평가를 지칭한다.
- [0147] 본원에서 "인-ELISA 분석"은 하나 이상의 HER 수용체, 특히 HER2의 인산화가 인산화된 HER 수용체, 기질, 또는 하류 신호전달 분자를 검출하는 시약, 통상적으로 항체를 이용하여 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 평가되는 분석이다. 분석은 바람직하게는 신선하거나 동결된 생물학적 샘플로부터의 세포 용해물 상에서 수행될 수 있다.
- [0148] "HER 수용체 과발현 또는 증폭"을 갖는 암 세포는 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 HER 수용체 단백질 또는 유전자의 유의하게 보다 높은 수준을 갖는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭에 의해 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 분석; IHC를 통해) 진단 또는 예후 분석에서 측정될 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 세포의 HER-코딩 핵산의 수준은 예를 들어 형광 동일계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월자로 공개된 W098/45479), 서던 블롯팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 통해 측정할 수 있다. 또한, HER 수용체 과발현 또는 증폭은 혈청과 같은 생물학적 유체에서 웨드(shed) 항원 (예를 들어, HER 세포외 도메인)을 측정함으로써 연구할 수 있다 (예를 들어, 1990년 6월 12일자로 허여된 미국 특허 제4,933,294호; 1991년 4월 18일자로 공개된 W091/05264; 1995년 3월 28일자로 허여된 미국 특허 제5,401,638호; 및 문헌 [Sias et al. *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)] 참조). 상기 분석 이외에, 다양한 생체내 분석이 당업자에게 이용가능하다. 예를 들어, 환자의 신체 내의 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시킬 수 있으며, 항체의 세포에의 결합은 예를 들어 방사성활성에 대한 외부 스캐닝에 의해 또는 항체에 미리 노출된 환자로부터 수득된 생검을 분석함으로써 평가될 수 있다.
- [0149] 반대로, "HER2 수용체를 과발현하지 않는" 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해 정상적인 수준의 HER2 수용체보다 높게 갖지 않는 것이다. 페르투주마브와 같은 HER 이량체화를 억제하는 항체는 HER2 수용체를 과발현하거나 증폭하지 않는 암을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0150] 본원에서 "항종양제"는 암의 치료에 사용되는 약물을 지칭한다. 본원에서 항종양제의 비-제한적 예로는 화학요법제, HER 이량체화 억제제, HER 항체, 중앙 관련된 항원에 대한 항체, 항-호르몬 화합물, 사이토킨, EGFR-표적화된 약물, 항혈관신생제, 티로신 키나제 억제제, 성장 억제제 및 항체, 세포독성제, 아포토시스를 유도하는 항체, COX 억제제, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 중앙태아성 단백질 CA 125에 결합하는 항체, HER2 백신, Raf 또는 ras 억제제, 리포좀성 독소루비신, 토포테칸, 탁산, 이중 티로신 키나제 억제제, TLK286, EMD-7200, 페르투주마브, 트라스투주마브, 에를로티니브 및 베바시주마브를 들 수 있다.
- [0151] "승인된 항종양제"는 식품 의약품 안전청 (FDA) 또는 그의 외국 동등청과 같은 규제 기관에 의해 시판 승인을 받은, 암을 치료하는데 사용되는 약물이다.
- [0152] HER 이량체화 억제제가 "단일 항종양제"로서 투여될 경우, 이는 암을 치료하기 위해 투여되는 유일한 항종양제이며, 즉 이는 화학요법과 같은 또다른 항종양제와 조합으로 투여되지 않는다.
- [0153] 본원에서 "치료의 표준물"은 특정 형태의 암을 치료하는데 통상적으로 사용되는 항종양제 또는 작용제로 의도된다. 예를 들어, 백금-내성 난소암에 대해, 치료의 표준물은 토포테칸 또는 리포좀성 독소루비신이다.
- [0154] 본원에 사용될 경우 "성장 억제제"는 세포의 성장, 특히 시험관내 또는 생체내에서 HER 발현 암 세포를 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기의 HER 발현 세포의 퍼센트를 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예로는 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 작용제와 같은 세포 주기 진행 (S기 이외의 장소에서)을 차단하는 작용제를 들 수 있다. 전통적인 M-기 차단제로는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신과 같은 토포 II 억제제를 들 수 있다. 정지 G1이 또한 S-기 정지로 넘어가는 작용제는 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토틱세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제이다. 추가의 정보는 문헌 [*The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia,

1995)], 특히 제13면에서 발견할 수 있다.

- [0155] "성장 억제성" 항체의 예는 HER2에 결합하며 HER2를 과발현하는 암 세포의 성장을 억제하는 것들이다. 바람직한 성장 억제성 HER2 항체는 세포 배양물 내의 SK-BR-3 유방 종양 세포의 성장을, 성장 억제를 SK-BR-3 세포의 항체에 노출 후 6일에 측정했을 때 약 0.5 내지 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 농도에서 20% 초과, 바람직하게는 50% 초과 (예를 들어, 약 50%내지 약 100%)로 억제한다 (1997년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 제5,677,171호 참조). SK-BR-3 세포 성장 억제 분석은 상기 특허 및 하기에 보다 상세히 기재되어 있다. 바람직한 성장 억제성 항체는 무린 모노클로날 항체 4D5의 인간화 변이체, 예를 들어 트라스투주마브이다.
- [0156] "아포토시스를 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 베지클 (아포토시스 바디라고 불림)의 형성에 의해 측정되는 바와 같은 프로그램된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 통상적으로 HER2 수용체를 과발현하는 것이다. 바람직하게는, 세포는 종양 세포, 예를 들어 유방, 난소, 위, 자궁내막, 타액선, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관내에서, 세포는 SK-BR-3, BT474, Calu 3 세포, MDA-MB-453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 아포토시스와 관련된 세포 사건을 평가하는 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 포스포티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고, DNA 단편화는 DNA 래더링(laddering)을 통해 평가될 수 있으며, DNA 단편화와 함께 핵/염색질 응축은 저이배체 세포의 임의의 증가에 의해 평가될 수 있다. 바람직하게는, 아포토시스를 유도하는 항체는 BT474 세포 (하기 참조)를 이용한 아넥신 결합 분석에서 비처리된 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 유도하는 것이다. 아포토시스를 유도하는 HER2 항체의 예는 7C2 및 7F3이다.
- [0157] "에피토프 2C4"는 항체 2C4가 결합하는 HER2의 세포의 도메인 내의 영역이다. 2C4 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 2C4의 HER2에의 결합을 약 50% 이상까지 차단한다. 방법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 HER2의 2C4 에피토프에 결합하는지 여부를 평가할 수 있다. 에피토프 2C4는 HER2의 세포의 도메인 내에 도메인 II로부터의 잔기를 포함한다. 2C4 및 페르투주마브는 도메인 I, II 및 III의 연결부에서 HER2의 세포의 도메인에 결합한다 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]).
- [0158] "에피토프 4D5"는 항체 4D5 (ATCC CRL 10463) 및 트라스투주마브가 결합하는 HER2의 세포의 도메인 내의 영역이다. 상기 에피토프는 HER2의 막관통 도메인에 근접하며, HER2의 도메인 IV 내에 있다. 4D5 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 방법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 HER2의 4D5 에피토프 (예를 들어, 대략 잔기 529 내지 대략 잔기 625의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기, HER2 ECD 포함, 신호 펩티드를 포함하는 넘버링)에 결합하는지 여부를 평가할 수 있다.
- [0159] "에피토프 7C2/7F3"은 7C2 및/또는 7F3 항체 (각각 ATCC에 기탁됨, 하기 참조)가 결합하는 HER2의 세포의 도메인의 도메인 I 내의 N 말단의 영역이다. 7C2/7F3 에피토프에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위해, 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 방법으로, 에피토프 지도화를 수행하여 항체가 HER2 상의 7C2/7F3 에피토프 (예를 들어, HER2 ECD의 대략 잔기 22 내지 대략 잔기 53의 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기, 신호 펩티드를 포함하는 잔기 넘버링)에 결합하는지 여부를 확립할 수 있다.
- [0160] "치료"는 치료적 처치 및 방지적 또는 예방적 수단 둘다를 지칭한다. 치료가 필요한 것들은 이미 암을 갖는 것들 뿐만 아니라 암이 예방되어야 할 것들을 포함한다. 따라서, 본원에서 치료되어야 할 환자는 암을 갖는 것으로 진단되었을 수 있거나, 암에 걸리기 쉽거나 감수성일 수 있다.
- [0161] "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 감속, 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 일정 정도로 감속, 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장을 일정 정도로 억제하고/거나 암과 관련된 하나 이상의 증상을 일정 정도로 완화시킬 것이다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 예방하고/거나 이를 사멸시킬 수 있는 정도까지는, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 유효량은 진행이 없는 생존을 연장시키고/거나 (예를 들어, 고형 종양에 대한 반응 평가 범주, RECIST, 또는 CA-125 변화에 의해 측정됨), 객관적인 반응 (부분적 반응, PR 또는 완전한 반응, CR 포

함)을 초래하고/거나, 전체 생존 시간을 증가시키고/거나, 암의 하나 이상의 증상을 개선시킬 수 있다 (예를 들어, FOSI에 의해 평가됨).

[0162] 본원에 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소와 같은 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0163] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)(등록상표) 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; TLK 286 (텔시타(TELCYTA)(상표명)); 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)(등록상표)); 베타-라파론; 라파롤; 콜히친; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCANTIN)(등록상표)), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)(등록상표) 포함), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘뤼테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 항생제, 예를 들어 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, 예를 들어 안나마이신, AD 32, 알카루비신, 다우노루비신, 텍스라족산, DX-52-1, 에피루비신, GPX-100, 이다루비신, KRN5500, 메노가릴, 디네미신 A를 비롯한 디네미신, 에스페라미신, 네오카르지노스타틴 크로모포어 및 관련된 크로모프로테인 에네디인 항생제 크로모포어, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)(등록상표) 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 리포좀 독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 엑소루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴 및 조루비신; 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 프테로프테린 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈 및 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스타탄 및 테스톨락톤; 항-아드레날제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄 및 트릴로스타탄; 엽산 보충제, 예를 들어 폴린산 (류코보린); 아세글라톤; 항-엽산 항신생물제, 예를 들어 알림타(ALIMTA)(등록상표), LY231514 페메트렉시드, 디히드로폴레이트 리덕타제 억제제, 예를 들어 메토트렉세이트, 항대사물, 예를 들어 5-플루오로우라실 (5-FU) 및 그의 프로드러그, 예를 들어 UFT, S-1 및 카페시타빈, 및 티미딜레이트 신타제 억제제 및 글리신아미드 리보뉴클레오티드 포르밀트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어 말티트렉시드 (토무덱스(TOMUDEX)(상표명), TDX); 디히드로피리미딘 데히드로게나제의 억제제, 예를 들어 에닐우라실; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니탄; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 켈탄산; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토코산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소코산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당류 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진 소재); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)(등록상표), 필데신(FILDESIN)(등록상표)); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톤; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드 및 탁산, 예를 들어 탁솔(TAXOL)(등록상표) 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스쿼브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴 소재), 아브락산(ABRAXANE)(상표명) 파클리탁셀의 크레모포어-무함

유, 알부민-유전자조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그 소재) 및 탁소테레(TAXOTERE)(등록상표) 도세탁셀 (롱-플랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니 소재); 클로란부실; 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)(등록상표)); 6-티오구아닌; 머캅토피린; 백금; 백금 유사체 또는 백금-기재 유사체, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)(등록상표)); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토크산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)(등록상표)); 빈카 알칼로이드; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)(등록상표)); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이단드로네이트; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)(상표명))을 사용한 치료 처방에 대한 약어인 FOLFOX와 같은, 2 이상의 상기 것들의 조합을 들 수 있다.

- [0164] 상기 정의에는 또한, 종양에 대한 호르몬 활성을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)(등록상표) 타목시펜 포함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)(등록상표) 토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 아드레날효소-아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가스(MEGASE)(등록상표) 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)(등록상표) 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, 리비소어(RIVISOR)(등록상표) 보로졸, 페마라(FEMARA)(등록상표) 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)(등록상표) 아나스트로졸; 및 항-안드로젠, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상적 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)(등록상표) 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)(등록상표) 백신 및 박시드(VAXID)(등록상표) 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)(등록상표) rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)(등록상표) 토포이소메라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)(등록상표) rmRH; 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다. "항대사물 화학요법제"는 대사물과 구조적으로 유사하지만 신체에 의해 생산적 방식으로 사용되지 않을 수 있는 작용제이다. 많은 항대사물 화학요법제는 핵산, RNA 및 DNA의 생성을 간섭한다. 항대사물 화학요법제의 예로는 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)(등록상표)), 5-플루오로우라실 (5-FU), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)(상표명)), 6-머캅토피린, 메토티렉세이트, 6-티오구아닌, 페메트렉세이트, 탈티트렉세이트, 아라비노실시토신 ARA-C 시타라빈 (시토사르(CYTOSAR)-U(등록상표)), 다카르바진 (DTIC-DOME)(등록상표), 아조시토신, 데옥시시토신, 피리드미텐, 플루다라빈 (플루다라(FLUDARA)(등록상표)), 클라드라빈, 2-데옥시-D-글루코스 등을 들 수 있다. 바람직한 항대사물 화학요법제는 겐시타빈이다.
- [0165] "겐시타빈" 또는 "2'-데옥시-2',2'-디플루오로시딘 모노히드로클로라이드 (b-이성질체)"는 항종양 활성을 나타내는 뉴클레오시드 유사체이다. 겐시타빈 HCl에 대한 실험식은  $C_9H_{11}F_2N_3O_4 \cdot HCl$ 이다. 겐시타빈 HCl은 일라이 릴리(Eli Lilly)에서 상표명 겐자르(등록상표)로 시판된다.
- [0166] "백금-기재 화학요법제"는 분자의 필수 부분으로서 백금을 함유하는 유기 화합물을 포함한다. 백금-기재 화학요법제의 예로는 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴을 들 수 있다.
- [0167] "백금-기재 화학요법"은 임의로 하나 이상의 다른 화학요법제와 조합된 하나 이상의 백금-기재 화학요법제를 사용한 요법으로 의도된다.
- [0168] "화학요법-내성" 암은 화학요법 처방을 받는 동안 암 환자가 진행되거나 (즉, 환자가 "화학요법 난치성"임), 환자가 화학요법 처방을 완료한 후 12개월 내에 (예를 들어, 6개월 내에) 진행되는 것을 의미한다.
- [0169] "백금-내성" 암은 백금-기재 화학요법을 받는 동안 암 환자가 진행되거나 (즉, 환자가 "백금 난치성"임), 환자가 백금-기재 화학요법 처방을 완료한 후 12개월 내에 (예를 들어, 6개월 내에) 진행되는 것을 의미한다.
- [0170] "항혈관신생제"는 혈관의 발달을 일정 정도로 차단하거나 간섭하는 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)(등록상표))와 같은 혈관 표피 성장 인자(VEGF)에 결합하는 항체이다.
- [0171] "사이토킨"이라는 용어는 세포내 매개자로서 또다른 세포에 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질

에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토킨의 예로는 림포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬을 들 수 있다. 사이토킨 중에 포함되는 것은 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬, 파라갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 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; 중앙 피사 인자- $\alpha$  및  $-\beta$ ; 물러리안-역제 물질; 마우스 생식선자극호르몬-관련 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 표피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); NGF- $\beta$ 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ 와 같은 전환 성장 인자 (TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론- $\alpha$ ,  $-\beta$  및  $-\gamma$ 와 같은 인터페론; 대식세포-CSF (M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자 (CSF); 과립백혈구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립백혈구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; TNF- $\alpha$  또는 TNF- $\beta$ 와 같은 중앙 피사 인자; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자를 들 수 있다. 본원에 사용된 사이토킨이라는 용어는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

[0172] 본원에 사용된 "EGFR-표적화된 약물"이라는 용어는 EGFR에 결합하고, 임의로 EGFR 활성화를 억제하는 치료제를 지칭한다. 이러한 작용제의 예로는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 들 수 있다. EGFR에 결합하는 항체의 예로는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (멘델존(Mendelsohn) 등에게 허여된 미국 특허 제4,943,533호 참조) 및 그의 변이체, 예를 들어 키메라화된 225 (C225 또는 세특시마브; 에르부티스(ERBUTIX)(등록상표)) 및 재구성된 인간 225 (H225) (WO 96/40210, 임클론 시스템스 인크.(Imclone Systems Inc.) 참조); IMC-11F8, 완전한 인간, EGFR-표적화된 항체 (임클론); 제II형 돌연변이체 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 제5,212,290호); 미국 특허 제5,891,996호에 기재된 바와 같은 EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예를 들어 ABX-EGF 또는 파니투무마브 (WO 98/50433, 아브게닉스(Abgenix)/암젠(Amgen)); EMD 55900 (문헌 [Stragliotto et al. *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)]); EMD7200 (마투주마브), EGFR 결합에 대해 EGF 및 TGF-알파 둘다와 경쟁하는 EGFR에 대한 인간화 EGFR 항체(EMD/머크(Merck)); 인간 EGFR 항체, HuMax-EGFR (젠맵(GenMab)); 미국 특허 제6,235,883호에 기재되고 E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 및 E7.6.3으로 공지된 완전한 인간 항체; MDX-447 (메다렉스 인크(Medarex Inc)); 및 mAb 806 또는 인간화 mAb 806 (문헌 [Johns et al., *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)])를 들 수 있다. 항-EGFR 항체는 세포독성제와 컨쥬게이션되어 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다 (예를 들어, EP 659,439 A2, 머크 페이턴트 게엠베하(Merck Patent GmbH) 참조). EGFR에 결합하는 소분자의 예로는 ZD1839 또는 게피티니브(Gefitinib) (이레사(IRESSA)(상표명); 아스트라제네카(Astra Zeneca)); CP-358774 또는 에를로티니브 (타르세바(TARCEVA)(상표명); 제넨테크/OSI); 및 AG1478, AG1571 (SU 5271; 수젠(Sugen)); EMD-7200을 들 수 있다.

[0173] "티로신 키나제 억제제"는 HER 수용체와 같은 티로신 키나제의 티로신 키나제 활성을 억제하는 분자이다. 이러한 억제제의 예로는 선행 문단에서 언급된 EGFR-표적화된 약물; 다게다(Takeda)에서 시판되는 TAK165와 같은 소분자 HER2 티로신 키나제 억제제; CP-724,714, ErbB2 수용체 티로신 키나제의 경구 선택적 억제제 (화이자 및 OSI); EGFR에 선택적으로 결합하지만 HER2 및 EGFR-과발현 세포 둘다를 억제하는 EKB-569 (와이어스에서 시판)와 같은 이중-HER 억제제; 라파티니브 (GW572016; 글락소-스미스클라인에서 시판), 경구 HER2 및 EGFR 티로신 키나제 억제제; PKI-166 (노파르티스(Novartis)에서 시판); 카네르티니브 (CI-1033; 파마시아(Pharmacia))와 같은 pan-HER 억제제; ISIS 파마슈티칼스(ISIS Pharmaceuticals)에서 시판되는 Raf-1 신호전달을 억제하는 안티센스 제제 ISIS-5132와 같은 Raf-1 억제제; 글락소에서 시판되는 이마티니브 메실레이트 (글리백(GLEEVEC(상표명))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 부분을 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lamber)); 안티센스 분자 (예를 들어, HER-코딩 핵산에 결합하는 것들); 퀴녹살린 (미국 특허 제5,804,396호); 트리포스틴 (미국 특허 제5,804,396호); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게(Schering AG)); CI-1033 (화이자)와 같은 pan-HER 억제제; 아피니타크 (Affinitac) (ISIS 3521; 이시스(isis)/릴리(Lilly)); 이마티니브 메실레이트 (글리백; 노파르티스); PKI 166 (노파르티스); GW2016 (글락소스미스클라인); CI-1033 (화이자); EKB-569 (와이어스); 세막시니브 (서젠); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); INC-IC11 (임클론); 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 (위너 램버트); WO 99/06378 (위너 램버트); WO 99/06396 (위너 램버트); WO 96/30347 (화이자, 인크); WO 96/33978 (제네카); WO 96/3397 (제네카); WO 96/33980 (제네카)을 들 수 있다.

[0174] 본원에서 치료제의 "고정" 또는 "균일" 투여량은 환자의 체중 (WT) 또는 체표면적 (BSA)에 관계 없이 인간 환자에게 투여되는 투여량을 지칭한다. 따라서, 고정 또는 균일 투여량은 mg/kg 투여량 또는  $mg/m^2$  투여량으로서 제공되지 않고, 오히려 치료제의 절대량으로서 제공된다.

[0175] 본원에서 "로딩" 투여량은 일반적으로 환자에게 투여되는 치료제의 초기 투여량을 포함하며, 하나 이상의 그의 유지 투여량(들)이 이어진다. 일반적으로, 단일 로딩 투여량이 투여되지만, 다회 로딩 투여량이 본원에서 고려된다. 통상적으로, 투여되는 로딩 투여량(들)의 양은 투여되는 유지 투여량(들)의 양을 초과하고/거나 로딩 투여량(들)은 유지 투여량(들)로 달성될 수 있는 초기 치료제의 목적하는 안정-상태 농도를 달성하도록 유지 투여량(들)보다 빈번히 투여된다.

[0176] 본원에서 "유지" 투여량은 치료 기간에 걸쳐 환자에게 투여되는 치료제의 하나 이상의 투여량을 지칭한다. 통상적으로, 유지 투여량은 대략 매주, 대략 매 2주, 대략 매 3주, 또는 대략 매 4주마다와 같은 이격된 치료 간격으로 투여된다.

[0177] II. 항체의 생산

[0178] 따라서, 일 실시양태에서, HER 이량체화 억제제는 항체이며, 본 발명에 따라 사용되는 HER 항체의 생산을 위한 예시적인 기술에 대한 기재가 이어진다. 항체의 생산에 사용되는 HER 항원은 예를 들어 목적하는 에피토프를 함유하는 HER 수용체의 세포의 도메인 또는 그의 일부의 가용성 형태일 수 있다. 별법으로, 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.

[0179] (i) 폴리클로날 항체

[0180] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복막내 (ip) 주사에 의해 동물에서 발생된다. 이는 면역화되어야 할 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림팻 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), 글루타라알데히드, 숙신산 무수물,  $SOCl_2$ , 또는  $R^1N=C=NR$  (여기서, R 및  $R^1$ 은 상이한 알킬기임)에 관련 항원을 컨쥬게이션하는데 유용할 수 있다.

[0181] 동물을 예를 들어 프로인트 완전 아주반트 3 부피를 갖는 단백질 또는 컨쥬게이트 (토끼 또는 마우스에 대해 각각) 100  $\mu g$  또는 5  $\mu g$  를 배합하고, 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써 항원, 면역원성 컨쥬게이트 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후, 동물을 다중 부위에 피하 주사에 의해 프로인트 완전 아주반트 중 펩티드 또는 컨쥬게이트의 원래 양을 1/5 내지 1/10으로 추가주사한다. 7 내지 14일 후, 동물을 채혈하고, 혈청을 항체 역가에 대해 분석한다. 동물을 역가가 안정수준에 달할 때까지 추가주사한다. 바람직하게는, 동물을 동일한 항원의 컨쥬게이트로 추가주사하지만, 상이한 단백질 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 컨쥬게이션하기도 한다. 컨쥬게이트는 또한 단백질 용합물로서 재조합 세포 배양물로 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제가 면역 반응을 증진시키는데 적합하게 사용된다.

[0182] (ii) 모노클로날 항체

[0183] 본원에서 모노클로날 항체를 제조하는 다양한 방법이 당업계에 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.

[0184] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 다른 적절한 숙주 생물을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 별법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 림프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합화제를 사용하여 골수종 세포와 용합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).



- [0185] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 씨딩하고, 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 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이들의 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.
- [0186] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고-수준 생산을 뒷받침하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 미국 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 살크 인스티튜트 세포 분화 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들, 및 미국 메릴랜드주 로크빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)에서 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포와 같은 무린 골수종 세포주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 제조를 위해 기재되었다 (문헌 [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)]; 및 [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0187] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 항원에 대한 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법에 의해, 또는 방사성면역분석 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석에 의해 측정된다.
- [0188] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0189] 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.
- [0190] 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.
- [0191] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고, 시퀀싱된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 단리하면, DNA를 발현 벡터 내에 놓은 후, 이. 콜라이(*E. Coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 다르게는 항체 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포 내의 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문으로는 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)]을 들 수 있다.
- [0192] 추가의 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여, 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에는 각각 파지 라이브러리를 이용한 무린 및 인간 항체의 단리가 기재되어 있다. 후속 간행물에는 사슬 서플링에 의한 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합적 감염 및 생체내 재조합이 기재되어 있다 (문헌 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)]). 따라서, 상기 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- [0193] DNA는 또한 예를 들어 동종 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체함으로써 (미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다.
- [0194] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 이들로 항체의 하나의

항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.

- [0195] (iii) 인간화 항체
- [0196] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되었다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 공급원으로부터 그의 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법에 따라, 초가변 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행된다 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜 비손상인 인간 가변 도메인이 비-인간 중으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 제 4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0197] 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)]).
- [0198] 항체가 항원에 대한 고 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것은 또한 중요하다. 상기 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체를 모 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적인 인간화 생성물의 분석의 방법에 의해 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 예시 및 제시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 디스플레이의 점검은 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린의 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선택하고, 수여자 및 도입 서열로부터 결합하여 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 목적하는 항체 특징이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는 것에 관여한다.
- [0199] WO 01/00245에는 HER2에 결합하고 HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 예시적인 인간화 HER2 항체의 생산이 기재되어 있다. 본원에서 특정 관심의 인간화 항체는 EGF, TGF- $\alpha$  및/또는 MAPK의 HRG 매개된 활성화를 본질적으로 비손상 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 차단하고/거나 HER2에 본질적으로 비손상 뮤린 모노클로날 항체 2C4 (또는 그의 Fab 단편)만큼 효과적으로 결합한다. 본원에서 인간화 항체는 예를 들어 인간 가변 중쇄 도메인 내로 도입된 비인간 초가변 영역 잔기를 포함할 수 있으며, 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 설명된 가변 도메인 넘버링 시스템을 이용한 69H, 71H 및 73H으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 프레임워크 영역 (FR) 치환을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 인간화 항체는 위치 69H, 71H 및 73H의 2개 또는 전부에 FR 치환을 포함한다.
- [0200] 본원에서 관심의 예시적인 인간화 항체는 가변 중쇄 상보성 결정 잔기 GFTFTDYTMX (여기서, X는 바람직하게는 D 또는 S임) (서열 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (서열 8); 및/또는 NLGPSFYFDY (서열 9)를 포함하며, 임의로 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 포함하고, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 관심의 항체 변이체는 상기 가변 중쇄 CDR 서열에 약 1개 내지 약 7개 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 가장 바람직한 인간화 항체는 서열 4의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0201] 인간화 항체는 예를 들어 선행 문단의 가변 중쇄 도메인 CDR 잔기 이외에 가변 경쇄 상보성 결정 잔기 KASQDVSIGVA (서열 10); SASYX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup> (여기서, X<sup>1</sup>은 바람직하게는 R 또는 L이고, X<sup>2</sup>는 바람직하게는 Y 또는 E이고, X<sup>3</sup>은 바람직하게는 T 또는 S임) (서열 11); 및/또는 QQYYIYPYT (서열 12)를 포함할 수 있다. 이러한 인

간화 항체는 상기 CDR 잔기의 아미노산 변형을 임의로 포함하며, 예를 들어 변형은 본질적으로 항체의 친화도를 유지하거나 개선한다. 예를 들어, 당해 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.

[0202] 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 (즉, 페르투주마브의 VL 및/또는 VH를 포함하는) 것일 수 있다. 친화도 성숙된 항체는 바람직하게는 비손상 류틴 2C4 또는 페르투주마브의 것보다 우수한 친화도 (예를 들어, HER2-세포외 도메인 (ECD) ELISA를 이용하여 평가된 바와 같이, 예를 들어 약 2배 또는 약 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 2개 이상 (상기 잔기 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 조합을 들 수 있다. 변경을 위한 가변 경쇄 CDR 잔기의 예로는 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97, 또는 2개 이상 (상기 잔기 2 내지 3, 4, 5개 또는 약 10개 이하)의 조합을 들 수 있다.

[0203] 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체의 다양한 형태가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 이뮤노컨쥬게이트를 생성하기 위한 1종 이상의 세포독성제(들)과 임의로 컨쥬게이션된 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.

[0204] (iv) 인간 항체

[0205] 인간화에 대한 별법으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화시 내인성 이뮤노글로블린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 카메라 및 생식 계열 돌연변이체 내의 항체 중쇄 결합 영역 (J<sub>H</sub>)의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다고 기재되었다. 이러한 생식 계열 돌연변이체 마우스 내의 인간 생식 계열 이뮤노글로블린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제 5,591,669호, 제 5,589,369호 및 제 5,545,807호를 참조한다. 별법으로, 파지 제시 기술 (문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)])을 이용하여 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여자로부터의 이뮤노글로블린 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 검토를 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 절편의 몇몇 공급원은 파지 제시에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있으며, 항원의 다양한 어레이에 대한 항체 (자가-항원 포함)은 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제 5,565,332호 및 제 5,573,905호를 참조한다.

[0206] 상기 논의된 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제 5,567,610호 및 제 5,229,275호 참조).

[0207] 인간 HER2 항체는 1998년 6월 30일자로 허여된 미국 특허 제 5,772,997호 및 1997년 1월 3일자로 공개된 WO 97/00271에 기재되어 있다.

[0208] (v) 항체 단편

[0209] 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비손상 항체의 단백질분해성 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*

24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 상기 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 과지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]). 또다른 접근법에 따르면, F(ab')<sub>2</sub> 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택의 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0210] (vi) 이중특이적 항체

[0211] 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 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 A 쇠, 메토티렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)을 결합시키는 팔을 갖는다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0212] 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.

[0213] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 쇠가 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 한다 (문헌 [Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위적 구분 때문에, 상기 하이브리도마 (과드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거로우며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차는 WO 93/08829 및 문헌 [Trauncker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0214] 상이한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)는 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 이는 하나 이상의 융합물에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합물, 및 필요할 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터 내로 삽입되며, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염된다. 이는 구축에 사용되는 3개의 폴리펩티드 쇠의 비동일한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시예에서, 3개의 폴리펩티드의 상호 비율을 조정하는 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드 쇠의 동일한 비율의 발현이 높은 수율을 초래할 경우 또는 비율이 특정 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터 내의 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0215] 상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 팔에 혼성 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 단지 절반 내의 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 목적하는 이중특이적 화합물의 원하지 않는 이뮤노글로불린 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.

[0216] 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 도메인

의 적어도 일부의 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)으로 대체된다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보충적 "공동"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동중이량체와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

[0217] 이종특이적 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 당업계에서 널리 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0218] 항체 단편으로부터 이종특이적 항체를 생성하는 기술은 또한 문헌에 기재되었다. 예를 들어, 이종특이적 항체는 화학 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]에는 비손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 상기 단편을 티올 착물화제 나트륨 아르세나이트의 존재하에서 환원시켜 근접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캡토에틸아민을 사용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 다른 Fab'-TNB 유도체의 동몰량과 혼합하여 이종특이적 항체를 형성한다. 생성된 이종특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

[0219] 최근의 진보는 화학적으로 커플링되어 이종특이적 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 이종특이적 항체 F(ab')<sub>2</sub> 분자의 제조가 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분리하고, 지정 시험관내 화학적 커플링시켜 이종특이적 항체를 형성하였다. 이렇게 형성된 이종특이적 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.

[0220] 제조할 세포 배양물로부터 직접적으로 이종특이적 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이종특이적 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 동중이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 후, 재산화시켜 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동중이량체의 제조에 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편을 제조하는 별법의 메커니즘을 제공하였다. 단편은, 너무 짧아서 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이룰 수 없는 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인은 또다른 단편의 상보적 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이종특이적 항체 단편을 제조하는 또다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0221] 2 이상의 결합가(valence)를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다 (문헌 [Tutt et al. *J. Immunol.* 147:60 (1991)]).

[0222] (vii) 다른 아미노산 서열 변형

[0223] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내로 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구조물이 목적하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구조물에 도달한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이 항체의 번역후 과정을 변화시킬 수 있다.

[0224] 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 기 (예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu와 같은 하전된 잔기)를 확인하고, 이를 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 준다. 그 후, 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 상기 아미노산 위치를 치환 부위에서, 또는 그에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 예정되는 반면, 돌연변이의 성질 그 자체는 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 돌연변이의 성능을 주어진 부위에서 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 변이체를 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0225] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 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.

[0226] 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 영역 또는 CDR을 들 수 있지만, FR 또는 Fc 영역 변경도 고려된다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"이라는 표제하에 나타나 있다. 이러한 치환이 생물학적 활성에 변화를 초래할 경우, 표 1의 "예시적인 치환"으로 명명된, 또는 아미노산 부류에 대해 하기에 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물이 스크리닝될 수 있다.

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

[0227]

[0228] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 슈트 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)]):

[0229] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

- [0230] (2) 비하전된 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- [0231] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)
- [0232] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)
- [0233] 방법으로, 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기재한 기로 나누어질 수 있다.
- [0234] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0235] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0236] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0237] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0238] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0239] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0240] 비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원으로 또다른 구성원을 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0241] 또한, 일반적으로 항체의 완전한 형태를 유지하는데 관련되지 않는 임의의 시스테인 잔기를 세린으로 치환하여 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결함(들)을 항체에 첨가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편일 경우).
- [0242] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 제시를 사용한 친화도 성숙을 포함한다. 간략히, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7 부위)를 돌연변이시켜 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성할 수 있다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물과의 융합으로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 일가 형태로 제시된다. 그 후, 파지-제시된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발법을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 방법으로 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 huma HER2 사이의 접촉 지점을 확인하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에 설명된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.
- [0243] 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.
- [0244] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 상기 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당, 즉 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록실리신도 사용될 수 있다.
- [0245] 글리코실화 부위의 항체에의 첨가는 편리하게는 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대해). 변경은 또한 원래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 그것으로의 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해).
- [0246] 항체가 Fc 영역을 포함할 경우, 그에 부착된 임의의 올리고당류 구조는 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체는 미국 특허 출원 제US 2003/0157108 A1 (Presta. L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 A1 (교와 하꼬 고교 가부시끼가이샤(Kyowa Hakko

Kogyo Co., Ltd))를 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 구조 내에 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 03/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 제6,602,684호 (Umana et al.)에 기재되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당류 구조 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO 97/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 그의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관한 WO 98/58964 (Raju, S.) 및 WO 99/22764 (Raju, S.)를 참조한다.

- [0247] 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 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. 방법으로 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입하여 상기 영역에서 쇠간 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체성 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 보체-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 항종양 활성을 갖는 동종이량체성 항체는 또한 문헌 [Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이중이관능성 가교제를 사용하여 제조될 수 있다. 방법으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖고 그에 의해 증진된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가지도록 유전자조작될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)]을 참조한다.
- [0248] 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 (잔기의 Eu 넘버링). 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 상기 위치의 1개, 2개 또는 3개에 치환을 포함하거나 이로 이루어지는 인간 IgG1 Fc 영역이다. 이러한 치환은 C1q 결합 및/또는 CDC가 증가된 치환(들)과 임의로 조합된다.
- [0249] 변경된 C1q 결합 및/또는 보체 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 (잔기의 Eu 넘버링).
- [0250] 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. 본원에 사용된 "구조 수용체 결합 에피토프"라는 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.
- [0251] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에의 결합이 개선되고 증가된 반감기를 갖는 항체는 WO 00/42072 (Presta, L.) 및 US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역은 위치 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 또는 434 (잔기의 Eu 넘버링) 중 하나 이상에 치환을 가질 수 있다. FcRn 결합이 개선된 바람직한 Fc 영역-포함 항체 변이체는 그의 Fc 영역의 위치 307, 380 및 434 중 1, 2 또는 3개에 아미노산 치환을 포함한다.
- [0252] 3개 이상의 (바람직하게는 4개) 관능성 항원 결합 부위를 갖는 유전자조작된 항체가 또한 고려된다 (미국 특허 출원 제US 2002/0004587 A1호, 밀러(Miller) 등).
- [0253] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 상기 방법으로는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위-지정된) 돌연변이유발법, PCR 돌연변이유발법, 및 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이유발법에 의한 제조를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0254] (viii) 목적하는 특성을 갖는 항체의 스크리닝
- [0255] 항체를 생성하는 기술은 상기에 기재되었다. 목적에 따라 특정 생물학적 특징을 갖는 항체를 선별할 수 있다.
- [0256] HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체를 확인하기 위해, HER 수용체를 발현하는 세포에의 HER 리간드 결합을 차단하는 (예를 들어, 당해 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.

[0257] 예를 들어, HER2 항체에 의한 MCF7 유방 종양 세포주에의 HER 결합의 억제에 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 24-웰-플레이트 포맷으로 얼음 상에서 단층 MCF7 배양물을 사용하여 수행될 수 있다. HER2 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 그 후, <sup>125</sup>I-표지된 rHRG β<sub>1177-224</sub> (25 pm)을 첨가하고, 인큐베이션을 4 내지 16시간 동안 계속할 수 있다. 투여량 반응 곡선을 작성할 수 있고, IC<sub>50</sub> 값을 관심의 항체에 대해 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, MCF7 세포에의 HRG 결합 억제에 대한 IC<sub>50</sub>을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석에서 MCF7 세포에의 HRG 결합의 억제에 대한 IC<sub>50</sub>은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0258] 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 컨쥬레이션됨)을 사용하여 HER 리간드-의존성 티로신 인산화 활성에 대해 분석할 수 있다. 미국 특허 제5,766,863호에 기재된 키나제 수용체 활성화 분석은 또한 HER 수용체 활성화 및 항체에 의한 활성의 차단을 측정하는데 이용가능하다.

[0259] 일 실시양태에서, 본질적으로 WO 01/00245에 기재된 바와 같이 MCF7 세포 내의 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, MCF7 세포를 24-웰 플레이트에 플레이팅하고, HER2에 대한 모노클로날 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, rHRG β<sub>1177-244</sub>를 각각의 웰에 최종 농도 0.2 nM로 첨가하고, 인큐베이션을 8분 동안 계속할 수 있다. 배지를 각각의 웰로부터 흡인하고, SDS 샘플 완충액 (5% SDS, 25 mM DTT 및 25 mM 트리스(Tris)-HCl, pH 6.8) 100 μl의 첨가에 의해 반응을 중단시킬 수 있다. 각각의 샘플 (25 μl)을 4 내지 12% 구배 겔 (노벡스(Novex)) 상에서 전기영동한 후, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전기영동적으로 옮길 수 있다. 항포스포티로신 (1 μg/mL) 이뮤노블롯을 전개시키고, M<sub>r</sub> ~ 180,000에서 우세한 반응 밴드의 강도를 반사도 음영계측기에 의해 정량할 수 있다. 선별된 항체는 바람직하게는 상기 분석에서 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, 당해 항체에 대한 IC<sub>50</sub>을 계산할 수 있다. 일 실시양태에서, HER 수용체의 리간드 활성화를 차단하는 항체는 상기 분석에서 약 50 nM 이하, 보다 바람직하게는 10 nM 이하의, p180 티로신 인산화의 HRG 자극의 억제에 대한 IC<sub>50</sub>을 가질 것이다. 항체가 Fab 단편과 같은 항체 단편일 경우, 상기 분석에서 p180 티로신 인산화의 HRG 자극을 억제하기 위한 IC<sub>50</sub>은 예를 들어 약 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하일 수 있다.

[0260] 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 분석에 따르면, MDA-MB-175 세포를 HER2 모노클로날 항체 (10 μg/mL)로 4일 동안 처리하고, 크리스탈 바이올렛으로 염색할 수 있다. HER2 항체와 함께 인큐베이션하는 것은 모노클로날 항체 2C4에 의해 제시된 것과 유사한 상기 세포주에 대한 성장 억제 효과를 나타낼 수 있다. 추가의 실시양태에서, 외인성 HRG는 상기 억제를 상당히 반전시킬 것이다. 바람직하게는, 항체는 MDA-MB-175 세포의 세포 증식을 외인성 HRG의 존재 및 부재 둘다 하에서 모노클로날 항체 4D5보다 더 큰 정도로 (및 임의로 모노클로날 항체 7F3보다 큰 정도로)를 억제할 수 있다.

[0261] 일 실시양태에서, 당해 HER2 항체는 WO 01/00245에 기재된 바와 같은 공동-면역침전 실험에서 측정된 바와 같이 모노클로날 항체 4D5보다 실질적으로 더 효과적으로, 바람직하게는 모노클로날 항체 7F3보다 실질적으로 더 효과적으로 MCF7 및 SK-BR-3 세포 둘다에서 HER2와 HER3의 헤레골린 의존성 결합을 차단할 수 있다.

[0262] 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 μg/mL의 항체 농도에서 약 20 내지 100%, 바람직하게는 약 50 내지 100%로 억제할 수 있다. 이러한 항체를 확인하기 위해, 미국 특허 제5,677,171호에 기재된 SK-BR-3 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 따르면, SK-BR-3 세포를 10% 소 태아 혈청, 글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신이 보충된 F12 및 DMEM의 1:1 혼

합물에서 성장시킨다. SK-BR-3 세포를 35 mm 세포 배양 디쉬에서 20,000 세포 (2 ml/35 mm 디쉬)로 플레이팅한다. 디쉬당 HER2 항체 0.5 내지 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 첨가한다. 6일 후, 비처리된 세포에 비한 세포의 수를 전기 코울터(COULTER)(상표명) 세포 계수기를 사용하여 계수한다. SK-BR-3 세포의 성장을 약 20 내지 100% 또는 약 50 내지 100%로 억제하는 항체를 성장 억제성 항체로서 선별할 수 있다. 4D5 및 3E8과 같은 성장 억제성 항체에 대해 스크리닝하는 분석에 대해서는 미국 특허 제5,677,171호를 참조한다.

[0263] 아포토시스를 유도하는 항체를 선별하기 위해, BT474 세포를 사용한 아넥신 결합 분석이 이용가능하다. 선행 문단에서 논의된 바와 같이 BT474 세포를 배양하고, 디쉬에 씨딩한다. 그 후, 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독 또는 모노클로날 항체 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 함유하는 배지로 대체한다. 3일 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 떼어낸다. 그 후, 세포 사멸 분석에 대해 상기 논의된 바와 같이 세포를 원심분리하고,  $\text{Ca}^{2+}$  결합 완충액에 재현탁시키고, 튜브 내로 분취한다. 그 후, 튜브를 표지된 아넥신 (예를 들어, 아넥신 V-FTIC) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 넣는다. 샘플을 팩스칸(FACSCAN)(상표명) 유동 세포측정기 및 팩스컨버트(FACSCONVERT)(상표명) 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석할 수 있다. 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체를 아포토시스-유도 항체로서 선별한다. 아넥신 결합 분석 이외에, BT474 세포를 사용한 DNA 염색 분석이 이용가능하다. 상기 분석을 수행하기 위해, 선행의 2개 문단에서 기재된 바와 같이 관심의 항체로 처리된 BT474 세포를 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  회흐스트(HOECHST) 33342(상표명)와 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 에픽스 엘리트(EPICS ELITE)(상표명) 유동 세포측정기 (코울터 코포레이션(Coulter Corporation)) 상에서 모드피트(MODFIT) LT(상표명) 소프트웨어 (베리티 소프트웨어 하우스(Verity Software House))를 사용하여 분석한다. 상기 분석을 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 분석에 대해서는 WO 98/17797을 참조한다.

[0264] 당해 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 분석을 수행하여 항체가, 2C4 또는 페르투주마브와 같은 항체의 HER2에의 결합을 교차-차단하는지 여부를 평가할 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 에피토프 지도화를 당업계에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있고/거나, 항체-HER2 구조를 연구하여 (문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]) HER2의 도메인(들)이 항체에 의해 결합되는지를 관찰할 수 있다.

[0265] (ix) 페르투주마브 조성물

[0266] HER2 항체 조성물의 일 실시양태에서, 조성물은 주요종 페르투주마브 항체 및 그의 하나 이상의 변이체의 혼합물을 포함한다. 페르투주마브 주요종 항체의 본원의 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4의 가변 경쇄 및 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하고, 가장 바람직하게는 서열 13 및 17로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열 및 서열 14 및 18로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 (상기 서열의 탈아미드화 및/또는 산화된 변이체 포함)을 포함하는 것이다. 일 실시양태에서, 조성물은 주요종 페르투주마브 항체 및 아미노-말단 선도자 연장물을 포함하는 그의 아미노산 서열 변이체의 혼합물을 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체 변이체의 경쇄 (예를 들어, 항체 변이체의 1 또는 2개의 경쇄) 상에 있다. 주요종 HER2 항체 또는 항체 단편은 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')<sub>2</sub> 단편의 Fab)일 수 있지만, 바람직하게는 둘다 전장 항체이다. 본원에서 항체 변이체는 임의의 하나 이상의 그의 중쇄 또는 경쇄 상에 아미노-말단 선도자 연장물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 아미노-말단 선도자 연장물은 항체의 1 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 분석 (예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동), 질량 분광법 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 분석 기술에 의해 검출될 수 있다. 조성물 중의 항체 변이체의 양은 일반적으로 변이체를 검출하는데 사용되는 임의의 분석 (바람직하게는 N-말단 서열 분석)의 검출 한계를 구성하는 양 내지 주요종 항체의 양보다 적은 양의 범위이다. 일반적으로, 조성물 중의 항체 분자의 약 20% 이하 (예를 들어, 약 1% 내지 약 15%, 예를 들어 5% 내지 약 15%)는 아미노-말단 선도자 연장물을 포함한다. 이러한 퍼센트 양은 바람직하게는 정량적 N-말단 서열 분석 또는 양이온 교환 분석을 이용하여 (바람직하게는, 고-해상도, 약 양이온-교환 컬럼, 예를 들어 프로팍(PROPAC) WCX-10(상표명) 양이온 교환 컬럼을 이용하여) 측정된다. 아미노-말단 선도자 연장물 변이체 이외에, 그의 중쇄 하나 또는 둘다 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체, 탈아미드화된 항체 변이체 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 주요종 항체 및/또는 변이체

의 추가의 아미노산 서열 변경이 고려된다.

- [0267] 더욱이, 주요종 항체 또는 변이체는 글리코실화 변이체를 추가로 포함할 수 있으며, 비-제한적 예로는 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당류 구조를 포함하는 항체, 그의 경쇄에 부착된 탄수화물 잔기 (예를 들어, 항체의 1 또는 2개의 경쇄에 부착된, 예를 들어 하나 이상의 리신 잔기에 부착된 글루코스 또는 갈락토스와 같은 1 또는 2개의 탄수화물 잔기)를 포함하는 항체, 1 또는 2개의 비-글리코실화된 중쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 1 또는 2개의 중쇄에 부착된 시알리드화된 올리고당류를 포함하는 항체 등을 들 수 있다.
- [0268] 조성물은 유전학적으로 조작된 세포주, 예를 들어 HER2 항체를 발현하는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주로부터 회수될 수 있거나, 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [0269] (x) 이뮤노컨쥬게이트
- [0270] 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.
- [0271] 이러한 이뮤노컨쥬게이트의 생성에 유용한 화학요법제는 상기에 기재되었다. 항체, 및 칼리케아미신, 마이탄신 (미국 특허 제5,208,020호), 트리코텐 및 CC1065와 같은 1종 이상의 소분자 독소의 컨쥬게이트는 또한 본원에서 고려된다.
- [0272] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 마이탄신 분자 (예를 들어, 항체 분자당 약 1 내지 약 10개의 마이탄신 분자)에 컨쥬게이션된다. 마이탄신을 예를 들어 May-SS-Me로 전환시키고, 이를 May-SH3로 환원시키고, 변형된 항체와 반응시켜 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]) 마이탄신노이드-항체 이뮤노컨쥬게이트를 생성할 수 있다.
- [0273] 관심의 또다른 이뮤노컨쥬게이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 컨쥬게이션된 HER2 항체를 포함한다. 항생제의 칼리케아미신 측은 서브-피코몰 농도에서 이중-가닥 DNA 파쇄물을 생성할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체로는  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-아세틸- $\gamma_1^1$ , PSAG 및  $\Theta_1^1$  (문헌 [Hinman et al. *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993)] 및 [Lode et al. *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)])을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본원에 특별히 참고로 도입된 미국 특허 제5,714,586호; 제5,712,374호; 제5,264,586호; 및 제5,773,001호를 참조한다.
- [0274] 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 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사과오나리아 오피시날리스 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테신을 들 수 있다. 예를 들어 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다.
- [0275] 본 발명은 또한 항체와 핵분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제, 또는 데옥시리보뉴클레아제와 같은 DNA 엔도뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 이뮤노컨쥬게이트를 고려한다.
- [0276] 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.
- [0277] 항체와 세포독성제의 컨쥬게이트는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (글루타렐데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨릴렌 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오르-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 트리 아민펜타아세트산 (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 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)])를 사용할 수 있다.

[0278]     별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0279]     다른 이뮤노컨쥬게이트도 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.

[0280]     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 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 1997년 10월 23일자로 공개된 WO 97/38731에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증진된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 제 5,013,556호에 개시되어 있다.

[0281]     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 디술피드 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.

[0282]     III. 치료요법을 위한 환자의 선택

[0283]     본원에서 환자는 치료요법 전에 진단 검사에 임의로 적용된다. 예를 들어, 진단 검사는 HER (예를 들어, HER2 또는 EGFR) 발현 (과발현 포함), 증폭 및/또는 활성화 (인산화 또는 이량체화 포함)를 평가할 수 있다.

[0284]     일반적으로, 진단 검사가 수행될 경우, 샘플은 치료요법을 필요로 하는 환자로부터 수득될 수 있다. 대상체가 암을 가진 경우, 샘플은 일반적으로 종양 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, 종양 샘플은 난소암, 복막암, 난관암, 전이성 유방암 (MBC), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 전립선암 또는 직장결장암 종양 샘플로부터의 것이다.

[0285]     본원에서 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 치료요법을 위해 선택된 환자는 종양, 또는 HER (바람직하게는 HER2) 활성화를 나타내는 종양을 갖는다. 일 실시양태에서, 암 세포의 HER (또는 HER2) 활성화의 정도는 동일한 조직 유형의 비-암성 세포의 수용체 활성화의 수준을 상당히 초과한다. 이러한 초과된 활성화는 HER 수용체의 과발현 및/또는 암 세포 내의 HER 수용체를 활성화하는데 이용되는 HER 리간드의 정상적인 수준보다 높은 수준으로부터 기인할 수 있다. 이러한 초과된 활성화는 암 세포의 악성 상태를 유발하고/거나 그에 의해 유발될 수 있다. 일부 실시양태에서, HER 수용체의 증폭 및/또는 과발현이 일어나서 HER 수용체의 이러한 초과된 활성화를 초래하는지 여부를 측정하는 진단 또는 예후 분석에 암을 적용할 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 수용체의 초과된 활성화에 기여하는 HER 리간드의 증폭 및/또는 과발현이 암에서 일어나는지 여부를 측정하는 진단 또는 예후 분석에 암을 적용할 수 있다. 이러한 암의 하위집합에서, 수용체의 초과된 활성화는 자가분비성 자극 경로로부터 기인할 수 있다. HER 활성화를 측정하는 다양한 분석은 하기에 보다 상세히 기재될 것이다. HER 이량체화를 측정하는 바람직한 방법은 HER 이량체 또는 이중이량체의 검출, HER 또는 HER 인산화의 평가, 및 유전자 발현 프로파일링이다.

[0286]     (i) HER 이량체

[0287]     종양 샘플을 HER 또는 HER2 활성화를 지시하는 것으로서의 HER 이량체의 존재에 대해 평가할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 EGFR-HER2, HER2-HER3과 같은 HER2 이량체를 검출할 수 있다. 몇몇 바람직한 방법은 하기에 기재되어 있다. 상기 방법은 비공유 단백질-단백질 상호작용을 검출하거나, 다르게는 당해 단백질 사이의 근접성을 지시한다.

[0288]     면역침전법 또는 ELISA와 같은 면역침화도-기반 방법은 HER 이량체를 검출하는데 이용될 수 있다. 일 실시양태

에서, HER2 항체를 사용하여 HER2를 포함하는 복합체를 종양 세포로부터 면역침전시킨 후, 생성된 면역침전물을 이뮤노블롯팅에 의해 EGFR 또는 HER3에 대해 프로브한다. 또다른 실시양태에서, EGFR 또는 HER3 항체를 면역침전 단계를 위해 사용한 후, 면역침전물을 HER2 항체로 프로브할 수 있다. 추가의 실시양태에서, EGFR, HER3, EGFR-HER2 복합체 또는 HER2-HER3 복합체에 특이적인 HER 리간드를 사용하여 복합체를 침전시킨 후, 이를 HER2에 대해 프로브할 수 있다. 예를 들어, 리간드를 아비딘에 컨쥬게이션시키고, 복합체를 비오틴 컬럼 상에서 정제할 수 있다.

[0289] 다른 실시양태에서, ELISA 또는 항체 "샌드위치"-형 분석과 같이, HER2에 대한 항체를 고체 지지체 상에 고정화시키고, 종양 세포 또는 종양 세포 용해물과 접촉시키고, 세척한 후, 항체를 EGFR 또는 HER3에 노출시킨다. 직접적으로 또는 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된 이차 항체에 의해 검출될 수 있는 후자의 항체의 결합은 이차항체의 존재를 지시한다. 특정 실시양태에서, EGFR 또는 HER3 항체를 고정화시키고, HER2 항체를 검출 단계에 사용한다. 다른 실시양태에서, HER 리간드를 HER 항체 대신에 또는 그와 조합하여 사용할 수 있다.

[0290] 또한, 화학적 또는 UV 가교를 이용하여 살아있는 세포의 표면 상에 이량체를 공유 결합시킬 수 있다. 화학적 가교제의 예로는 디티오비스(숙신이미딜) 프로피오네이트 (DSP) 및 3,3'-디티오비스(술포숙신이미딜) 프로피오네이트 (DTSSP)를 들 수 있다. 일 실시양태에서, 화학적으로 가교된 종양 세포로부터의 세포 추출물을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, EGFR 및/또는 HER3에 대한 항체로 이뮤노블롯팅한다. 적절한 분자량의 슈퍼시프트 (supershifted) 밴드는 가장 가능성있게 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체를 지시하며, 이는 HER2가 EGFR 및 HER3에 대한 바람직한 이량체화 상대이기 때문이다. 상기 결과는 HER2 항체의 후속 면역블롯팅에 의해 확인될 수 있다.

[0291] 형광 공명 에너지 전달법 (FRET)은 또한 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체를 검출하는데 이용될 수 있다. FRET는 공여자 형광발색단으로부터 수용자 형광발색단으로의 에너지 전달을 기초로 하여 생체내 및 시험관내에서 단백질 형태 변화 및 단백질-단백질 상호작용을 검출한다 (문헌 [Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7:730-34 (2000)]). 에너지 전달은 공여자 형광발색단이 수용자 형광발색단에 충분히 근접할 때만 일어난다. 전형적인 FRET 실험에서, 2개의 단백질 또는 단일 단백질 상의 2개의 부위를 상이한 형광 프로브로 표지한다. 프로브의 하나인 공여자 프로브를 특정 파장의 입사광에 의해 보다 높은 에너지 상태에 노출시킨다. 그러면, 공여자 프로브는 그의 에너지를 제2 프로브인 수용자 프로브에 투과하여 공여자의 형광 강도의 감소 및 수여자의 형광 방출의 증가를 초래한다. 에너지 전달 정도를 측정하기 위해, 공여자 및 수여자 프로브로 표지된 샘플에서의 공여자의 강도를 공여자 프로브만으로 표지된 샘플에서의 강도와 비교한다. 임의로, 수여자 강도를 공여자/수여자 및 수여자만의 샘플에서 비교한다. 적합한 프로브는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 플로오로세인 및 로다민과 같은 막 투과성 염료, 시아닌 염료와 같은 유기 염료, 및 란탄 원자를 들 수 있다. 에너지 전달의 검출 및 측정 방법 및 기기는 당업계에 공지되어 있다.

[0292] 개별 세포에서 단백질-단백질 상호작용을 검출하고 측정하는데 적합한 FRET-기반 기술은 또한 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 공여자 광표백 형광 공명 에너지 전달 (pbFRET) 현미경법 및 형광 수명 영상 현미경법 (FLIM)을 사용하여 세포 표면 수용체의 이량체화를 검출할 수 있다 (문헌 [Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995)]). 일 실시양태에서, 문헌 [Nagy et al., *Cytometry*, 32:120-131 (1998)]에 기재된 바와 같이, pbFRET를 "현탁액 중에서" 또는 "동일계내에서" 세포 상에 사용하여 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체의 형성을 검출하고 측정한다. 상기 기술은 에너지 전달에 기인한 공여자의 형광 수명의 감소를 측정한다. 특정 실시양태에서, [Nagy et al.]의 상기 문헌 및 문헌 [Brockhoff et al., *Cytometry*, 44:338-48 (2001)]에 기재된 바와 같이 유동 세포측정 퍼르스터(Foerster)-형 FRET 기술 (FCET)을 이용하여 EGFR-HER2 및 HER2-HER3 이량체화를 검사할 수 있다.

[0293] FRET는 바람직하게는 표준 면역조직화학 표지 기술과 함께 사용된다 (문헌 [Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001)]). 예를 들어, 적합한 형광 염료에 컨쥬게이션된 항체를 2개의 상이한 단백질을 표지하기 위한 프로브로서 사용할 수 있다. 단백질이 서로의 근접성 내에 있을 경우, 형광 염료는 FRET에 대한 공여자 및 수여자로서 작용한다. 에너지 전달은 표준 수단에 의해 검출된다. 에너지 전달은 유동 세포측정 수단에 의해, 또는 전하-결합 소자 (CCD) 카메라에 결합된 공초점 현미경법 또는 광시야 형광 현미경법과 같은 디지털 현미경 시스템에 의해 검출될 수 있다.

[0294] 본 발명의 일 실시양태에서, HER2 항체 및 EGFR 또는 HER3 중 하나를 예를 들어 [Nagy et al.]의 상기 문헌에 기재된 바와 같이 2개의 상이한 형광발색단으로 직접적으로 표지한다. 종양 세포 또는 종양 세포 용해물을 EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체의 존재하에서 FRET에 대한 공여자 또는 수용자로서 작용하는 상이하게 표지된

항체와 접촉시킨다. 별법으로, HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나에 대해 비표지된 항체를 공여자 및 수용자로서 기능하는 상이하게 표지된 제2 항체와 함께 사용한다. 예를 들어 [Brockhoff et al.]의 상기 문헌을 참조한다. 에너지 전달을 검출하고, 표지가 가까이 근접한 것으로 발견될 경우 이량체의 존재를 측정한다.

[0295] 다른 실시양태에서, HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나에 특이적인 HER 수용체 리간드를 형광 표지하고, FRET 연구에 사용한다.

[0296] 본 발명의 다른 실시양태에서, 종양 세포의 표면 상의 이량체의 존재는 표준 직접 또는 간접 면역형광 기술 및 공초점 레이저 주사 현미경법을 이용하여 HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나의 공동-위치화에 의해 입증된다. 별법으로, 문헌 [Zuck et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11122-27 (1999)]에 기재된 바와 같이 레이저 주사 영상화 (LSI)를 이용하여 항체 결합, 및 HER2 및 EGFR 또는 HER3 중 하나의 공동-위치화를 마이크로웰 플레이트와 같은 고-처리량 포맷으로 검출한다.

[0297] 추가의 실시양태에서, EGFR-HER2 및/또는 HER2-HER3 이량체의 존재는 이량체 성분의 근접성에 의존하는 효소 활성을 확인함으로써 측정된다. HER2 항체는 하나의 효소와 컨주게이션되며, EGFR 또는 HER3 항체는 제2 효소와 컨주게이션된다. 제1 효소에 대한 제1 기질을 첨가하고, 반응은 제2 효소에 대한 제2 기질을 생성한다. 이는 또다른 분자와의 반응을 초래하여 염료와 같은 검출가능한 화합물을 생성한다. 또다른 화합물의 존재는 제2 기질을 파괴하여, 제1 및 제2 효소 및 따라서 2개의 항체가 가까이 근접하지 않는다면 제2 효소와의 반응이 방지되도록 한다. 특정 실시양태에서, 종양 세포 또는 세포 용해물을 글루코스 옥시다제와 컨주게이션된 HER2 항체 및 양고추냉이 퍼옥시다제와 컨주게이션된 HER3 또는 HER1 항체와 접촉시킨다. 글루코스를 DAB 및 카탈라제와 같은 염료 전구체와 함께 반응물에 첨가한다. 이량체의 존재를 DAB에 대한 염색시 색의 전개에 의해 측정한다.

[0298] 또한, 이량체는 예를 들어 본원에 그 전문이 특별히 참고로 도입된 2001년 12월 6일자로 공개된 미국 특허 출원 제2001/0049105호에 기재된 바와 같이, eTag(상표명) 분석 시스템 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재하는 아클라라 바이오 사이언시즈(Aclara Bio Sciences))에 기재한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. eTag(상표명), 또는 "전기영동 태그"는 형광기와 같은 검출가능한 리포터 부분을 포함한다. 이는 또한 고유한 전기영동 이동성을 갖는 부분으로 본질적으로 이루어진 "이동성 변형체"를 포함할 수 있다. 상기 부분은 모세관 전기 영동법 (CE)과 같은 한정된 전기영동 조건하에서 복합 혼합물로부터 eTag(상표명)의 분리 및 검출을 허용한다. 리포터 부분 및 임의로 이동성 변형체를 함유하는 eTag(상표명)의 일부는 절단가능한 연결기에 의해 제1 표적 결합 부분에 연결되어 제1 결합 화합물을 생성한다. 제1 표적 결합 부분은 핵산 또는 단백질과 같은 특정 제1 표적을 특이적으로 인식한다. 제1 표적 결합 부분은 임의의 방식으로 제한되지 않으며, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 제1 표적 결합 부분은 항체 또는 항체 단편이다. 별법으로, 제1 표적 결합 부분은 HER 수용체 리간드 또는 그의 항체-경쟁 단편일 수 있다.

[0299] 연결기는 바람직하게는 효소 기질과 같은 절단가능한 부분, 또는 한정된 조건하에서 절단될 수 있는 임의의 화학 결합을 포함한다. 제1 표적 결합 부분이 그의 표적에 결합할 경우, 절단제를 도입하고/거나 활성화시키고, 연결기를 절단하여, 리포터 부분 및 이동성 변형체를 함유하는 eTag(상표명)의 일부를 방출한다. 따라서, "유리" eTag(상표명)의 존재는 표적 결합 부분의 그의 표적에의 결합을 지시한다.

[0300] 바람직하게는, 제2 결합 화합물은 절단제 및 제2 표적을 특이적으로 인식하는 제2 표적 결합 부분을 포함한다. 제2 표적 결합 부분은 또한 임의의 방식으로 제한되지 않으며, 예를 들어 항체 또는 항체 단편 또는 HER 수용체 리간드 또는 결합 경쟁 리간드 단편일 수 있다. 절단제는 제1 결합 화합물 및 제2 결합 화합물이 가까이 근접할 경우, 제1 결합 화합물 내의 연결기를 절단하기만 하는 것이다.

[0301] 본 발명의 실시양태에서, 제1 결합 화합물은 HER2에 대한 항체가 제1 표적 결합 부분으로서 기능하는 eTag(상표명)을 포함한다. 제2 결합 화합물은 eTag(상표명)의 연결기를 절단할 수 있는 절단제에 결합된 EGFR 또는 HER3에 대한 항체를 포함한다. 바람직하게는, 절단제는 연결기를 절단할 수 있기 위해 활성화되어야 한다. 종양 세포 또는 종양 세포 용해물을 HER2에 결합하는 eTag(상표명), 및 세포 표면 상에서 EGFR 또는 HER3에 결합하는 변형된 EGFR 또는 HER3 항체와 접촉시킨다. 결합되지 않은 결합 화합물은 바람직하게는 제거되며, 절단제는 필요할 경우 활성화된다. EGFR-HER2 또는 HER2-HER3 이량체가 존재할 경우, 절단제는 연결기를 절단하고, 연결기에 대한 절단제의 근접성에 기인하여 eTag(상표명)을 방출할 것이다. 그 후, 유리 eTag(상표명)은 모세관 전기 영동법과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0302] 일 실시양태에서, 절단제는 연결기에 작용하는 활성화가능한 화학 종이다. 예를 들어, 절단제는 샘플을 광에 노출시킴으로써 활성화될 수 있다.

- [0303] 또다른 실시양태에서, eTag(상표명)은 제1 표적 결합 부분으로서 EGFR 또는 HER3에 대한 항체를 사용하여 구축되며, 제2 결합 화합물은 HER2에 대한 항체로부터 구축된다.
- [0304] 또다른 실시양태에서, HER 이량체는 이량체 내의 HER 수용체에 대한 그의 결합에 비교한 바와 같은 이량체에 특이적으로 또는 선호적으로 결합하는 항체 또는 다른 시약을 사용하여 검출된다.
- [0305] (ii) HER2 인산화
- [0306] HER 수용체의 인산화는 HER2 수용체와 같은 하나 이상의 HER 수용체의 면역침전, 및 면역침전된 수용체(들) 내의 인산화된 티로신 잔기(들)의 분석에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 양성은 면역침전된 HER 수용체(들) 내의 인산화된 티로신 잔기(들)를 검출하는 항-포스포티로신 항체를 사용하여, 겔 상의 포스포-HER2 밴드의 존재에 의해 결정된다. 항-포스포티로신 항체는 판 베라(Pan Vera) (미국 위스콘신주 메디슨에 소재), 보조로서, 인비트로젠, 케미콘 인터내셔널 인크.(Invitrogen, Chemicon International Inc.) (미국 캘리포니아주 테메큘라에 소재) 또는 업스테이트 바이오테크놀로지(Upstate Biotechnology) (미국 뉴욕주 레이크 플라시드에 소재)로부터 시판된다. 음성은 밴드의 부재에 의해 결정된다. 웨스턴 블롯 분석, 면역조직화학, ELISA 등을 비롯한 인산화된 단백질을 검출하는 다양한 분석 형태가 고려된다.
- [0307] 일 실시양태에서, HER2 (HER2) 수용체의 인산화는 인-특이적 HER2 항체 (클론 PN2A; 문헌 [Thor et al., *J. Clin. Oncol.*, 18(18):3230-3239 (2000)])를 사용한 면역조직화학법에 의해 평가된다.
- [0308] HER 수용체(들)의 인산화를 검출하는 다른 방법으로는 KIRA ELISA (미국 특허 제5,766,863호; 제5,891,650호; 제5,914,237호; 제6,025,145호; 및 제 6,287,784호), 질량 분광법 (인산화 및 비-인산화 HER2의 크기를 비교), 및 HER (예를 들어, HER2) 항체 및 인-특이적 또는 포스포-티로신 특이적 항체 (예를 들어, 아클라라 바이오사이언시즈 (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰에 소재)로부터 시판되는 eTag(상표명) 분석 키트를 사용) 둘다를 사용한 eTag 근접성 분석을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. eTag 분석의 상세사항은 하기에 기재된다.
- [0309] 또한, 신호 전달 단백질의 세포 샘플에서 인산화 상태를 검출하기 위해 세포 어레이에서 인-특이적 항체를 사용할 수 있다 (US 2003/0190689).
- [0310] 하기 실시예 2에는 인-HER2 ELISA에 의해 HER2 인산화를 측정하는 바람직한 방법이 기재되어 있다.
- [0311] (iii) 유전자 발현 프로파일링
- [0312] 일 실시양태에서, 유전자 발현 프로파일링은 HER 인산화를 직접적으로 측정하는 대리체로서 기능할 수 있다. 이는 샘플이 HER 인산화가 신뢰가능하게 정량화되기 어려울 수 있는 고정된 샘플 (예를 들어, 파라핀-포매된, 포르말린 고정된 종양 샘플)인 경우에 특히 유용하다. 예를 들어, 샘플 내의 2개 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현이 평가되며, 여기서 2개 이상의 HER 수용체 및 하나 이상의 HER 리간드의 발현은 샘플에서의 양성 HER 활성화를 지시한다. 별법으로 또는 부가적으로, 샘플에서의 베타셀룰린 및/또는 암피레굴린의 발현이 측정될 수 있으며, 여기서 베타셀룰린 및/또는 암피레굴린 발현은 샘플에서의 양성 HER 활성화를 지시한다.
- [0313] HER2 활성화를 평가하기 위한 유전자 발현 프로파일링의 바람직한 실시양태에 따르면, 환자로부터의 샘플을 2개 이상의 HER 수용체 (바람직하게는, EGFR, HER2 및 HER3으로부터 선택됨) 및 하나 이상의 HER 리간드 (바람직하게는, 베타셀룰린, 암피레굴린, 에피레굴린 및 TGF- $\alpha$ 로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 베타셀룰린 또는 암피레굴린)의 발현에 대해 시험한다. 예를 들어, 2개 이상의 HER 수용체는 EGFR 및 HER2, 또는 HER2 및 HER3 일 수 있으며, 하나 이상의 HER 리간드는 베타셀룰린 또는 암피레굴린일 수 있다. 바람직하게는, HER2 및 EGFR 또는 HER3, 뿐만 아니라 베타셀룰린 또는 암피레굴린의 발현이 측정된다. 샘플은 베타셀룰린 또는 암피레굴린 단독의 발현에 대해 시험되거나, 또는 2개 이상의 HER 수용체의 발현에 대한 시험과 조합될 수 있다. 확인된 유전자(들)의 양성 발현은 환자가 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제를 사용한 치료요법에 대한 후보자임을 지시한다. 더욱이, 유전자(들)의 양성 발현은 환자가 이러한 양성 발현을 갖지 않는 환자보다 HER 이량체화 억제제를 사용한 치료요법에 선호적으로 반응하는 경향이 있음을 지시한다.
- [0314] mRNA 또는 단백질의 발현을 측정하는 다양한 방법으로는 유전자 발현 프로파일링, 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 비롯한 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석 (SAGE), 매스어레이 (MassARRAY), 대량 평행 서명 시퀀싱 (MPSS)에 의한 유전자 발현 분석, 프로테오믹스, 면역조직화학 (IHC) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, mRNA가 정량화된다. 이러한 mRNA 분석은 바람직하게는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)의 기술을 이용하여, 또는 마이크로어레이 분석에 의해 수행된다. PCR이 이용될

경우, PCR의 바람직한 형태는 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)이다. 일 실시양태에서, 하나 이상의 상기 설명된 유전자의 발현은, 이것이 예를 들어 동일한 종양-유형의 다른 샘플에 비해 중위값 이상일 경우 양성 발현인 것으로 간주된다. 발현 수준의 중위값은 유전자 발현의 측정과 본질적으로 동시에 측정될 수 있거나, 미리 측정될 수 있다.

- [0315] mRNA 단리, 정제, 프라이머 연장 및 증폭을 포함하는, RNA 공급원으로서 고정된, 파라핀-포매된 조직을 이용하여 유전자 발현을 프로파일링하는 대표적인 프로토콜의 단계는 다양한 공개된 저널 논문에 주어져 있다 (예를 들어, 문헌 [Godfrey et al. *J. Molec. Diagnostics* 2:84-91 (2000)]; [Specht et al., *Am. J. Pathol.* 158:419-29 (2001)]). 간략히, 대표적인 과정은 파라핀-포매된 종양 조직 샘플의 약 10  $\mu$ g 두께 섹션의 절단으로 시작된다. 그 후, RNA를 추출하고, 단백질 및 DNA를 제거한다. RNA 농도의 분석 후, 필요에 따라 RNA 복구 및/또는 증폭 단계가 포함될 수 있으며, RNA를 유전자 특이적 프로모터를 사용하여 역전사한 후, PCR한다. 최종적으로, 데이터를 분석하여, 조사된 종양 샘플에서 확인된 특징적인 유전자 발현 패턴을 기초로 하여 환자에 대해 이용가능한 최상의 치료 선택안(들)을 확인한다.
- [0316] 본원에서 실시예 3에는 유전자 발현 프로파일링에 의해 HER2 활성화를 측정하는 바람직한 방법이 기재되어 있다.
- [0317] (iv) HER 발현 및 증폭
- [0318] 암에서 HER 발현 또는 증폭을 측정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석이 이용가능하다. 일 실시양태에서, HER 과발현은 IHC에 의해, 예를 들어 허셉테스트(HERCEPTEST)(등록상표) (다코(Dako))를 이용하여 분석될 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀-포매된 조직 섹션을 IHC 분석하고, HER2 단백질 염색 강도 범주를 하기와 같이 부여한다.
- [0319] 스코어 0 염색이 관찰되지 않거나, 막 염색이 종양 세포의 10% 미만으로 관찰된다.
- [0320] 스코어 1+ 희미한/빈약하게 인식가능한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과로 검출된다. 세포는 그의 막의 일부에서만 염색된다.
- [0321] 스코어 2+ 약한 내지 중간의 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.
- [0322] 스코어 3+ 중간 내지 강한 완전한 막 염색이 종양 세포의 10% 초과에서 관찰된다.
- [0323] HER2 과발현 평가에 대한 0 또는 1+ 스코어를 갖는 종양은 HER2를 과발현하지 않는 것으로서 특성화될 수 있는 반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 갖는 종양은 HER2를 과발현하는 것으로서 특성화될 수 있다.
- [0324] HER2를 과발현하는 종양은 세포당 발현된 HER2 분자의 카피의 수에 상응하는 면역조직화학 스코어에 의해 등급화될 수 있으며, 생화학적으로 측정될 수 있다.
- [0325] 0 = 0 내지 10,000 카피/세포,
- [0326] 1+ = 약 200,000 카피/세포 이상,
- [0327] 2+ = 약 500,000 카피/세포 이상,
- [0328] 3+ = 약 2,000,000 카피/세포 이상.
- [0329] 티로신 키나제의 리간드-비의존성 활성화를 초래하는 3+ 수준의 HER2의 과발현 (문헌 [Hudziak et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 (1987)])은 유방암의 대략 30%에서 일어나며, 상기 환자에서, 재발 없는 생존 및 총 생존은 감소한다 (문헌 [Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989)]; [Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)]).
- [0330] 별법으로 또는 부가적으로, 인폼(INFORM)(상표명) (미국 아리조나주에 소재하는 벤타나(Ventana)에서 판매) 또는 파트비전(PATHVISION)(상표명) (미국 일리노이주에 소재하는 바이시스(Vysis))과 같은 FISH 분석을 포르말린-고정된 파라핀-포매된 종양 조직 상에서 수행하여 종양 내의 HER2 과발현의 정도 (있다면)를 측정할 수 있다.
- [0331] 일 실시양태에서, 암은 EGFR을 발현하는 (및 과발현할 수 있는) 것일 것이며, 이러한 발현은 상기 설명된 바와 같이 HER2 발현을 평가하는 방법으로 평가될 수 있다.
- [0332] HER 수용체 또는 HER 리간드 과발현 또는 증폭은 또한 예를 들어 검출될 분자에 결합하는 분자 (예를 들어, 항체)를 투여하고, 검출가능한 표지 (예를 들어, 방사성 동위원소)로 태깅하고, 환자를 표지의 위치화에 대해 외



부적으로 스캐닝함으로써 생체내 진단 분석을 이용하여 평가될 수 있다.

[0333] IV. 제약 제제

[0334] 본 발명에 따라 사용되는 HER 이량체화 억제제의 치료 제제는 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정 화제와 목적하는 정도의 순도를 갖는 항체를 혼합함으로써 (문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]), 일반적으로 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장용으로 제조될 수 있다. 또한, 항체 결정체가 고려된다 (미국 특허 출원 2002/0136719 참조). 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정 화제는 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 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터-이온; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 들 수 있다. 동결건조된 항체 제제는 본원에 특별히 참고로 도입된 WO 97/04801에 기재되어 있다.

[0335] 치료 용도에 바람직한 페르투주마브 제제는 20 mM 히스티딘 아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0) 중 30 mg/mL 페르투주마브를 포함한다. 대안적인 페르투주마브 제제는 25 mg/mL 페르투주마브, 10 mM 히스티딘-HCl 완충액, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (pH 6.0)을 포함한다.

[0336] 본원의 제제는 또한 치료될 특정 증상에 필요한 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 보충적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. HER 이량체화 억제제와 조합될 수 있는 다양한 약물은 하기 방법 섹션에 기재되어 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도되는 목적에 유효한 양으로 조합물 내에 존재한다.

[0337] 활성 성분은 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 예를 들어 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.

[0338] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 매트릭스가 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태인 항체를 함유하는 고흥 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)(상표명) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 들 수 있다.

[0339] 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성된다.

[0340] V. HER 이량체화 억제제를 사용한 치료

[0341] 본원에서 본 발명은 HER 이량체화 억제제를 환자의 TTP 또는 생존을 연장시키는 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이 HER 활성화를 나타내는 암 환자에서의 TTP 또는 생존의 연장 방법을 제공한다. 바람직하게는, HER 이량체화 억제제는 HER2 이량체화 억제제이고/거나 HER 이중이량체화를 억제한다.

[0342] 일 실시양태에서, 환자의 암은 HER 인산화를 비롯한 HER2 활성화를 나타낸다. 바람직하게는, HER2 인산화는 인-ELISA 분석을 이용하여 평가된다. 별법으로, HER2 활성화는 유전자 발현 프로파일링에 의해 또는 HER 이량체 또는 이중이량체를 검출함으로써 평가될 수 있다.

[0343] HER 이량체화 억제제로 치료될 수 있는 다양한 암의 예는 상기 정의 섹션에 열거되어 있다. 바람직한 암 증상으로는 난소암; 복막암; 난관암; 전이성 유방암 (MBC)을 비롯한 유방암; 비-소세포 폐암 (NSCLC)을 비롯한

폐암; 전립선암; 및 직장결장암을 들 수 있다. 일 실시양태에서, 치료되는 암은 진행성, 난치성, 재발성, 화학요법-내성 및/또는 백금-내성 암이다.

- [0344] HER 이량체화 억제제를 사용한 치료요법은 TTP 및/또는 생존을 연장시킨다. 일 실시양태에서, HER 이량체화 억제제를 사용한 치료요법은, 승인된 항종양제 또는 치료될 암에 대한 치료의 표준물을 투여함으로써 달성되는 TTP 또는 생존보다 약 20% 이상 더 많이 TTP 또는 생존을 연장시킨다.
- [0345] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 페르투주마브를 난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존을 연장시키는 양으로 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이 HER2 활성화화를 나타내는 난소암, 복막암 또는 난관암을 갖는 환자에서의 질환 진행까지의 시간 (TTP) 또는 생존의 연장 방법을 제공한다. 환자는 진행성, 난치성, 재발성, 화학요법-내성 및/또는 백금-내성 난소암, 복막암 또는 난관암을 가질 수 있다. 페르투주마브를 환자에게 투여하는 것은 예를 들어 토포테칸 또는 리포솜성 독소루비신을 이러한 환자에게 투여함으로써 달성되는 TTP 또는 생존보다 약 20% 이상 더 많이 TTP 또는 생존을 연장시킬 수 있다.
- [0346] HER 이량체화 억제제는 예를 들어 볼루스로서의 정맥내 투여, 또는 시간의 기간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 윤향막내, 수막강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해서와 같은 공지된 방법에 따라 인간 환자에게 투여된다.
- [0347] 암의 예방 또는 치료를 위해, HER 이량체화 억제제의 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 암의 종류, 암의 중증도 및 과정, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료요법, 환자의 임상적 병력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 결정에 의존할 것이다.
- [0348] 일 실시양태에서, HER 이량체화 억제제의 고정 투여량이 투여된다. 고정 투여량은 적합하게는 한 시점에서 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여될 수 있다. 고정 투여량이 투여될 경우, 바람직하게는 이는 HER 이량체화 억제제 약 20 mg 내지 약 2000 mg 범위이다. 예를 들어, 고정 투여량은 페르투주마브와 같은 HER 이량체화 억제제 대략 420 mg, 대략 525 mg, 대략 840 mg, 또는 대략 1050 mg일 수 있다.
- [0349] 일련의 투여량이 투여될 경우, 이는 예를 들어 대략 매주, 대략 매 2주, 대략 매 3주, 또는 대략 매 4주마다 투여될 수 있지만, 바람직하게는 대략 매 3주마다 투여된다. 고정 투여량은 예를 들어 질환 진행, 부작용, 또는 의사에 의해 측정된 바와 같은 다른 시간까지 계속 투여될 수 있다. 예를 들어, 약 2, 3, 또는 4회부터 약 17회 이상까지의 고정 투여량이 투여될 수 있다.
- [0350] 일 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 로딩 투여량(들)이 투여된 후, 항체의 하나 이상의 유지 투여량(들)이 투여된다. 또다른 실시양태에서, 다수의 동일한 투여량이 환자에게 투여된다.
- [0351] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에 따르면, 대략 840 mg의 HER 이량체화 억제제 (예를 들어, 페르투주마브)의 고정 투여량 (로딩 투여량)이 투여된 후, 대략 420 mg의 항체의 하나 이상의 투여량이 투여된다. 유지 투여량은 바람직하게는 약 매 3주마다, 2회 이상에서 17회 이상까지의 투여량의 총 투여량에 대해 투여된다.
- [0352] 본 발명의 또다른 바람직한 실시양태에 따르면, 대략 1050 mg의 HER 이량체화 억제제 (예를 들어, 페르투주마브)의 하나 이상의 고정 투여량(들)이 예를 들어 매 3주마다 투여된다. 상기 실시양태에 따르면, 1회, 2회 이상의 고정 투여량이 예를 들어 1년 (17 사이클) 이하까지, 필요에 따라서는 보다 길게 투여된다.
- [0353] 또다른 실시양태에서, 대략 1050 mg의 HER 이량체화 억제제 (예를 들어, 페르투주마브)의 하나 이상의 고정 투여량이 로딩 투여량으로서 투여된 후, 대략 525 mg의 하나 이상의 유지 투여량(들)이 투여된다. 상기 실시양태에 따르면, 약 1회, 2회 이상의 유지 투여량이 매 3주마다 환자에게 투여된다.
- [0354] HER 이량체화 억제제가 단일 항종양제로서 투여될 경우, 환자는 임의로 HER 이량체화 억제제, 및 하나 이상의 화학요법제(들)의 조합물로 치료된다. 바람직하게는, 하나 이상의 화학요법제는 겐시타빈과 같은 항대사물 화학요법제이다. 조합된 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 이용한 공동투여 또는 동시 투여, 및 어떤 순서로든 연속 투여를 포함하며, 바람직하게는 활성제 둘다 (또는 모두)가 동시에 그의 생물학적 활성을 발휘하는 시기가 있다. 따라서, 항대사물 화학요법제는 HER 이량체화 억제제의 투여 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 상기 실시양태에서, 항대사물 화학요법제의 하나 이상의 투여 및 HER 이량체화 억제제의 하나 이상의 투여 사이의 시간조절은 단일 제제 또는 별개의 제제로 환자에게 동시에 투여된다. 화학요법제 (예를 들어, 겐시타빈과 같은 항대사물 화학요법제) 및 HER 이량체화 억제제 (예를 들어, 트라스투주마브)의 조합물을 사용한 치료는 환자에게 상승적인, 또는 상가적인 것보다 큰 치료 이익을 초래할 수 있다.

- [0355] 투여될 경우, 항대사물 화학요법제는 통상적으로 그에 대해 공지된 투여량으로 투여되거나, 또는 약물의 조합된 작용 또는 항대사물 화학요법제의 투여에 기여가능한 부정적인 부작용에 기인하여 저하된다. 이러한 화학요법제에 대한 제제 및 투여량 스케줄은 제조업자의 지시에 따라 또는 당업자에 의해 실험적으로 측정된 바와 같이 사용될 수 있다. 항대사물 화학요법제가 겐시타빈일 경우, 바람직하게는 이는 약  $600 \text{ mg/m}^2$  내지  $1250 \text{ mg/m}^2$  (예를 들어, 대략  $1000 \text{ mg/m}^2$ )의 투여량으로, 예를 들어 2-주 사이클의 제1일 및 제8일에 투여된다.
- [0356] HER 이량체화 억제제 및 항대사물 화학요법제 이외에, 다른 치료 처방이 그와 조합될 수 있다. 예를 들어, 제2 (제3, 제4 등) 화학요법제(들)이 투여될 수 있으며, 제2 화학요법제는 또다른 상이한 항대사물 화학요법제, 또는 항대사물이 아닌 화학요법제이다. 예를 들어, 제2 화학요법제는 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 카페시타빈, 또는 백금-기재 화학요법제 (예를 들어, 카르보플라틴, 시스플라틴 또는 옥살리플라틴), 안트라사이클린 (예를 들어, 리포솜성 독소루비신을 비롯한 독소루비신), 토포테칸, 페메트렉세이트, 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 비노렐빈) 및 TLK 286일 수 있다. 상이한 화학요법제의 "칵테일"이 투여될 수 있다.
- [0357] HER 이량체화 억제제와 조합될 수 있는 다른 치료제로는 제2의 상이한 HER 이량체화 억제제 (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 종양 관련된 항원에 대한 항체, 예를 들어 EGFR, HER3, HER4; 항-호르몬성 화합물, 예를 들어, 항-에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜, 또는 아로마타제 억제제; 심장보호제 (치료요법과 관련된 임의의 심근 기능부전을 예방하거나 감소시킴); 사이토킨; EGFR-표적화된 약물 (예를 들어, 타르세바(TARCEVA)(등록상표), 이레사(IRESSA)(등록상표) 또는 세특시마브); 항혈관신생제 (특히 제넨테크에서 상표명 아바스틴(AVASTIN)(상표명)으로 판매하는 베바시주마브); 티로신 키나제 억제제; COX 억제제 (예를 들어, COX-1 또는 COX-2 억제제); 비-스테로이드성 항염증 약물, 셀레콕시브 (셀레브렉스(CELEBREX)(등록상표)); 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (예를 들어, 존슨 앤드 존슨(Johnson and Johnson)에서 시판되는 티피파르니브/자르네스트라(ZARNESTRA)(등록상표) R115777 또는 슈링-플루(Schering-Plough)에서 시판되는 로나파르니브 SCH66336); 종양태아성 단백질 CA125에 결합하는 항체, 예를 들어 오레고모마브 (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, 세특시마브, ABX-EGF, EMD7200, 게퍼티니브, 에블로티니브, CP724714, GW572016, IMC-11F8, TAK165, CI1033 등); Raf 및/또는 ras 억제제 (예를 들어, WO 2003/86467 참조); 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL)(등록상표)); 토포이소메라제 I 억제제, 예를 들어 토포테칸; 탁산; HER2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 라파티니브/GW572016; TLK286 (텔시타(TELCYTA)(등록상표)); 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; 설사를 치료 또는 예방하는 의약; 체온-감소 의약, 예를 들어 아세트아미노펜, 디펜히드라민 또는 메페리딘; 조혈 성장 인자 등 중 임의의 1종 이상을 들 수 있다.
- [0358] 임의의 상기 공동투여되는 작용제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 것이며, 작용제 및 HER 이량체화 억제제의 조합된 작용 (상승작용)에 기인하여 보다 낮아질 수 있다.
- [0359] 상기 치료 처방 이외에, 환자에게 암 세포의 외과적 제거 및/또는 방사선 요법을 적용할 수 있다.
- [0360] 억제제가 항체일 경우, 바람직하게는, 투여되는 항체는 네이키드 항체이다. 그러나, 투여되는 억제제는 세포독성제와 컨쥬게이션될 수 있다. 바람직하게는, 결합된 컨쥬게이션된 억제제 및/또는 항원은 세포에 의해 내재화되어 이것이 결합하는 암 세포를 사멸시키는 컨쥬게이트의 치료 효능을 증가시킨다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포 내의 핵산을 표적화하거나 간섭한다. 이러한 세포독성제의 예로는 마이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 들 수 있다.
- [0361] 본 출원은 유전자 요법에 의한 HER 이량체화 억제제의 투여를 고려한다. 예를 들어, 유전자 요법을 이용하여 세포내 항체를 생성하는 것에 관한 1996년 3월 14일에 공개된 WO 96/07321을 참조한다.
- [0362] 핵산 (백터에 임의로 함유됨)을 환자의 세포 내로 전달하는, 생체내 및 생체외의 2가지 주요한 접근법이 있다. 생체내 전달을 위해, 핵산을 통상적으로 항체가 요구되는 부위에서 환자에게 직접적으로 주사한다. 생체외 치료를 위해, 환자의 세포를 제거하고, 핵산을 상기 단리된 세포 내로 도입하고, 변형된 세포를 직접적으로 투여하거나, 또는 예를 들어 환자에게 이식된 다공성 막 내로 캡슐화시킨다 (예를 들어, 미국 특허 제4,892,538호 및 제5,283,187호 참조). 핵산을 생육가능한 세포 내로 도입하는데 이용가능한 다양한 기술이 있다. 기술은 핵산이 배양된 세포 내로, 의도되는 숙주의 세포에서 시험관내 또는 생체내에서 전달되는지 여부에 따라 다양하

다. 핵산을 포유동물 세포 내로 시험관내에서 전달하는데 적합한 기술로는 리포솜의 사용, 전기천공, 미세주사, 세포 융합, DEAE-덱스트란, 인산칼슘 침전법 등을 들 수 있다. 유전자의 생체의 전달에 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

[0363] 현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술로는 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 제I형 단순 포진 바이러스 또는 아데노-관련된 바이러스)를 사용한 형질감염, 및 지질-기재 시스템 (유전자의 지질-매개된 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Choi임)을 들 수 있다. 일부 상황에서, 핵산 공급원에 표적 세포를 표적화하는 작용제, 예를 들어 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 제공하는 것이 요망된다. 리포솜이 사용되는 경우, 표적화 및/또는 흡수를 용이하게 하기 위해, 세포내이입과 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정 세포 유형에 대해 친화성인 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환으로 내재화를 겪는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 편재화를 표적화하고 세포내 반감기를 증가시키는 단백질을 이용할 수 있다. 수용체-매개된 세포내이입의 기술은 예를 들어 문헌 [Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)]; 및 [Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 현재 공지된 유전자 마킹 및 유전자 요법의 검토를 위해서는, 문헌 [Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992)]을 참조한다. 또한, WO 93/25673 및 그에 인용된 참고문헌을 참조한다.

[0364] VI. 물질의 기탁

[0365] 하기 하이브리도마 세포주를 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 불바드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)에 기탁하였다.

[0366]	항체 지칭	ATCC 번호	기탁일
[0367]	7C2	ATCC HB-12215	1996년 10월 17일
[0368]	7F3	ATCC HB-12216	1996년 10월 17일
[0369]	4D5	ATCC CRL 10463	1990년 5월 24일
[0370]	2C4	ATCC HB-12697	1999년 4월 8일

[0371] 본 발명의 추가의 상세사항은 하기 비-제한적 실시예에 의해 설명된다. 본 명세서의 모든 인용문에 대한 개시는 특별히 본원에 참고로 도입된다.

### 실시예

[0372] 실시예 1

[0373] 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암에서의 페르투주마브의 임상적 활성 및 HER2 활성화 상태의 역할

[0374] 본 실시예는 난소암 환자의 단일 팔, 개방 표지, 다중심 II상 임상 연구에 관한 것이다. 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암을 갖는 환자를 페르투주마브, 인간화 HER2 항체로 치료하였다. 페르투주마브는 EGFR, HER3 및 HER4와 HER2의 이량체화를 억제하고 MAP 및 P13 키나제를 통한 신호전달을 억제하는 HER 이량체화 억제제 (HD 1)로 지칭되는 표적화제의 신규한 부류를 나타낸다.

[0375] 재발된 난소암을 갖는 65명의 환자는 61명이 "저 투여량" 단일 작용제 페르투주마브를 사용한 요법을 받은 것으로 등재되었으며, 페르투주마브를 840 mg 그 후 매 3주마다 420 mg의 로딩으로 정맥내로 (IV) 투여하였다.

[0376] 환자의 제2 코호트를 단일 작용제로서 투여되는 "고 투여량" 페르투주마브; 매 3주마다 1050 mg로 치료하였다. 상기 코호트에서, 64명의 대상체가 등재되었으며, 62명의 대상체가 치료되었다.

[0377] 종양 평가치는 2, 4, 6, 8, 12 및 16 사이클 후에 획득되었다.

[0378] RECIST에 의한 반응 속도 (RR)는 일차 종말점이었다. 신선한 종양 생검은 하기 실시예 2에 기재된 바와 같은 pHER2 효소-결합 면역흡착 분석을 이용하여 HER2 인산화 (pHER2) 상태를 분석하기 위해 필수적이었다. 코호트 1 대상체에 대한 pHER2를 평가하였다. 안전성 및 용인성을 또한 평가하였다.

[0379] 이차 종말점은 TTP, 반응의 지속기간, 생존의 지속기간, 약물동력학 (PK) 및 FOSI (코호트 2)였다.

[0380] 결과

- [0381] 환자의 기준선 인구통계는 도 9에 제공된다. 연령 중위값은 57세 (35 내지 83 범위)였으며, ECOG PS 중위값은 2였다. 선행 화학요법 처방 수의 중위값은 5였다.
- [0382] 도 10 내지 14는 치료된 환자에서의 임의의 부작용을 나타낸다. 페르투주마브는 잘 용인되었다. 환자의 61%가 설사 (등급 1 내지 3)를 겪었다. 환자의 5%는 박출 계수가 50% 미만으로 강하되었다.
- [0383] 효능 결과는 도 15에 요약되어 있다. 환자의 4%는 부분적 반응 (PR)을 가졌다. 환자의 39%는 안정한 질환 (SD)을 가졌다. 도 16에 나타난 바와 같이, 420 mg 페르투주마브로 치료된 환자에 대한 TTP 중위값은 7주였으며, 1050 mg 페르투주마브로 치료된 환자는 6.6주였다. 도 17은 저 투여량 또는 고 투여량 페르투주마브로 치료된 환자에 대한 전체 생존을 제공한다. 생존 중위값은 40주였다. CA-125 반응은 도 18에 제공된다. 페르투주마브는 감소하는 CA-125 수준에서 효능이 있었다. 이러한 감소는 난소암에서 치료 효능의 지표이다.
- [0384] 420 mg의 페르투주마브로 치료된 코호트 1의 환자의 HER2 활성화 상태를 평가하였다. 결과는 각각 도 19 내지 23에 나타나 있다. 난소암 대상체의 대략 30%는 pHER2 양성 (종양의 30% 초과, 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행된 ELISA)이었다. 효능 및 pHER2 데이터에 대해 평가가능한 대상체 중 26%는 pHER2 양성이었다. 도 19를 참조한다.
- [0385] pHER2- 환자에서의 6주에 비해, pHER2+ 환자에 대한 TTP 중위값은 21주였으며, 알려지지 않은 pHER2 상태를 갖는 환자에서는 9주였다 (도 20 및 22 참조).
- [0386] 코호트 1의 61명의 환자 중 14명은 페르투주마브 활성화의 증거를 나타내었다. 단지 부분적 반응 (PR)을 갖는 환자만이 인-HER2 양성이었다. 도 21을 참조한다.
- [0387] 또한, 환자의 전체 생존을 평가하였다. 도 23에 나타난 바와 같이, 페르투주마브로 치료된 pHER2 양성 환자의 전체 생존은 토포테칸 (생존 중위값 43주) 또는 리포솜성 독소루비신 (36주)으로 달성된 생존에 비해 우수한 것으로 나타났다.
- [0388] 결론
- [0389] 단일 작용제로서, 페르투주마브는 잘 용인된다. 페르투주마브 독성 및 효능은 투여량-관련된 것으로 보이지 않는다. 페르투주마브는 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암에서 활성을 갖는다. 양성 pHER2 상태를 갖는 대상체는 음성 pHER2 상태를 갖는 대상체에 비해 증진된 TTP 및 생존 효능을 나타내었다. TTP 또는 생존에 의해 측정된 바와 같은, HER2 활성화를 나타내는 환자에서의 페르투주마브의 효능은 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암을 갖는 환자를 치료하는데 현재 사용되는 작용제인 토포테칸 또는 리포솜성 독소루비신을 이용하여 달성된 것보다 우수한 것으로 나타났다.
- [0390] 실시예 2
- [0391] HER2 활성화를 측정하기 위한 인-HER2 ELISA
- [0392] 상기 실시예 1은 진행성, 난치성 또는 재발성 난소암을 갖는 대상체에서 페르투주마브의 효능을 평가하는 임상 시험을 기재한다. 본 실시예는 실시예 1에서 치료된 환자에서 HER2 활성화를 측정하는데 사용되는 분석의 현상을 기재한다.
- [0393] 인-HER2 ELISA를 인간 난소 종양 조직 용해물에서 HER2-관련된 티로신 인산화 (HER2/pTyr)의 농도를 측정하기 위해 현상하였다. 분석은 제한된 샘플 부피 때문에 코스타(COSTAR)(상표명) 96-웰, 반-면적, 미세역가판을 사용한다. 외피 항체는 친화도 정제된 염소 항-HER2 ECD이며, 이차 항체는 포스포티로신에 특이적인 비오틴화된 뮤린 모노클로날 (클론 4G10)이다. 참조 표준물은 132 U/mL의 분석 범위를 갖는 SK-BR-3 세포 용해물이다. 1 단위는 총 HER2 ELISA (총 HER2 ELISA)에 의해 측정된 바와 같은 277 pg 총 HER2를 함유하는 SK-BR-3 세포 용해물에서 측정된 인산화된 티로신의 양과 동일하다. ELISA는 검출을 위해 암텍스(AMDEX)(상표명) 스트렙타비딘-HRP 및 기질로서 TMB를 이용한다.
- [0394] 재료
- [0395] 1. 표준 물질, SK-BR-3 세포 용해물 1,056 U/mL HER2/pTyr
- [0396] 2. 대조군 공급원, SK-BR-3 세포 용해물 1,056 U/mL
- [0397] 3. 외피 항체, 염소 항-HER2 ECD 9.6 mg/mL

- [0398] 4. 이차 항체, 비오틴화된 무린 항-포스포티로신, 클론 4G10, 971  $\mu\text{g/mL}$  (업스테이트 바이오테크(Upstate Biotech) Cat #16-103)
- [0399] 5. HRP에 컨주게이션된 암텍스(상표명) 스트렙타비딘 (SA-HRP) (아머삼 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences) 카탈로그 번호 RPN4401)
- [0400] 6. 기질, 테트라메틸 벤지딘 (TMB) 퍼옥시다제 기질 (커크가드 앤드 페리 랩스(Kirkegaard & Perry Labs) [KPL] 카탈로그 번호 50-76-01)
- [0401] 7. 외피 완충액, 0.05 M 탄산나트륨 완충액, pH 9.6
- [0402] 8. 분석 희석액, PBS/0.5% BSA/0.05% 폴리소르베이트 20/0.05% 프로클린(PROCLIN) 300(상표명), pH 7.4
- [0403] 9. 용해 완충액: 염기 용해 완충액 (50 mM 트리스-HCl/150 mM NaCl/5 mM EDTA/1% 트리톤(TRITON) X-100(상표명))/1:10 프로테아제 억제제 콕테일/1:100 포스파타제 억제제 콕테일 I/1:100 포스파타제 억제제 콕테일 II/50 mM 플루오르화나트륨/2 mM 나트륨 오르토-바나데이트, pH 8.1
- [0404] 10. 샘플, 표준 및 대조군 희석액: 용해 완충액
- [0405] 11. MDA-468 (ATCC# HTB-132). HER2 발현 수준: 없음. 조직: 인간 유선, 유방, 선암종
- [0406] 12. MCF-7 (ATCC# HTB-22). HER2 발현 수준: 0 (HER2의 정상 발현 수준). 조직: 인간 유선; 유방; 표피; 전이 부위: 흉막 삼출 선암종
- [0407] 13. SK-BR-3 (ATCC# HTB-30, 버지니아주 마나사스 소재). HER2 발현 수준: 3 (고 수준 HER2 과발현). 조직: 인간 유선; 유방; 전이 부위: 흉막 삼출 선암종
- [0408] 14. BT-474 (ATCC# HTB-20, 버지니아주 마나사스 소재). HER2 발현 수준: 3 (고 수준 HER2 과발현). 조직: 인간 유선; 유방; 관; 관 암종
- [0409] 15. BT-474 종양 용해물. 마우스를 BT-474로 접종하였다. 2주 후, 종양을 수거하였다. 수거 종양을 균질화하여 종양 용해물을 제조하였다.
- [0410] 물질의 제조
- [0411] 표준 물질/원액: 인 HER2 ELISA 표준 원액은 순수한 표준 물질이다. 80% 내지 90% 융합성인 SK-BR-3 (SKBR3) 세포를 함유하는 3가지 245 x 245 mm 세포 배양물 트레이로부터 용해물을 수집함으로써 표준 물질을 제조하였다. 세포 용해물을 원심분리에 의해 세척하고, 상청액을 수집하였다. 상청액을 표준 물질로서 사용하였다.
- [0412] 표준 물질은 분석 보고 범위에서의 최저 보정치가 1 U/mL이 되도록 1,056 U/mL의 농도로 할당되었다. 1 단위는 총 HER2 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 277 pg 총 HER2를 함유하는 SK-BR-3 세포 용해물에서 측정된 인산화된 티로신의 양으로서 정의된다.
- [0413] 세포 용해물 대조군: 세포 용해물 대조군을 표준 물질로부터 제조하였다. 표준 물질을 용해 완충액에 희석하여 저, 중간 및 고 범위의 분석 표준 커브를 나타내는 HER2/pTyr 수준을 획득하였다.
- [0414] 조직 용해물 대조군: 조직 용해물 대조군을 BT474 종양 용해물로부터 제조하였다. BT474 종양 용해물을 용해 완충액에 희석하여 고 범위의 분석 표준 커브를 나타내는 HER2/pTyr 수준을 획득하였다.
- [0415] 외피 공급원: 염소 항-HER2 ECD 원액 I을 공급원 물질 (9.6 mg/mL)을 PBS에 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 희석함으로써 제조하였다.
- [0416] 비오틴화된 컨주게이트: 비오틴화된 무린 항-포스포티로신 항체 (1  $\mu\text{g/mL}$ )를 업스테이트 바이오테크로부터 구입하였다. 항체는 KLH에 커플링된 포스포티라민에 대해 발생된 비오틴화된 단백질 A-정제된 모노클로날 IgG2b-카파이다. 비오틴화된 모노클로날 항포스포티로신 항체 (클론 4G10, Cat #05-321)는 포스포티로신에 대해 특이적이며, 포스포세린 또는 포스포트레오닌과 교차-반응하지 않는다.
- [0417] 염소 항-HER2 ECD의 특이성: HER2 수용체 활성화는 다른 족 구성원과의 수용체 이량체화가 일어날 경우 개시된다. 신호전달이 엄밀히 HER2 동종이량체화 때문이 아니라면, EGFR, HER3 및/또는 HER4는 활성 종양 내에서 발현되어야 한다. 각각의 상기 수용체는 난소 조직 용해물에 존재할 수 있으며, 상기 수용체가 외피 항체에 교차

-반응할 경우 HER2-결합된 티로신 인산화 (HER2/pTyr)를 정확히 측정하는 것을 방해할 수 있다.

[0418] 염소 항-HER2 ECD 항체의 특이성을 표면 플라즈몬 공명 분석 (비아코어(BIACORE) 3000(등록상표), 비아코어(등록상표), 스위스 뉴캐틀에 소재하는 인터내셔널 에이비(International AB))에 의해 측정하였다. 염소 항-HER2 ECD 항체를 아민 커플링 화학을 이용하여 CM5 센서 칩 상에 고정화시켰다. 센서 칩을 1 M 에탄올아민-HCl (pH 8.5)로 차단하고, 10 mM HCl로 컨디셔닝하였다. 특이성을 가용성 재조합 EGFR (sEGFR) (뉴저지주 플랜더스에 소재하는 리서치 다이아그노스틱스, 인크.(Research Diagnostics, Inc.)) 및 재조합 인간 HER2 ECD/인간 IgG1 Fc 융합 단백질을 주사함으로써, 고정된 염소 항-HER2 항체 상에서 측정하였다. 융합 단백질은 펩티드 링커 (미네소타주 미네아폴리스에 소재하는 알앤디 시스템스(R&D Systems))를 통해 인간 IgG1의 카르복시-말단 6X 히스티딘-태깅된 Fc 영역에 융합된 HER2, HER3 또는 HER4의 ECD로 이루어졌다.

[0419] sEGFR, HER3-Fc 및 HER4-Fc에 대한 참조를 뺀 상대 반응은 각각 -41 RU, 0.3 RU 및 2.5 RU였다. sEGFR에 대해 취득된 음성 상대 반응은 이동상 (HBS-EP) 및 샘플 부형제 사이의 굴절 지수 변화에 기인하였다. HER2-Fc에 대한 상대 반응은 374 RU였다.

[0420] 방법

[0421] 인 HER2 ELISA는 0.5 M 탄산나트륨 완충액 (pH 9.6)에서 4 µg/mL의 염소 항-HER2 ECD로 코팅하고, 2°C 내지 8°C에서 18 내지 72시간 동안 인큐베이션한 코스타(상표명) 반-면적 (A/2) 플레이트를 이용하였다. 웰을 대략 150 µl/웰 분석 희석액으로 1 내지 2시간 동안 차단한 후, 표준물, 대조군 및 샘플 50 µl/웰을 첨가하였다. 난소 종양 조직 용해물에 대한 최소 희석은 용해 완충액 중 1/40이다. 표준물, 대조군 및 샘플을 주위 온도에서 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS/0.05 트윈 20(상표명)으로 세척하고, 비오틴화된 항-포스포티로신 250 ng/mL을 첨가하였다. 2시간 후, 웰을 세척하고, 암텍스(상표명) 스트렙타비딘-HRP를 첨가하였다. 암텍스(상표명) 스트렙타비딘-HRP (SA-HRP)는 스트렙타비딘에 연결된 다중 효소 표지와 중합체성 키뉴게이트이다. 15분 후, 웰을 세척하고, 테트라메틸-벤지딘 기질 (TMB)을 첨가하고, 15분 동안 현상한 후, 1 M 인산으로 정지시켰다. 흡광도를 450 nm 필터 및 650 nm 참조 필터를 갖는 스펙트라마क्स(SPECTRAMAX)(상표명) 플레이트 판독기 (캘리포니아주 서니베일에 소재하는 몰리클라 디바이시스 코포레이션(Molecular Devices Corp.))를 이용하여 측정하였다. 샘플 농도를 7-점 표준 곡선의 비선형, 4-변수 로그 피트에 대해 계산하였다 (문헌 [Marquardt, D. J. Soc. Indust. Appl. Math. 431-441 (1963)]). ELISA의 분석 범위는 1 내지 32 U/mL이다. 단위는 임의 단위이며, 여기서 1 U는 277 pg 총 HER2를 함유하는 SK-BR-3 세포 용해물에서 측정된 인산화된 티로신의 양과 동일하다. 분석의 하한은 1 U/mL로 설정되었으며, 검출의 하한에 의해 정의되었다.

[0422] 인 HER2 ELISA의 정확성을 표준 물질 농도를 재할당 한 후 재평가하였다. 분석내 및 분석간 정확성을 3가지 상이한 수준의 SKBR3 세포 용해물 중 HER2/pTyr의 편차 계수 (CV)를 측정함으로써 평가하였다. SKBR3 세포 용해물을 희석하여 분석 표준 곡선의 저, 중간 및 고 범위를 나타내는 HER2 수준을 취득하였다. 표준 물질 농도를 재할당한 후에, 고 대조군은 분석 표준 커브의 고 범위 내에 있지 않았다. 따라서, BT474 조직 용해물 대조군을 고 범위 내에 해당하도록 희석하였다. 분석 대조군으로서 기능하는 용해물을 5일에 걸쳐 이중으로 분석하였다. 대조군 데이터를 아노바(ANOVA)(상표명)에 대해 스타트뷰(STATVIEW)로 도입하여 분석내 및 분석간 표준 편차를 결정하였다.

[0423] CV는 하기와 같이 계산하였다.

[0424]  $100 \times (\text{표준 편차}) / (\text{평균 대조군 값})$

[0425] 분석내 정확성 CV는 BT474, 고, 중간 및 저 대조군에 대해 각각 4%, 4%, 3% 및 11%였다. 분석간 정확성 CV는 BT474, 고, 중간 및 저 대조군에 대해 각각 5%, 6%, 5% 및 14%였다.

[0426] 인 HER2 ELISA의 현상 동안, SKBR3 세포 용해물을 순수한 MDA468 세포 용해물에 22.9, 6.39 및 1.71 U/mL로 희석하였다. 샘플을 SKBR3 HER2/pTyr을 함유하는 용해 완충액에서 희석하여 전체 연속 희석을 통해 매트릭스 효과가 희석되면서 HER2/pTyr의 일정한 수준을 유지하게 하였다. 연속 희석을 인 HER2 ELISA에서 분석하고, MDA468 없는 SKBR3 HER2/pTyr과 비교하여 회수율을 결정하였다.

[0427] 퍼센트 회수율은 하기와 같이 계산하였다.

[0428] 
$$100X \frac{\text{MDA468에 희석된SKBR3HER2/pTyr}}{\text{용해완충액에 희석된SKBR3HER2/pTyr}}$$

[0429] MDA468 세포 용해물의 존재하에서 3가지 수준에서의 SKBR3 HER2/pTyr 회수율에 대한 결과는 매트릭스가 1.71 U/mL 수준에서 순수한 및 1/16 사이의 샘플 희석액에서 회수율을 유의하게 증진시키며, HER2/pTyr 회수율은 120% 내지 127%임을 나타내었다. 매트릭스 간섭은 임의의 다른 수준에서는 관찰되지 않았다. 용해 완충액 중 1/16의 샘플 희석으로 출발한 각각의 수준에서 80% 내지 120%의 회수율이 입증되었다.

[0430] 난소 및 BT474 종양 용해물을 용해 완충액에 2배로 연속 희석하고, 인 HER2 ELISA에서 분석하였다. 현상 동안 분석된 BT474 샘플에 대한 출발 희석은 1/20이었다. 난소 용해물을 출발 물질 농도를 재할당한 후 분석하였다. 난소 용해물에 대한 출발 희석은 예상되는 HER2/pTyr 농도에 따라 다양하였다.

[0431] 샘플 희석 선형성의 지표인 연속 희석에 대한 퍼센트 차이는 하기와 같이 계산하였다.

$$100X \frac{(\text{최대보정결과값} - \text{최소보정결과값})}{(\text{최대및최소보정결과값의평균})}$$

[0432] 난소 조직 용해물 HF8198에 대한 퍼센트 차이를 1/80, 1/160 또는 1/320의 희석으로 출발하여 계산하였다. 난소 조직 용해물 HF7945에 대한 퍼센트 차이를 1/320, 1/640 또는 1/1280의 희석으로 출발하여 계산하였다. 잔류하는 난소 조직 용해물에 대한 퍼센트 차이를 1/20 또는 1/40의 희석으로 출발하여 계산하여, 최소 희석을 결정하고, 희석의 선형성을 평가하였다.

[0434] BT474 연속 희석에 대한 차이는 -9% 내지 12% 범위였다. 1/10 희석으로 출발한 HF7930 및 HF7934 희석에 대한 차이는 각각 43% 및 38%였다. HF8197에 대한 차이는 1/320, 1/160 및 1/1280으로 각각 출발한 연속 희석에 대해 2%, 8% 및 5%였다. HF8198에 대한 차이는 1/80, 1/160 및 1/320으로 각각 출발한 연속 희석에 대해 72%, 34% 및 3%였다.

[0435] 18개의 상이한 난소 조직 용해물을 표준 샘플 농도가 변화된 후 인 HER2 ELISA에서 분석하였다. 샘플을 1/20 내지 1/160으로 출발하여 2배 희석하였다. 하나의 샘플은 1/20 희석에서 LTR이었고, 10개의 샘플은 1/40 희석에서 LTR이었다. 7개의 샘플은 1/20 및 1/40 희석에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 가졌으며, 하나의 샘플은 1/80 희석 이하에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 가졌다. 1/20 및 1/40 희석에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 가졌던 샘플에 대한 차이는 16% 내지 34%였으며, 7개의 샘플의 차이는 20% 미만이었다. 1/80 희석 이하에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 가졌던 하나의 샘플인 샘플 HF7931은 1/20 및 1/40 각각에서 출발한 연속 희석에 대해 16% 및 4%의 차이를 가졌다.

[0436] 페르투주마브 및 트라스투주마브를 인 HER2 ELISA에서 분석하여 상기 치료제들이 간섭하는지 여부를 측정하였다. 항체를 98.48 U/mL HER2/pTyr을 함유하는 헤레굴린 자극된 MCF7 (MCF7+) 세포 용해물에서 1.5 내지 10,000 ng/mL 범위의 농도로 희석하였다.

[0437] 현상 동안, 세포 및 조직 용해물을 4회의 사이클의 동결 및 해동에 적용하여 온도 순환의 효과를 측정하였다. 동결된 SKBR3 세포 용해물 및 BT474 종양 용해물을 주위 온도에서 해동하였다. 각각의 용해물로부터 10 µL을 취하고, 분석 희석액에 희석하였다. 잔류하는 용해물을 드라이 아이스 및 메탄올의 혼합물에서 플래쉬 동결시키고, 다시 해동시켰다. 시험 샘플을 다시 취하고, 분석 희석액 (제1 동결/해동 사이클, 1x)에 희석하였다. 플래쉬 동결, 해동 및 샘플 수집 절차를 2회 반복하여 제2 및 제3 동결/해동 사이클 (각각 2x 및 3x)로부터 샘플을 수득하였다.

[0438] 희석된 샘플을 인 HER2 ELISA에서 분석하여 "신선한" 샘플에 대한 HER2/pTyr 회수율을 측정하였다. "신선한" 샘플은 초기 해동으로부터 취해진 샘플이다.

[0439] 1x, 2x 및 3x 샘플에 대한 SKBR3 HER2/pTyr의 회수율은 각각 104%, 109% 및 113%였다. 샘플 314A에서의 BT474 HER2/pTyr의 회수율은 1x, 2x 및 3x 샘플에 대해 각각 99%, 103% 및 99%였다. 샘플 365에서의 BT474 HER2/pTyr의 회수율은 1x, 2x 및 3x 샘플에 대해 각각 111%, 96% 및 99%였다.

[0440] 정량화의 하한 (LLOQ)은 저 대조군의 평균 농도 1.35 U/mL로 설정되었다. 저 대조군이 각각의 실험 내에 포함되기 때문에, 이는 샘플이 정확하게 측정될 수 있는 하한의 신뢰가능한 지표이다. 따라서, 인 HER2 ELISA에서 최소 정량가능한 농도는 최소 샘플 희석 (1/40)과 LLOQ의 곱, 또는 54 U/mL이다.

[0441] 결론

[0442] 민감하며 정확한 ELISA를 현상하여 종양 조직 용해물에서 HER2-결합된 티로신 인산화 (HER2/pTyr)를



측정하였다. 인 HER2 ELISA는 54 U/mL의 최소 정량가능한 농도에서 1.35 U/mL로 하향된 민감성을 입증하였으며, 여기서 1 U는 277 pg 총 HER2를 함유하는 SK-BR-3 세포 용해물에서 측정된 인산화된 티로신의 양과 동일하다. 인-HER2 ELISA는 4가지 수준에서 우수한 정확성을 입증하였다. 분석내 정확성 CV는 BT474 조직 용해물 대조군, 및 고, 중간 및 저 SKBR3 세포 용해물 대조군에 대해 각각 4%, 3%, 3% 및 11%였다. 분석간 정확성 CV는 BT474 조직 용해물 대조군, 및 고, 중간 및 저 SKBR3 세포 용해물 대조군에 대해 각각 5%, 6%, 5% 및 14%였다.

[0443] 인 HER2 ELISA는 MDA468 세포 용해물의 존재하에서 HER2/pTyr의 우수한 회수율을 입증하였다. 1/16 희석으로 출발한 것은 회수율이 88% 내지 120% 범위였다. ELISA는 EGFR, HER3-IgG Fc 및 HER4-IgG Fc가 분석 외피와 교차-반응하지 않는 것으로써 우수한 회수율을 입증하였다.

[0444] 인간 난소 종양 및 BT474 마우스 이종이식 종양 조직 용해물을 이용하여 희석의 선형성 및 최소 샘플 희석을 분석하였다. BT474 종양 용해물에 대해 희석 보정값의 차이는 -9% 내지 12% 범위였다. 1/20 및 1/40 희석에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 갖는 7개의 난소 용해물 중에서, 단지 3개만이 20% 미만의 차이를 가진 반면, 7개 중 6개는 23% 이하의 차이를 가졌다. 1/80 희석 이하에서 HER2/pTyr의 측정가능한 수준을 가진 하나의 샘플인 샘플 HF7931은 1/40에서 출발한 연속 희석에 대해 4%의 차이를 가졌다. 모든 상기 샘플이 1/20의 최소 희석에서 20% 이하의 범주를 충족시킨 것은 아니며, 따라서, 최소 샘플 희석은 1/40일 것이다.

[0445] BT474 조직 용해물 및 인간 난소 조직 용해물 샘플 HF8197 및 HF8198은 HER2/pTyr의 높은 측정가능한 수준을 가졌으며, 분석의 정량가능한 범위 내에 해당되기 위해 1/80 내지 1/320의 희석을 요구하였다. 인간 난소 종양 조직 하위집합 내에서 측정된 HER2/pTyr 농도가 최고인 BT474 샘플 및 샘플 HF8197은 전체 분석 범위에 걸쳐 선형으로 희석되었다. 반대로, 희석 HER2/pTyr 농도에 대해 보정된 바와 같은 비선형적으로 희석된 샘플 HF8198은 분석 전반에 걸쳐 증가되며 1/320 희석에서 평탄화되는 것으로 나타난다.

[0446] 3회의 동결/해동 사이클에 적용된 SKBR3 세포 용해물은 매우 우수한 회수율을 입증하였다. HER2/pTyr 회수율은 동일한 신선하게 해동된 샘플에 대해 104% 내지 113% 범위였다.

[0447] 또한, 2가지 BT474 종양 용해물을 3회의 동결/해동 사이클에 적용하였다. BT474 인 HER2 회수율은 99% 내지 103% 범위였다. BT474로부터의 HER2/pTyr 회수율은 96% 내지 111% 범위였다. 따라서, 온도 순환은 인 HER2 활성에 영향을 주는 것으로 보이지 않는다.

[0448] 인 HER2 ELISA는 페르투주마브 또는 트라스투주마브로부터 임의의 간섭을 입증하지 않았다.

[0449] 실시예 3

[0450] HER 활성화를 측정하기 위한 유전자 발현 프로파일링

[0451] 본 실시예는 HER2 인산화를 직접적으로 측정하는 별법으로서 유전자 발현 프로파일을 측정함으로써 HER2 활성화를 평가할 수 있는 방법을 나타낸다. 상기 프로파일링은 신선한, 동결된 또는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 난소 종양 표본 상에서 수행될 수 있지만, 바람직하게는 후자이다.

[0452] 페르투주마브로 처리된 난소암 표본을 제조업자의 지시에 따라 수행된 아피메트릭스(AFFYMETRIX)(등록상표) 마이크로어레이 분석을 이용하여 유전자 발현에 대해 프로파일링하였다. 마이크로어레이 발현 데이터를 분석하여 HER2 인산화 상태와 관련된 유전자 패턴을 확인하였다. 현저하게, 종양이 상대적으로 높은 수준의 EGFR, HER2, HER3을 갖는 패턴이 나타났으며, HER 리간드 베타셀룰린은 또한 HER2 인산화에 대해 양성이었다. 상관관계는 6개의 HER2 인산화 양성 경우의 6개에서 양성이었으며, HER2 인산화 음성 경우는 알고리즘에 대한 기초로서 마이크로어레이 발현 데이터를 이용하여 양성으로 예측된 것이 없었다.

[0453] 제2 분석에서, HER2 인산화 상태의 예측을 단일 유전자, 즉 베타셀룰린만을 이용하여 달성하였다. 마이크로어레이 발현 데이터를 다시 사용했을 때, 모든 6개의 HER2 인산화 양성 종양은 중위값 초과와 베타셀룰린 발현을 가졌다.

[0454] 유전자 발현을 정량화하는 제2 방법인 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 이용하여 마이크로어레이 데이터를 확인하고 비교하였다. qRT-PCR은 임상적 설정에서 이용가능한 전형적인 환자 샘플에서의 유전자 발현을 측정하는 바람직한 방법일 것이다. 상기 방법에 대한 진단 기술 플랫폼은 이미 수립되었다. 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 기재된 바와 같이 수행하였다. RNA를 캘리포니아주 발렌시아에 소재하는 퀴아젠(Qiagen)으로부터 시판되는 시약을 사용하여, 동결된 난소 종양으로부터 추출하였다. 태크맨(TAQMAN)(상표명) qRT-PCR 분석에 대한 프라이머

및 프로브를 설계하여 약 100 염기 이하의 앰플리콘 길이를 얻었다. 시험 유전자의 발현 수준이 참고 유전자의 것으로 정규화된 태크맨(상표명) 기기 (어플라이드 바이오시스템스(Applied BioSystems))를 이용하여, 전사체를 qRT-PCR에 의해 정량화하였다. "가사(house keeping)" 유전자 GUS를 그의 낮은 변이성 및 높은 발현 때문에 대조군 유전자로서 선택하였다.

[0455] 상기 설명된 실험에 기초하여, ELISA에 의한 공지된 HER2 인산화 상태를 갖는 종양의 유전자 발현 프로파일링을 기초로 한 알고리즘을 개발하였다. 종양은 베타셀룰린 또는 암피레굴린을 갖는 HER 인산화, 및 중위값 이상에서 HER2 발현 및/또는 중위값 이상에서 EGFR 및/또는 HER3 발현과 관련된 유전자 발현 프로파일에 대해 양성인 것으로 간주된다. 별법으로, 베타셀룰린 또는 암피레굴린 단독의 발현을 qRT-PCR에 의해 측정하여 HER2의 인산화가 예측된 종양을 확인할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 HER2 단백질 구조, 및 그의 세포외 도메인의 도메인 I 내지 IV (각각 서열 19 내지 22)에 대한 아미노산 서열의 개략도를 제공한다.

[0028] 도 2A 및 2B는 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 가변 경쇄 (V<sub>L</sub>) (도 2A) 및 가변 중쇄 (V<sub>H</sub>) (도 2B) 도메인 (각각 서열 1 및 2); 변이체 574/페르투주마브의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인 (각각 서열 3 및 4), 및 인간 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 컨센서스 프레임워크(consensus framework) (hum κ1, 경쇄 카파 하위군 I; humIII, 중쇄 하위군 III) (각각 서열 5 및 6)의 정렬을 나타낸다. 별표는 페르투주마브 및 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 가변 도메인 사이, 또는 페르투주마브 및 인간 프레임워크의 가변 도메인 사이의 차이를 확인한다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 괄호 안에 있다.

[0029] 도 3A 및 3B는 페르투주마브 경쇄 (도 3A; 서열 13) 및 중쇄 (도 3B; 서열 14)의 아미노산 서열을 나타낸다. CDR은 굵은 글씨로 나타내어진다. 경쇄 및 중쇄의 계산된 분자량은 23,526.22 Da 및 49,216.56 Da (감소된 형태의 시스테인)이다. 탄수화물 부분은 중쇄의 Asn 299에 부착된다.

[0030] 도 4는 HER2의 이중이량체 결합 부위에서의 2C4의 결합, 및 그로 인한 활성화된 EGFR 또는 HER3와의 이중이량체화의 방지를 개략적으로 나타낸다.

[0031] 도 5는 MAPK 및 Akt 경로에 대한 HER2/HER3의 커플링을 나타낸다.

[0032] 도 6은 트라스투주마브 및 페르투주마브의 활성을 비교한다.

[0033] 도 7A 및 7B는 각각 트라스투주마브 경쇄 (도 7A; 서열 15) 및 중쇄 (도 7B; 서열 16)의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0034] 도 8A 및 8B는 각각 변이체 페르투주마브 경쇄 서열 (도 8A; 서열 17) 및 변이체 페르투주마브 중쇄 서열 (도 8B; 서열 18)을 나타낸다.

[0035] 도 9는 실시예 1에서 치료된 환자의 기준선 인구통계를 제공한다.

[0036] 도 10은 모든 등급 3 내지 4의 부작용을 나타낸다 (치료에 대한 관련성에 관계없이).

[0037] 도 11은 중증 부작용을 나타낸다 (치료에 대한 관련성에 관계없이).

[0038] 도 12는 조사자에 의해 연구 약물과 관련된 것으로 판단된 중증 부작용을 요약한다.

[0039] 도 13은 선택된 부작용에 관한 정보를 제공한다.

[0040] 도 14는 심장 중증 부작용 및 진척된 보고를 요구하는 부작용을 나타낸다.

[0041] 도 15는 실시예 1에서 페르투주마브의 II상 연구에 대한 효능 결과를 요약한다.

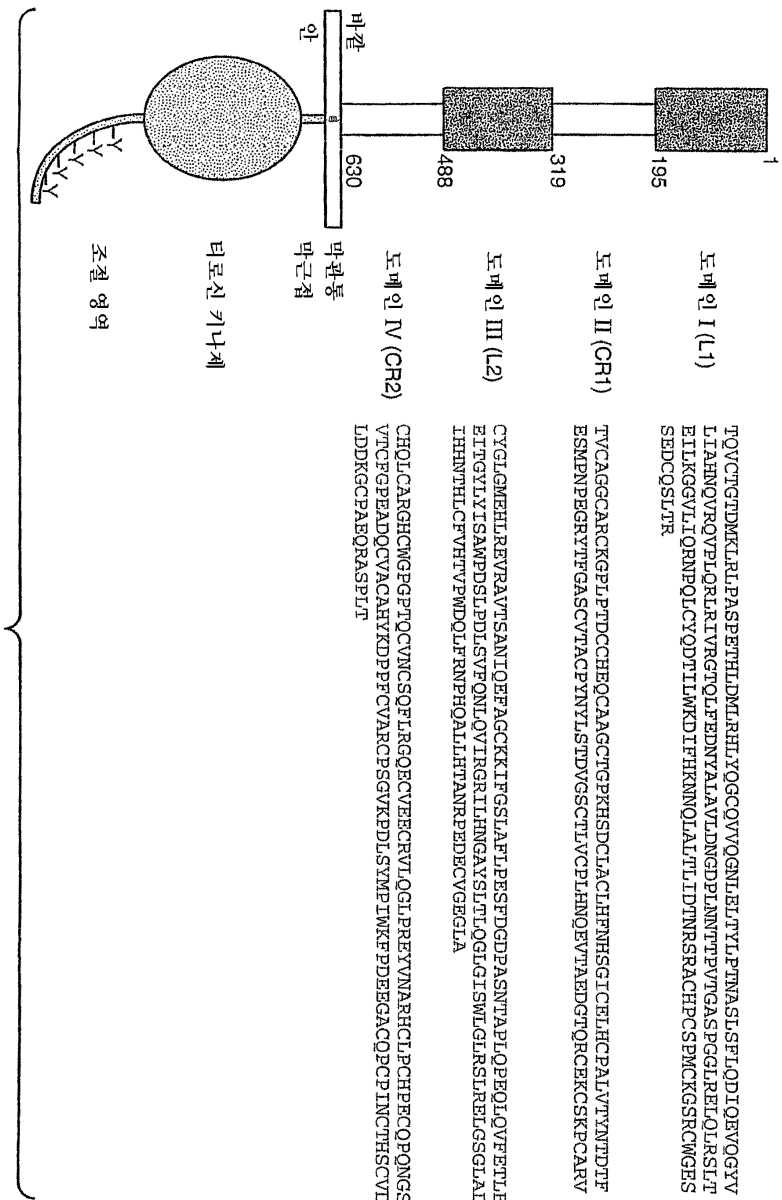
[0042] 도 16은 저 투여량 (420 mg) 또는 고 투여량 (1050 mg)의 페르투주마브로 치료된 평가가능한 난소암 대상체에 대한 질환 진행까지의 시간 (TTP) 효능을 나타낸다.

[0043] 도 17은 저 투여량 (420 mg) 또는 고 투여량 (1050 mg)의 페르투주마브로 치료된 평가가능한 난소암 대상체에 대한 전체 생존 효능을 나타낸다. 토포테칸으로 치료된 난소암 대상체에 대한 역사적 생존 중위값은 43주이며, 리포솜성 독소루비신은 36주였다.

- [0044] 도 18은 페르투주마브 420 mg 또는 1050 mg으로 치료된 난소암 대상체에 대한 CA-125 반응을 제공한다.
- [0045] 도 19는 페르투주마브 420 mg으로 치료된 난소암 대상체에 대한, ELISA에 의해 측정된 바와 같은 인-HER2 (pHER2) 상태를 제공한다.
- [0046] 도 20은 페르투주마브 420 mg으로 치료된 난소암 대상체에 대한, ELISA에 의해 측정된 바와 같은 pHER2 상태에 의한 임상적 효능 결과를 제공한다.
- [0047] 도 21은 활성의 증거 (18주 초과 동안 부분적 반응, PR, 또는 안정한 질환, SD)를 나타내는 페르투주마브 420 mg으로 치료된 난소암 환자에 대한 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 pHER2 상태를 제공한다. BSLD는 최장 직경의 기준선 합을 지칭한다.
- [0048] 도 22는 pHER2 상태에 의한 TTP 효능을 나타낸다. 난소암 대상체는 페르투주마브 420 mg으로 치료되었다. 전체 TTP는 6.6주이고; pHER 양성 대상체에서의 TTP는 20.9주이고; pHER2 음성 대상체에서의 TTP는 6.0주이고; 알려지지 않은 pHER2 상태를 갖는 환자에서의 TTP는 9.1주였다.
- [0049] 도 23은 pHER2 상태에 의한 전체 생존을 나타낸다. 난소암 대상체는 페르투주마브 420 mg으로 치료되었다. 토폠테칸으로 치료된 난소암 대상체에 대한 역사적 생존 중위값은 43주이고, 리포솜성 독소루비신은 36주였다.

도면

도면1



도면2A

가변 경쇄

```

10      20      30      40
2C4    DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSIIC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
      **   ***** *
574    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP
      *   ** ***
hum κI  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISINYLA] WYQQKP

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

90      100
2C4    EDLAVYYC [QQYIYPYT] FGGGKLEIK (서열 1)
      * * * * *
574    EDFATYYC [QQYIYPYT] FGQGTKVEIK (서열 3)
      * * * * *
hum κI  EDFATYYC [QQYNLSPWT] 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    HGKSLIEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIYVM
      * * * * *
574    PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL
      * * * * *
hum III PGKGLEWVA [VISGDDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLYL

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

도면3A

페르투주마브 경쇄에 대한 아미노산 서열

```

1      10      20      30      40      50      60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPS

70      80      90      100     110     120
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT

190     200     210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
    
```

도면3B

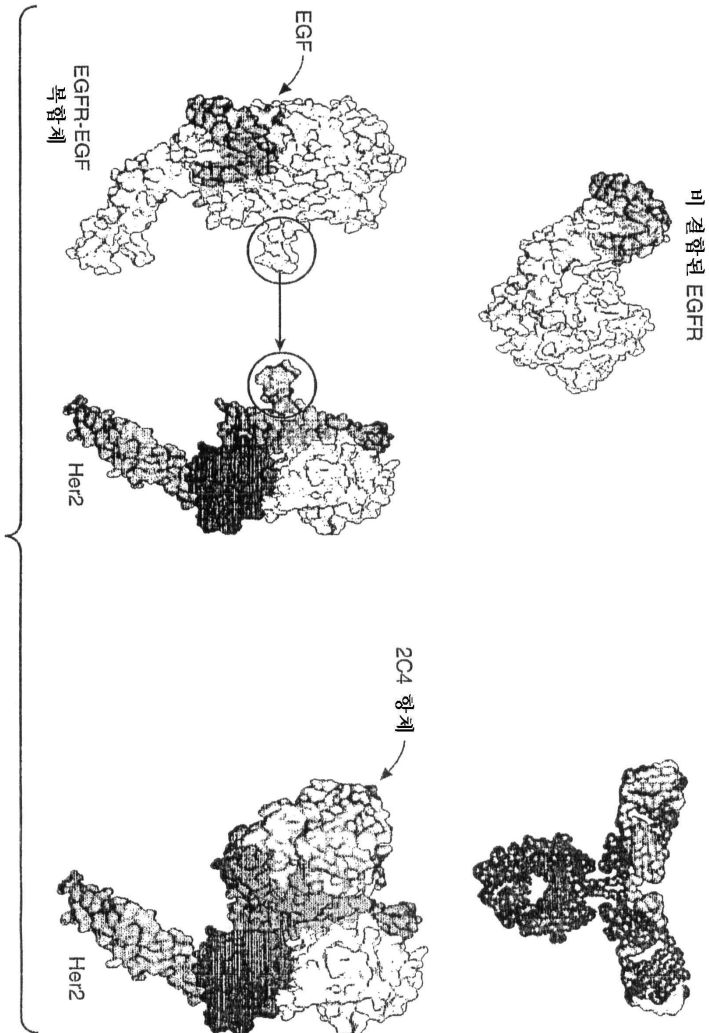
페르투주마브 중쇄에 대한 아미노산 서열

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFTTDYTMDWRQAPGKGLEWVADVNFNSGGSIY
|      |      |      |      |      |      |
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |     |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQTLVTVSSA
|     |     |     |     |     |     |
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |    |
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
|    |    |    |    |    |    |
190    200    210    220    230    240
|    |    |    |    |    |    |
LYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
|    |    |    |    |    |    |
250    260    270    280    290    300
|    |    |    |    |    |    |
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
|    |    |    |    |    |    |
310    320    330    340    350    360
|    |    |    |    |    |    |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKQPREPQVYTLPPSREEM
|    |    |    |    |    |    |
370    380    390    400    410    420
|    |    |    |    |    |    |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
|    |    |    |    |    |    |
430    440    448
|    |    |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

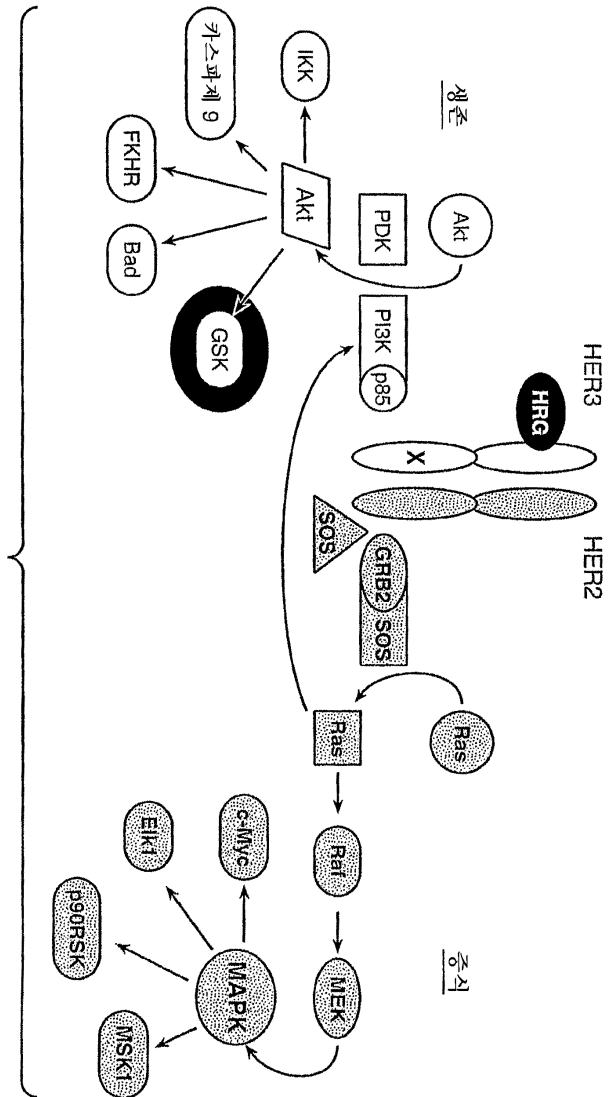
```

리간드-활성화된 EGFR은 HER2와 이종이량체화된다. 2C4는 이종이량체 결합 부위에서 결합한다.



도면4

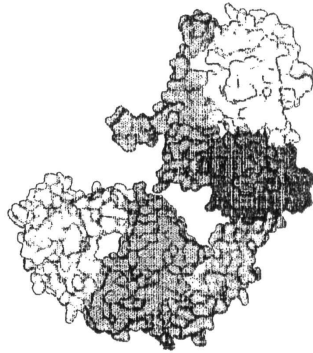
HER2/3의 MAPK 및 Akt 경로의 커플링





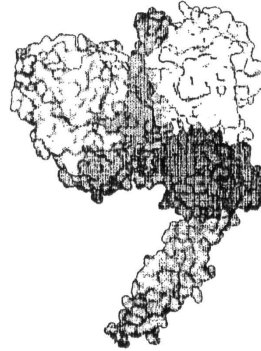
도면6

트라스투주마브  
헤르셉틴



- JM 근처의 IV에서 결합함
- 수용체 웨딩에 대해 보호함
- 수용체 하향조절에 적당하게 영향을 줌
- 공동수용체로서의 HER2의 역할에 약간의 효과

페르투주마브  
움니타르그



- 이량체화 계면에서 II에 결합함
- 수용체 웨딩을 방지하지 않음
- 수용체 하향조절에 적당하게 영향을 줌
- 공동수용체로서의 HER2의 역할에 주요한 효과

경세

1 DIQNTQSPSSL 15 SASVGD 30 RVTITCRASQDVNTAVAWYQOKPKKAPK 45  
46 LLIYSASFLLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ 90  
91 HYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL 135  
136 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180  
181 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

중체

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHWVROAPGKGL 45  
15  
46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSSLRAED 90  
60  
91 TAVY YCSRWG GDFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS 135  
105  
136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLAQSS 180  
150  
181 GLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225  
195  
226 THTCP PPAPELLGGRPSVFLLPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV 270  
240  
271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD 315  
285  
316 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREE 360  
330  
361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTPVLDS 405  
375  
406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHREALHNHYTQKSLISLP 449  
420

1 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 M 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

도면8A

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 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 V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S M T K 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 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 F 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

도면9

특징	420 mg	1050 mg	모두
n	61	62	123
연령 중위값 (년)	59 (35-78)	56.5 (35-83)	57 (35-83)
ECOG PS 0 / 1 / 2-3	28 / 31 / 2	37 / 25 / 0	65 / 56 / 2
측정가능한 질환	53 (87%)	59 (95%)	112 (91%)
원래 백금-내성	33 (54%)	33/61 (54%)	66 (54%)
원래 백금-감수성	28 (46%)	28/61 (46%)	56 (46%)
화학 처방 수 중위값	5.0 (1-10)	4.5 (0-13)	5.0 (0-13)
난소암의 지속기간 중위값 (개월)	39.9 (3.3-146.7)	35.5 (10.5-443.7)	38.6 (3.3-443.7)

도면10

기관계	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	모두 (n=123)
- 임의의 부작용 -	35 (57.4%)	33 (53.2%)	68 (55.3%)
위장관	27 (44.3%)	16 (25.8%)	43 (35%)
- 설사	-7 (11.5%)	-8 (12.9%)	-15 (12.2%)
- 장 폐쇄증	-10 (16.4%)	-7 (11.3%)	-17 (13.8%)
호흡기	8 (13.1%)	9 (14.5%)	17 (13.8%)
피로, 무력증	4 (6.6%)	2 (3.2%)	6 (4.9%)
탈수증	4 (6.6%)	2 (3.2%)	6 (4.9%)
심장	3 (4.9%)	2 (3.2%)	5 (4.1%)
식욕부진	2 (3.3%)	2 (3.2%)	4 (3.3%)
감염	3 (4.9%)	0	3 (2.4%)

도면11

마람직한 용어	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	모두 (n=123)
- 임의의 부작용 -	26 (42.6%)	18 (29.0%)	44 (35.8%)
위장관	15 (24.6%)	8 (12.9%)	23 (18.7%)
- 설사	-2 (3.3%)	-0 (0.0%)	-2 (1.6%)
- 장 폐쇄증	-10 (16.4%)	-8 (12.9%)	-18 (14.6%)
호흡기	4 (6.6%)	3 (4.8%)	7 (5.7%)
심장	2 (3.3%)	2 (3.2%)	4 (3.3%)
신장 및 뇨	1 (1.6%)	3 (4.8%)	4 (3.3%)
탈수증	1 (1.6%)	2 (3.2%)	3 (2.4%)
감염	3 (4.9%)	0 (0.0%)	3 (2.4%)

도면12

마람직한 용어	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	모두 (n=123)
- 임의의 부작용 -	4 (6.6%)	2 (3.2%)	6 (4.9%)
설사	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
복부 통증	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
LVEF 감소	0	1 (1.6%)	1 (0.8%)
심방 세동	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
심낭 삼출	0	1 (1.6%)	1 (0.8%)
폐렴	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)

도면13

사건	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	모두 (n=123)
설사 (모두 등급 1 내지 3)	35 (57.4%)	40 (64.5%)	75 (61%)
- 등급 3	-7 (11.5%)	-8 (12.9%)	-15 (12.2%)
발진 및 피부 장애 (모두 등급 1 내지 2)	26 (42.6%)	31 (50%)	57 (46.3%)
LVEF는 10% 포인트 이상 감소 (지금까지 관측된 중앙값에 의해 어느것도 확인되지 않음)	10/49 (20.4%)	13/50 (26.0%)	23/99 (23%)
LVEF는 50% 미만으로 감소 (지금까지 관측된 중앙값에 의해 어느것도 확인되지 않음)	1/50 (2%)	4/50 (8%)	5/100 (5%)

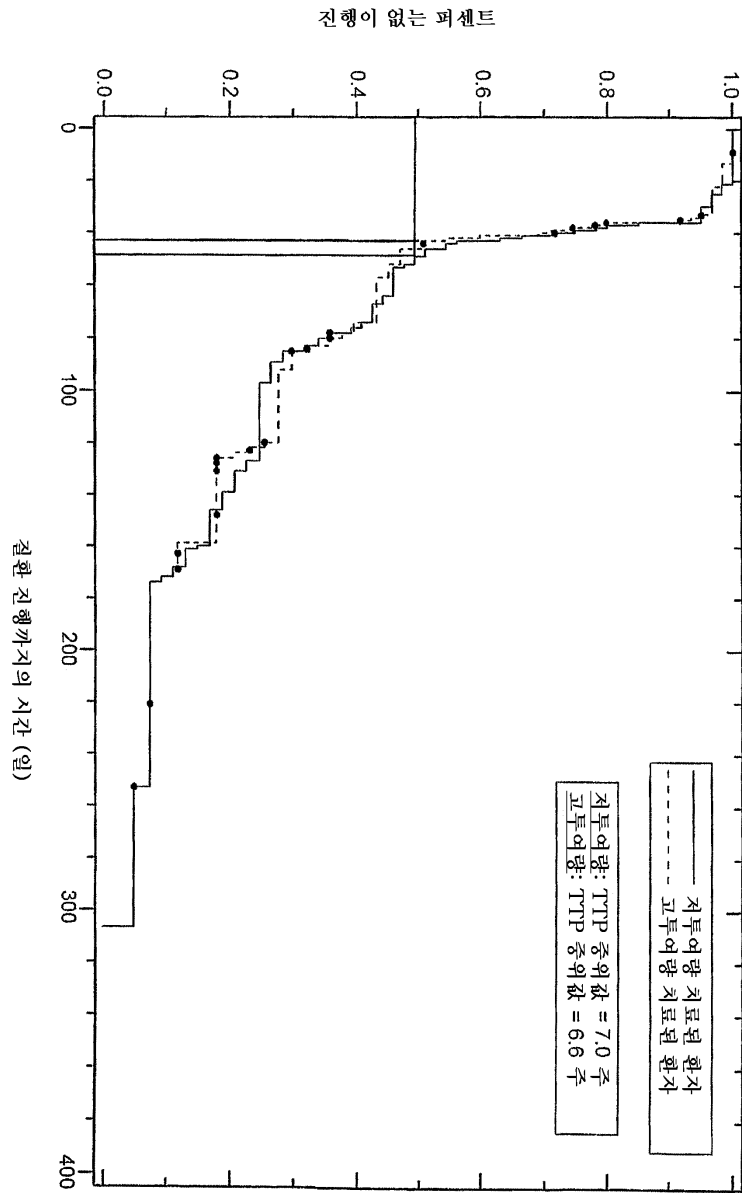
도면14

바람직한 용어	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	모두 (n=123)
- 임의의 부작용 -	13 (21.3%)	15 (24.2%)	28 (22.8%)
박출 계수 감소 (기준선으로 부터 10% 포인트 초과)	10 (16.4%)	14 (22.6%)	24 (19.5%)
심실 기능부전	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
심방 세동	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
비감염성 심내막염	1 (1.6%)	0	1 (0.8%)
심낭 삼출	0	1 (1.6%)	1 (0.8%)
심장 압전	0	1 (1.6%)	1 (0.8%)

도면15

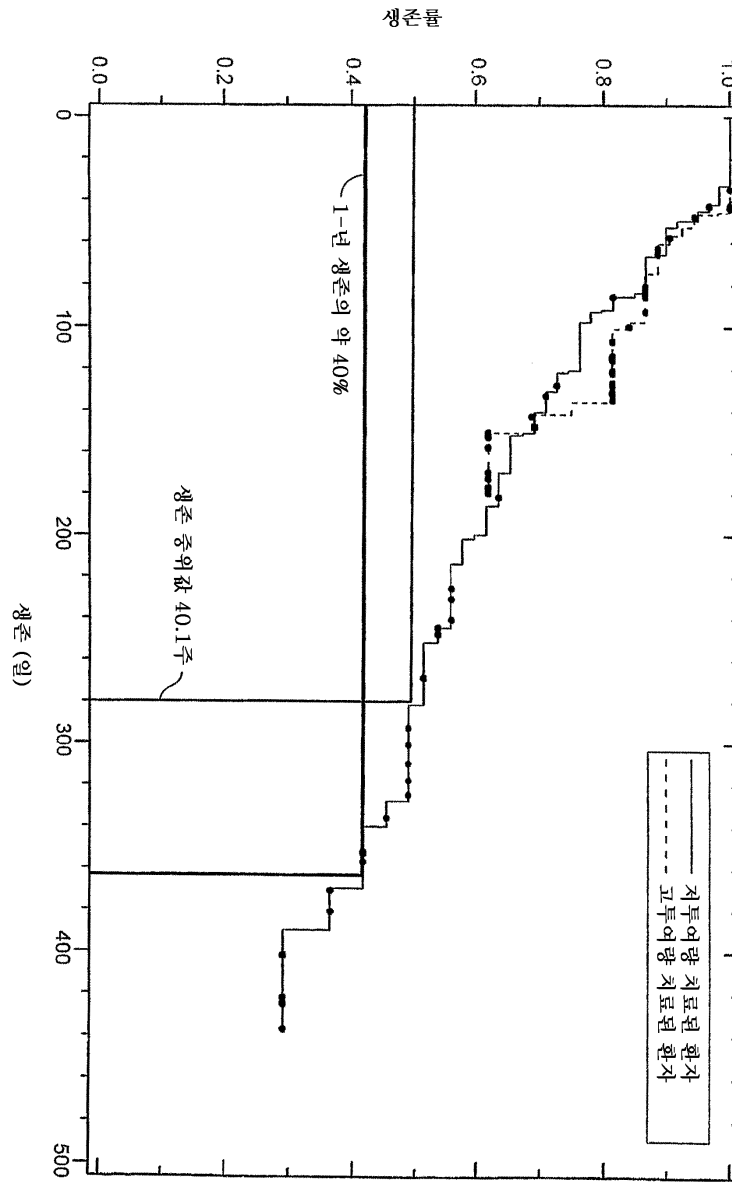
종말점	420 mg	1050 mg	총
n	60	62	122
PR	2 (3.3%)	3 (4.8%)	5 (4.1%)
SD	23 (38.3%)	24 (38.7%)	47 (38.5%)
PD	27 (45.0%)	29 (46.8%)	56 (45.9%)
반응 UTD	2 (3.3%)	2 (3.2%)	4 (3.3%)
TTP 중위값 (주)	7.0	6.6	6.6
생존 중위값 (주)	40.1	-	40.1

도면16





도면17



도면18

CA-125 반응	420 mg	1050 mg	총
50% 초과 감소	7 (1 PR, 4 SD, 2 PD)	5 (1 PR, 3 SD, 1 PD)	12 (2 PR, 7 SD, 3 PD)
25% 초과 50% 미만의 CA-125 감소	3 (3 SD)	5 (3 SD, 1 PD, 1 UE)	8 (6 SD, 1 PD, 1 UE)
25% 미만 감소	6 (1 PR, 4 SD, 1 PD)	10 (1 PR, 8 SD, 1 PD)	16 (2 PR, 12 SD, 2 PD)
무반응	37 (12 SD, 20 PD, 1 UE, 4 무반응)	36 (1 PR, 10 SD, 24 PD, 1 무반응)	73 (1 PR, 22 SD, 44 PD, 1 UE, 5 무반응)
총	53	56	109

도면19

치료된 환자	61
효능 평가가능함	54
	<b>ELISA</b> (30% 초과 중앙)
pHER2 데이터 (n=65 샘플)	34
pHER2+	10
% pHER2+	29%
평가가능한 환자 및 pHER2 데이터	31
pHER2+	8
% pHER2+	26%

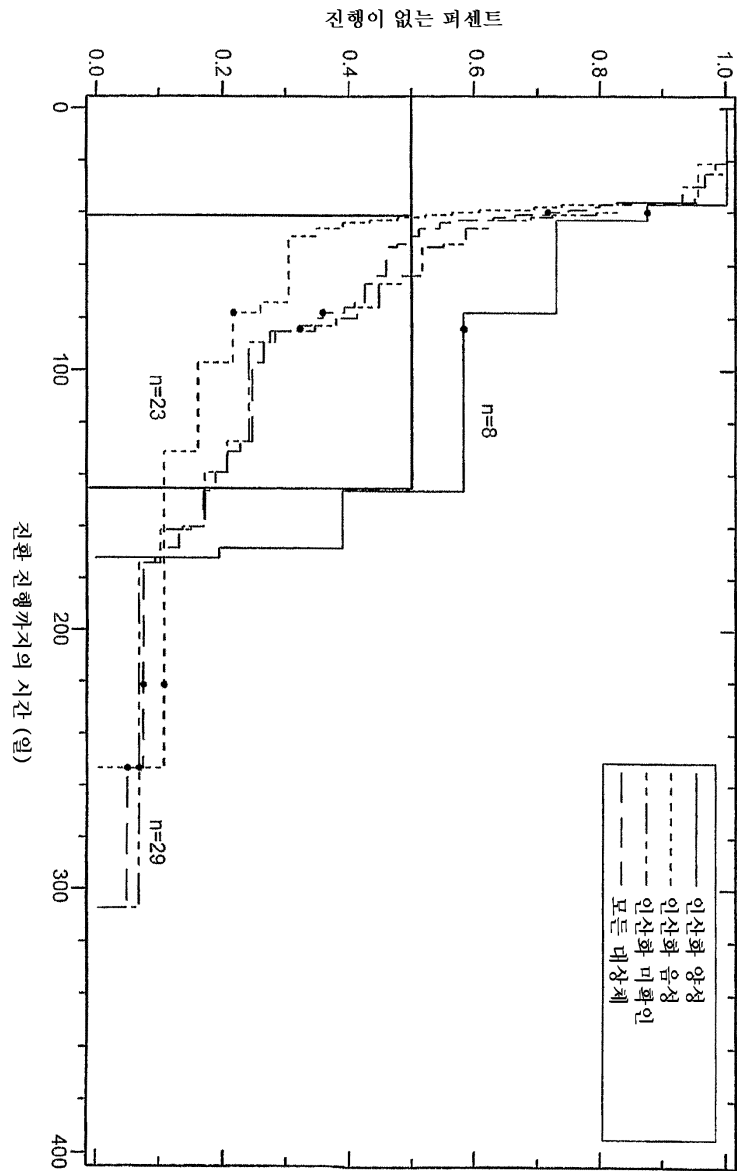
도면20

	420 mg pHER2+	420 mg pHER2-	420 mg pHER2 ?
N	8	23	29
PR	1 (12.5%)	0 (0.0%)	1 (3.4%)
SD	5 (62.5%)	5 (21.7%)	13 (44.8%)
PD	2 (25.0%)	13 (56.5%)	12 (41.4%)
반응 UTD	0 (0.0%)	2 (8.7%)	0 (0.0%)
TTP 중위값 (주)	20.9	6.0	9.1
생존 중위값 (주)	-	35.9	48.4

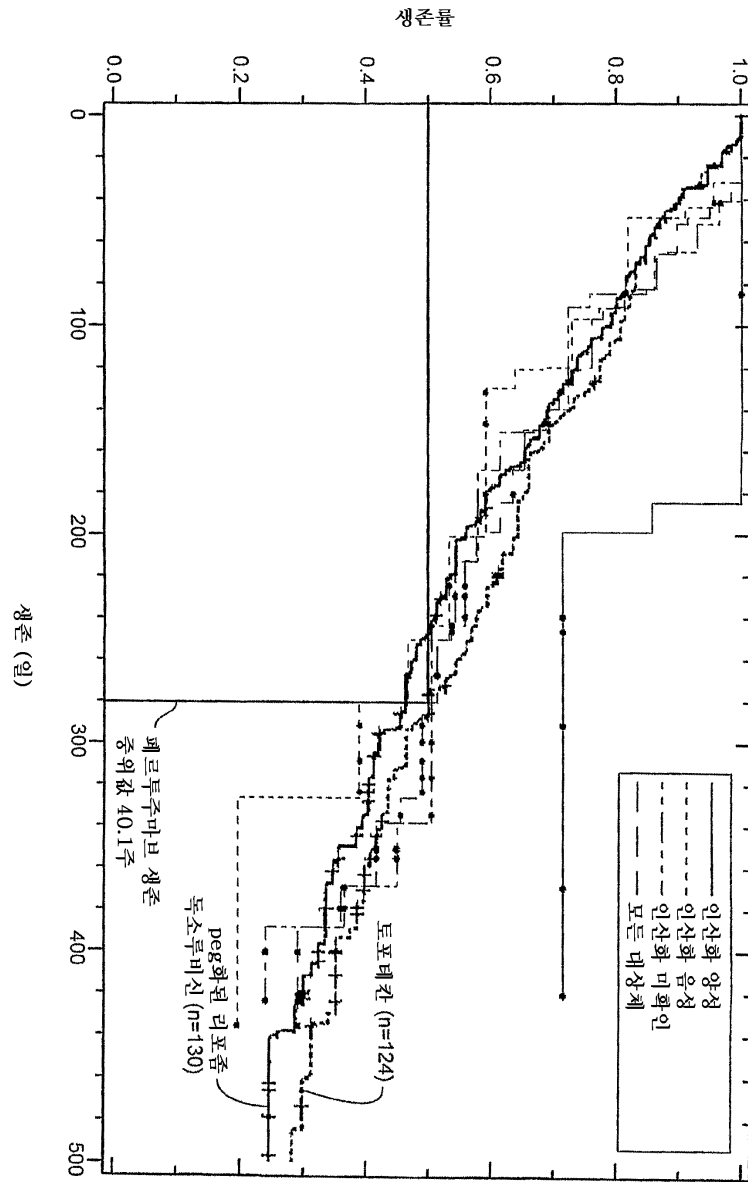
도면21

최고 반응	BSLD의 감소	CA-125의 감소	치료시 주 수	pHER2 ELISA
PR	68%	54%	25	+
PR	78%	22%	23	NA
SD		33%	36	NA
SD		57%	20	NA
SD		15%	19	-
SD		60%	32	-
SD		없음	21	+
SD		21%	44+	NA
SD		없음	23	NA
SD		62%	24	+
SD		5%	36	-
SD		56%	18	NA
SD		없음	25	NA
혼합	30%	없음	13	NA

도면22



도면23



서열목록

<110> DERYNCK, MIKA K., KELSEY, STEPHEN M.  
 <120> EXTENDING TIME TO DISEASE PROGRESSION OR SURVIVAL IN  
 CANCER PATIENTS

<130> P2206R1

<150> US 60/655,277

<151> 2005-02-23

<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 preferrably D or S

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

<210> 8  
 <211> 17

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Sequence is synthesized.

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

Lys Gly

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

<220>  
 <223> Sequence is synthesized.

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

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

<220>  
 <223> Sequence is synthesized.

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

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

<220>  
 <223> sequence is synthesized

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> 5  
 <223> Xaa is preferably R or L

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> 6  
 <223> Xaa is preferably Y or E

<220>  
 <221> Xaa  
 <222> 7  
 <223> Xaa is preferably T or S

<400> 11  
 Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa  
 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 12  
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr  
 5

<210> 13  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Sequence is synthesized.

<400> 13  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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

<211> 448  
 <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 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> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 15

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 16

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys  
 20 25 30



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

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr  
 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr  
 95 100 105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 395 400 405

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

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

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

440

445

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

155 160 165

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
200 205 210

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
215

<210> 18

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence is synthesized.

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

	95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	110	115	120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	125	130	135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp	140	145	150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu	155	160	165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly	170	175	180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	185	190	195
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn	200	205	210
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	215	220	225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300

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

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

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 350 355 360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 365 370 375

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 380 385 390

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 395 400 405

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

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

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

<210> 19

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg Val

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

<400> 21  
 Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val  
 1 5 10 15

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

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

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



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

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile  
 80 85 90

Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln  
 95 100 105

Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu  
 110 115 120

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe  
 125 130 135

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

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

Glu Gly Leu Ala

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

<400> 22  
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro  
 1 5 10 15

Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys  
 20 25 30

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
 35 40 45

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln  
 50 55 60

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
 65 70 75

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys  
 80 85 90

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

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

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

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr  
 140