



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0097304  
(43) 공개일자 2015년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0018649  
(22) 출원일자 2014년02월18일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
삼성전자주식회사  
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)  
(72) 발명자  
정광호  
서울특별시 강남구 도곡로 320, 105동 501호 (도곡동, 래미안도곡카운티)  
이승현  
경기도 수원시 영통구 영통로102번길 37-24, 하우빌 206호 (망포동)  
(74) 대리인  
팬코리아특허법인

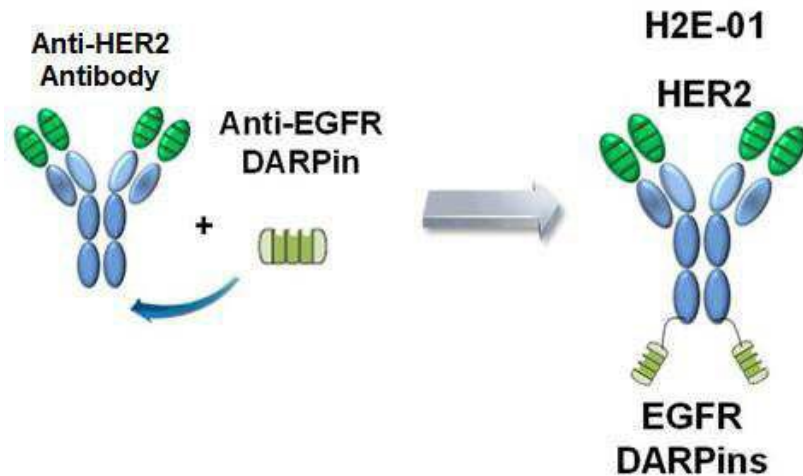
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항 EGFR DARPIn을 포함하는 EGFR/HER2 이중 특이 항체

(57) 요약

항 EGFR DARPIn 및 항 HER2 항체를 포함하는 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체, 상기 이중 특이 항체를 포함하는 약학 조성물, 상기 이중 특이 항체를 제조하는 방법, 및 항 EGFR DARPIn을 이용하는 항 HER2 항체의 부작용 감소 및/또는 효능 증진 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**린포웨이**

경기 화성시 동탄반석로 277, 124동 2202호 (석우동, 예당마을우미린제일풍경채)

**이샛별**

서울특별시 서초구 서운로3길 29, 506호 (서초동, 우정에쉐르)

**황재웅**

서울특별시 강남구 개포로22길 41-4, 일광빌라 201호 (개포동)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

항 EGFR DARPin, 및  
IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체, 또는 이들의 조합  
을 포함하는, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항 EGFR DARPin은 서열번호 1의 항 EGFR DARPin, 서열번호 2의 항 EGFR DARPin, 서열번호 3의 항 EGFR DARPin, 및 서열번호 4의 항 EGFR DARPin으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하거나, 또는 상기 선택된 1종 이상이 2개 내지 10개 반복된 형태인, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙, 트라스투주맙 엠탄신, 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위와 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는 항 HER2 항체로 이루어진 군에서 선택된 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체인, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 5**

항 EGFR DARPin을 IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체, 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계를 포함하는, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 제조 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 항 EGFR DARPin은 서열번호 1의 항 EGFR DARPin, 서열번호 2의 항 EGFR DARPin, 서열번호 3의 항 EGFR DARPin, 및 서열번호 4의 항 EGFR DARPin으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하거나, 또는 상기 선택된 1종 이상이 2개 내지 10개 반복된 형태인, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 제조 방법.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙, 트라스투주맙 엠탄신, 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위와 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는 항 HER2 항체로 이루어진 군에서 선택된 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체인, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 제조 방법.

**청구항 8**

항 EGFR DARPin을 IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체, 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계를 포함하는, 항 HER2 항체의 효능 증진 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 항 EGFR DARPin은 서열번호 1의 항 EGFR DARPin, 서열번호 2의 항 EGFR DARPin, 서열번호 3의 항 EGFR DARPin, 및 서열번호 4의 항 EGFR DARPin으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 1개 또는 2개 내지 10개 반복된 형태인, 항 HER2 항체의 효능 증진 방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙, 트라스투주맙 엠탄신, 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위와 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는 항 HER2 항체로 이루어진 군에서 선택된 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체인, 항 HER2 항체의 효능 증진 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 항 EGFR DARP인 및 항 HER2 항체를 포함하는 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체, 상기 이중 특이 항체를 포함하는 약학 조성물, 상기 이중 특이 항체를 제조하는 방법, 및 항 EGFR DARP인을 이용하는 항 HER2 항체의 부작용 감소 및/또는 효능 증진 방법이 제공된다.

**배경기술**

[0002] 세포 내에서는 다양한 단백질들이 서로 상호작용하며 질병을 유발시키는 여러 기작에 관여하고 있다. 이들 단백질 중 둘 이상을 동시에 저해하면, 하나의 단백질을 저해하는 경우와 비교하여, 상승된 질병 치료 효과를 얻을 수 있을 뿐 아니라, 각각의 저해 약물에 대한 내성의 극복 가능성도 높아진다. 이러한 이유로 여러 가지 단백질을 저해할 수 있는 다양한 이중 특이 항체가 개발되고 있다.

[0003] 많은 이중 특이 항체들이 개발되고는 있지만 임상시험에서 그 효능이 입증되지 않거나 여러 가지 부작용이 관찰되어 항체 치료제로서 상용화되지 못하고 있다. 이와 같이 항체들이 상용화되지 못하는 가장 큰 이유 중의 하나가 항체의 안정성과 생산성에 있어서의 문제점 때문이다. IgG 형태를 지닌 초기의 이중 항체는 생산 과정에서 항체의 경쇄와 중쇄의 무작위적인 조합이 이루어지면서 원하는 한 종류의 이중 항체를 분리, 정제하는 것이 매우 어렵기 때문에 대량생산의 문제가 있다. 또한, IgG 형태가 아닌 이중항체의 경우 단백질 접힘(protein folding), 약물동력학(pharmacokinetics) 등의 부분에서 약물로서의 안정성이 검증되지 못하였다.

[0004] 따라서, 이중 특이 항체의 체내 안정성 및 약물로서의 물성을 증진시키는 기술의 개발이 요구된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명의 일 예는 항 EGFR DARP인과 항 HER2 항체를 포함하는 EGFR과 HER2에 대한 이중 특이 항체를 제공한다.

[0006] 다른 예는 항 HER2 항체에 항 EGFR DARP인을 결합시키는 단계를 포함하는 포함하는 EGFR과 HER2에 대한 이중 특이 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0007] 다른 예는 상기 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0009] 다른 예는 항 EGFR DARP인을 포함하는 항 HER2 항체의 부작용 저감 및/또는 효능 증진용 조성물을 제공한다.

[0010] 다른 예는 항 HER2 항체에 항 EGFR DARP인을 결합시키는 단계를 포함하는 항 HER2 항체의 부작용을 감소 및/또는 효능을 증진시키는 방법을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 이중 특이 항체는 매우 다양한 종류와 형태로 개발되고 있으며, 두 가지 이상의 항원에 동시에 결합할 수 있으므로, 기존의 단클론 항체와 비교하여 치료 효과가 뛰어난 항체신약으로서 기대되고 있다. 본 발명은 기존의 IgG 형태의 항체에 DARP인을 결합시킨 새로운 개념의 이중 특이 항체를 제안하고자 한다.

[0012] DARP인 (designed ankyrin repeat protein)은 표적 단백질에 대하여 높은 특이성과 높은 결합 친화도를 보이는 유전공학적으로 제작된 항체 모사 단백질 (antibody mimetic protein)이다. DARP인은 천연 안키린 (ankyrin) 단백질로부터 유래된 것으로 반복 단위체(ankyrin repeat motif)가 2개 이상 또는 3개 이상, 예컨대 4 또는 5개 반복된 구조를 갖는다. 상기 반복 단위체가 3개, 4개, 또는 5개 반복된 DARP인의 경우 분자량이 각각 약 10 kDa, 14 kDa 또는 약 18 kDa 정도이다. DARP인은 주로 구조적 기능을 하는 코어 부분과 표적과 결합하는 표적

결합 부분을 포함하며, 상기 코어 부분은 보존된 아미노산 서열을 갖고, 상기 표적 결합 부분은 상기 코어 바깥쪽에 위치하는 부분으로 표적에 따라서 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

- [0013] DARPin은 표적 특이성과 같이 항체와 유사한 특성을 가지므로, 기존의 IgG 형태, scFv-Fc 형태 등의 다양한 항체와 결합시켜 새로운 형태의 이중 특이 항체로 제작할 수 있다.
- [0014] 한편, 상피세포성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor; EGFR)는 HER 패밀리의 수용체 티로신 키나아제(Receptor Tyrosine Kinases; RTKs)의 일원이다. 여러 종류의 인간 악성 종양에서 EGFR의 과발현, 유전자 증폭, 돌연변이, 또는 재배열 등이 빈번히 관찰되며, 암 치료의 불량한 예후 및 나쁜 임상적 결과와 관련 있다. 이러한 이유로, 이들 EGFR는 항암 요법에 있어서 중요한 표적이 된다.
- [0015] 따라서, 일 예에서, EGFR을 표적으로 하는, 즉 EGFR에 특이적으로 결합하는 항 EGFR DARPin (또는 EGFR 결합 DARPin)을 포함하는 이중 특이 항체가 제공된다. 구체적으로, 항 EGFR DARPin 및 항 HER2 항체를 포함하는 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체가 제공된다. 상기 항 HER2 항체는 IgG 형태의 항체, scFv-Fc 형태의 항체 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 항 EGFR DARPin은 DARPin 고유의 구조를 가지면서 EGFR에 특이적으로 결합하는 모든 DARPin일 수 있다. 예컨대, 항 EGFR DARPin은 하기하는 4종의 항 EGFR DARPin으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다:
- [0017] 항 EGFR DARPin-01 (서열번호 1):
- [0018] dlgkklleaaragqddevrilmangadvnaddtwwgtplhlaayqghleivevllkngadvnadyigwtplhlaadghleivevllkngadvnasdyigdtplhlaahngheivevllkhgadvnaqdkfgktafdisisdngnedlaeilq
- [0019] 항 EGFR DARPin-67 (서열번호 2):
- [0020] dlgkklleaaragqddevrilmangadvnatdndgntplhlsawighleivevllkhgadvnaddllgmtplhlaadtghleivevllkygadvnardtgrktplhlaardghleivevllkhdadvnaqdkfgktafdisisdngnedlaeilq
- [0021] 항 EGFR DARPin-68 (서열번호 3):
- [0022] dlgkklleaaragqddevrilmangadvnafdywgmtplhlaadngheivevllkhgadvnasdnfgftplhlaafyghleivevllkhgadvnafdmwgn tplhlaaangheivevllkngadvnaqdkfgktafdisisdngnedlaeilq
- [0023] 항 EGFR DARPin-69 (서열번호 4):
- [0024] dlgkklleaaragqddevrilmangadvnaddnagrtplhlaanfghleivevllkngadvnakghhcntplhlaawaghleivevllkygadvnadddegy tplhlaadigdleivevllkygadvnawdmygrtplhlaasaghleivevllkygadvnaqdkfgktafdisisdngnedlaeilq
- [0025] HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2 protein) 는 세포 증식 및 분화를 조절하는 데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로 세포 외 성장 인자가 결합하면 다른 HER 수용체와 함께 동형- 및/또는 이형이합체로 조립되는 강한 경향성을 갖고, 이는 다양한 형태의 신호 전달 경로 활성화를 초래하여, 세포자멸, 생존, 또는 세포 증식을 유도한다.
- [0026] 상기 HER2는 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유류에서 유래하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 HER2 단백질은 GenBank Accession Number NM\_004448 (human), NM\_001003817 (mouse), NM\_017003 (rat)등에 제공된 뉴클레오타이드 서열(mRNA)에 의해 암호화된 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0027] 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체는 HER2를 특이적으로 인식 및/또는 결합하는 HER2에 대한 항원 결합 부위를 포함하는 모든 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 예컨대, IgG1 또는 IgG2 서브타입 형태의 항체일 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄를 포함하고, 각각의 중쇄 및 경쇄는 다이설파이드 결합을 통하여 결합되어 두 개의 중쇄-경쇄 구조체를 형성하고, 상기 형성된 두 개의 중쇄-경쇄는 중쇄의 Fc 부위에서 다이설파이드 결합을 통하여 연결되어 있는 형태를 갖는다.
- [0028] 상기 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체는 HER2를 특이적으로 인식 및/또는 결합하는 HER2에 대한 항원 결합 부위를 포함하는 하나의 scFv-Fc 단편을 포함하는 모노머 형태 또는 2개의 scFv-Fc 단편이 Fc 부위에서 결합된 다이머 형태일 수 있다. 상기 Fc는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 예컨대, IgG1 또는 IgG2 서브타입에서 유래하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4는 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유

류에서 유래하는 것일 수 있으며, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입일 수 있다.

[0030] 상기 항 HER2 항체는 트라스투주맙(Trastuzumab; 중쇄 가변 부위: 서열번호 7, 경쇄 가변 부위: 서열번호 8), 퍼투주맙(Pertuzumab; 중쇄: 서열번호 9, 경쇄: 서열번호 10), 트라스투주맙 엠탄신(Trastuzumab emtansine: T-DM1), 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위와 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위를 포함하는 항 HER2 항체 등으로 이루어진 군에서 선택된 항체 또는 이의 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체일 수 있다.

[0031] <항 HER2 항체 중쇄 가변 부위 아미노산 서열> (서열번호 5)

[0032] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSNFKDTYIHWRVQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGITLVTVSS

[0033] <항 HER2 항체 경쇄 가변 부위 아미노산 서열> (서열번호 6)

[0034] DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR

[0035] 상기 "항원 결합 부위"는 항원과 특이적으로 결합하는 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하는 것으로, 중쇄 CDR (complementarity determining region), 경쇄 CDR, 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합 (예컨대, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>)을 의미하는 것일 수 있다.

[0036] 상기 항 EGFR DARPIn는 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체의 C 말단, N 말단, 또는 결합 가능한 모든 부위에 연결된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체의 항원 결합 능력 보존을 고려하여, 상기 항 EGFR DARPIn는 상기 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체의 Fc 부분의 C 말단에 연결된 것일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 이중 특이 항체가 항 EGFR DARPIn과, IgG 형태의 항 HER2 항체 및 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체의 조합을 포함하는 경우, 항 EGFR DARPIn, IgG 형태의 항 HER2 항체, 및 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체의 연결 순서는 특별한 제한이 없다. 경우에 따라서 연결 순서에 따라서 다른 효능을 보이거나 항체 발현률 등이 달라질 수 있으나, 통상적으로 소망하는 항체 효능에는 영향이 없다. 예컨대, 상기 이중 특이 항체는, IgG 형태의 항 HER2 항체, 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체의 C 말단에 연결된 항 EGFR DARPIn, 및 상기 항 EGFR DARPIn의 C 말단에 연결된 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 다른 예는 항 EGFR DARPIn를 항 HER2 항체와 연결시키는 단계를 포함하는, 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 제조 방법을 제공한다. 상기 항 EGFR DARPIn이 2종 이상이 연결된 것일 경우, 상기 제조 방법은 2종 이상, 예컨대 2 내지 10종, 2 내지 5종, 또는 2 내지 3종의 항 EGFR DARPIn를 연결(예컨대 직렬로 연결)시키는 단계를, 상기 항 EGFR DARPIn를 IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 c-Met 항체, 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계의 전 또는 후에, 추가로 포함할 수 있다. 상기 항 HER2 항체는 IgG 형태의 항체, scFv-Fc 형태의 항체 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0039] 상기 이중 특이 항체에 있어서, 상기 항 EGFR DARPIn은 동일한 아미노산 서열을 갖는 DARPIn을 하나 이상, 예컨대 1 내지 10개, 1 내지 5개, 또는 1 내지 3개 반복적으로 포함하거나, 상이한 서열을 갖는 항 EGFR DARPIn을 2종 이상, 예컨대 2 내지 10종, 2 내지 5종, 또는 2 내지 3종 포함할 수 있다. 상이한 서열을 갖는 항 EGFR DARPIn의 경우 이들이 인식 및/또는 결합하는 EGFR 상의 에피토프는 각각 상이할 수 있다. 또한, 상기 항 EGFR DARPIn에 더하여, EGFR 이외의 단백질을 표적으로 하는 1종 이상, 예컨대 1 내지 10종, 1 내지 5종, 또는 1 내지 3종의 DARPIn이 추가로 포함될 수 있다. DARPIn이 2개 이상 또는 2종 이상 포함되는 경우, 상기 2개 이상 또는 2종 이상의 DARPIn은 서로 연결되어 반복체 형태로 항체에 결합될 수 있으며, 상기 DARPIn 또는 이의 반복체는 IgG 형태의 항체 또는 scFv-Fc 형태의 항체의 각 사슬의 C 말단, N 말단 및 결합 가능한 부위 중 하나 이상에 연결될 수 있다. 예컨대, 상기 항 EGFR DARPIn은 상이한 바와 같은 서열번호 1의 항 EGFR DARPIn, 서열번호 2의 항 EGFR DARPIn, 서열번호 3의 항 EGFR DARPIn, 및 서열번호 4의 항 EGFR DARPIn으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 1개 내지 10개, 1 내지 5개, 또는 1 내지 3개 반복된 형태로 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체 및/또는 scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체의 C 말단, N 말단 또는 결합 가능한 모든 부위(예컨대, IgG 형태의 항체 및/또는 scFv-Fc 형태의 항체의 중쇄, 예컨대 Fc 부위의 C 말단 또는 경쇄의 C 말단 등)에 연결된 것일 수 있다.

[0040] 상기 항 EGFR DARPIn과 IgG 형태의 항체 및/또는 scFv-Fc 형태의 항체, scFv-Fc 내의 중쇄 가변 부위와 경쇄

가변 부위, 및 scFv-Fc와 scFv-Fc (다이머를 형성하는 경우)는 링커를 통하거나 통하지 않고 연결될 수 있다. 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 여러 개의 링커가 사용된 경우 서로 같거나 상이한 것일 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있으며, 그 포함된 아미노산 종류는 제한이 없다. 상기 펩타이드 링커는, 예컨대, Gly, Asn 및/또는 Ser 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및/또는 Ala과 같은 중성 아미노산들도 포함될 수 있다. 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당 업계에 공지되어 있다. 한편, 상기 링커는 상기 이중 특이 항체의 기능에 영향을 미치지 않는 한도 내에서, 그 길이를 다양하게 결정할 수 있다. 예컨대, 상기 펩타이드 링커는 Gly, Asn, Ser, Thr 및 Ala로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 총 1 내지 100개, 2 내지 50개, 또는 5 내지 25개를 포함하여 이루어진 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드 링커는 (G4S)<sub>n</sub> (n은 (G4S)의 반복수)로서, 1 내지 10의 정수, 예컨대 2 내지 5의 정수)로 표현되는 것일 수 있다.

[0041] 상기 항 EGFR DARPIn은 항원에 대하여 높은 친화도를 가지면서도 일반적인 항 EGFR 항체 단편 (예컨대, scFv, Fab 등)보다 분자량이 작고 안정성이 우수하기 때문에, 물성(예컨대, 체내 pharmacokinetic (PK) properties) 및 체내 체내 안정성 측면에서 유리하고, 다른 단백질과의 융합이 용이하여, 안정성 및 물성이 우수한 이중 특이 항체 제작에 유리하게 사용될 수 있다.

[0042] EGFR와 HER2는 서로 상호작용을 하며 종양과 관련된 여러 기작에 관여하는 대표적인 수용체 티로신 키나아제 단백질이다. 이들 단백질은 암세포의 증식, 암세포의 침투, 신생혈관 생성 등을 유도한다. 또한, 이들 단백질은 서로 상호작용을 함으로써 서로의 신호전달 체계에 관여하여 각각의 치료제에 대한 내성까지 유발시킬 수 있다. 또한, EGFR에 대한 표적 치료제(Erbix, Tarceva, Iresa 등)의 투여로 획득된 내성에는 HER2의 과발현과 돌연변이가 관련되어 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다. 따라서, EGFR과 HER2를 동시에 저해함으로써, 기존 약물의 부작용, 내성 등의 문제를 해결할 가능성이 높을 뿐 아니라, 단일 표적을 저해하는 경우보다 상승된 치료 효과를 거둘 수 있으며, 기존의 단일 표적에 대한 약물의 효과를 능가함과 동시에 기존 약물에 대하여 효과가 없던 암 종에도 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

[0043] 또한 상기 이중 특이 항체는 기존의 항 HER2 항체 또는 항 EGFR 항체 등의 EGFR 표적 치료제에 대하여 획득된 내성 극복이 가능하여 내성 획득 세포에서도 효과를 발휘하는 것을 특징으로 한다. 이와 같이, 상기 항 EGFR DARPIn과 항 HER2 항체를 포함하는 이중 특이 항체는 기존의 분해 기작과 차별화된 기작에 의하여 보다 증진된 효과를 나타낸다.

[0044] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변영역을 인간 항체의 불변영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 부위에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 부위 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격/framework)에 이식하여 제작된다.

[0045] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.

[0046] 일 구체예에 따르면, 상기 항 HER2 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 유래 항체일 수 있다. 상기 항체는 생체에서 분리된 것일 수 있다.

[0047] 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변영역은 중쇄 불변영역과 경쇄 불변영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1( $\gamma$ 1), 감마2( $\gamma$ 2), 감마3( $\gamma$ 3), 감마4( $\gamma$ 4), 알파1( $\alpha$ 1) 및 알파2( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.

- [0048] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 부위 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 부위 도메인  $V_H$  및 3개의 불변영역 도메인  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 부위 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 부위 도메인  $V_L$  및 불변영역 도메인  $C_L$ 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0049] 용어, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 부위(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.
- [0050] 용어, "항원 결합 단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 일 구체예에서, 상기 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 부위와 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역( $C_{H1}$ )을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다.
- [0051] Fab'는 중쇄  $C_{H1}$  도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다.
- [0052] F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0053] 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 부위와 단쇄의 가변 부위가 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있으며, 그 포함된 아미노산 종류는 제한이 없다.
- [0054] 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0055] 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, CH1 및 CH2 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다.
- [0056] 동물 유래 항체가 키메라화(chimerization) 과정을 거치게 되면, 동물 유래의 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지로 치환되지만, 동물 유래 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지에 비하여 그 길이가 짧고, 두 개의 중쇄 사이의 이황화결합(disulfide bond)이 3개에서 2개로 감소하여 힌지의 경직성(rigidity)이 서로 상이한 효과를 보이게 된다. 따라서, 힌지 영역의 변형(modification)은 인간화 항체의 항원 결합 효율성을 증가시킬 수 있다. 상기 힌지 영역의 아미노산 서열을 변형시키기 위한 아미노산의 결실, 부가 또는 치환 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0057] 이에, 본 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 효율성을 증진시키기 위하여, 상기 항 HER2 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산이 결실, 부가 또는 치환되어 아미노산 서열이 변형된 힌지 영역을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103 또는 서열번호 104의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역, 또는 서열번호 105의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역(비변형 인간 힌지 영역)을 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 힌지 영역은 서열번호 100 또는 서열번호 101의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 IgG 형태의 항 HER2 항체는 항체의 양쪽 중쇄-경쇄 구조체에 HER2에 대한 항원 결합 부위, 예컨대 HER2에 대한 중쇄 CDR, 경쇄 CDR 또는 이들의 조합, 또는 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합을 포함하는 HER2에 대한 단일 표적 항체일 수 있다. 다른 예에서, IgG 형태의 항 HER2 항체는 항체의 한쪽 중쇄-경쇄



구조체에 HER2에 대한 항원 결합 부위, 예컨대 HER2에 대한 중쇄 CDR, 경쇄 CDR 또는 이들의 조합, 또는 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합을 포함하고, 다른 쪽 중쇄-경쇄 구조체에는 HER2 이외의 항원에 대한 항원 결합 부위를 포함하는 이중 특이(이중 특이) 항체일 수 있다. 이 경우, 상기 HER2 이외의 항원은 EGFR일 수 있다.

[0059] 또 다른 예에서 IgG 형태의 항 HER2 항체는 양쪽 중쇄-경쇄 구조체에 HER2에 대한 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 형태의 HER2에 대한 단일 표적 항체의 Fc의 c 말단에 링커를 통하거나 통하지 않고 HER2 이외의 항원에 대한 항원 결합 부위, 예컨대 HER2 이외의 항원에 대한 항체의 중쇄 CDR, 경쇄 CDR, 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합(예컨대, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>)를 포함하는 상하 비대칭형 이중 특이 항체일 수 있다. 이 경우, 상기 HER2 이외의 항원은 EGFR일 수 있다. 상기 링커는 앞서 설명한 바와 같다.

[0060] 다른 예에서 상기 항 HER2 항체는 scFv-Fc 형태의 항체일 수 있다. 상기 scFv-Fc 형태의 항체는 HER2에 대한 항원 결합 부위, 예컨대 HER2에 대한 중쇄 CDR, 경쇄 CDR 또는 이들의 조합, 또는 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합을 포함하는 하나의 scFv-Fc 단편을 포함하는 모노머 형태의 HER2에 대한 단일 표적 항체 또는 상기한 HER2에 대한 항원 결합 부위를 갖는 2개의 scFv-Fc 단편이 Fc 부위에서 결합된 호모다имер 형태의 HER2에 대한 단일 표적 항체이거나, 상기한 HER2에 대한 항원 결합 부위를 갖는 하나의 scFv-Fc 단편과 HER2 이외의 항원에 대한 항원 결합 부위를 갖는 scFv-Fc 단편이 Fc 부위에서 결합된 헤테로다имер 형태의 이중 특이 항체일 수 있다. 이 경우, 상기 HER2 이외의 항원은 EGFR일 수 있다.

[0061] 다른 예는 항 EGFR DARPIn를 IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체, 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계를 포함하는 이중 특이 항체의 제조 방법을 제공한다. 상기 항 EGFR DARPIn이 2종 이상이 연결된 것일 경우, 상기 제조 방법은 2종 이상, 예컨대 2 내지 10종, 2 내지 5종, 또는 2 내지 3종의 항 EGFR DARPIn를 연결(예컨대 직렬로 연결)시키는 단계를, 상기 항 EGFR DARPIn를 IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 c-Met 항체, 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계의 전 또는 후에, 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 발명의 다른 측면은 상기 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료 방법이 제공한다. 상기 암의 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여하는 단계 이전에 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 용도가 제공된다.

[0063] 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 예컨대, 이에 제한되지 않지만, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 특히, 상기 암은 기존의 항암제, 예컨대 상기 EGFR에 대한 길항제에 대하여 내성이 생긴 암일 수 있다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.

[0064] 상기 이중 특이 항체는 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 및/또는 부형제 등과 함께 제공될 수 있다.

[0065] 상기 약학적으로 허용되는 담체는, 항체의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 약학적 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 상기 이중 특이 항체 또는 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0067] 상기 이중 특이 항체 또는 약학적 조성물의 적절한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성,

병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 이중 특이 항체 및 약학 조성물의 하루 투여량은 이중 특이 항체의 양을 기준으로 0.001 내지 100mg/kg, 또는 0.02 내지 10mg/kg 범위일 수 있다. 용어 "약학적 유효량"은 소망하는 효과, 예컨대 암을 예방 또는 치료하는 데 효과를 나타낼 수 있는 양을 의미한다.

[0068] 상기 이중 특이 항체 또는 약학적 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0070] 한편, 상기 이중 특이 항체 또는 약학적 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교차 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료제가 추가로 리포솜 내에 포함될 수 있다.

[0071] 상기 약학적 조성물의 투여 대상 또는 상기 예방 및/또는 치료 방법의 투여 대상 환자는 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등의 영장류, 또는 래트, 마우스 등의 설치류 동일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 기존의 항암제, 예컨대 EGFR에 대한 길항제(예컨대 항체) 및/또는 항 HER2 항체에 대하여 내성이 생긴 암환자일 수 있다.

[0072] 앞서 설명한 바와 같이, DARPIn은 물성(예컨대, pharmacokinetic (PK) properties) 및 체내 안정성이 우수하여, 기존의 항체, 예컨대 IgG 형태의 항체와 융합되어 이중 특이 항체로 제작되는 경우, DARPIn이 표적하는 항원을 포함한 두 가지 이상의 항원을 동시에 표적할 수 있을 뿐 아니라, IgG 형태의 항체의 물성 및/또는 안정성을 증진시킬 수 있다. 이와 같이 기존의 IgG 형태의 항체에 DARPIn을 융합시킴으로써 기존의 이중 특이 항체의 가장 큰 문제점이던 안정성 문제를 개선하고, 보다 증진된 항체 효능을 얻을 수 있다.

[0073] 따라서, 본 발명의 일 예는 (a) DARPIn을 (b) IgG 형태의 항 HER2 항체, scFv-Fc 형태의 항 HER2 항체 또는 이들의 조합과 연결시키는 단계를 포함하는, 항 HER2 항체의 효능 개선 방법을 제공한다.

[0074] 상기 항 HER2 항체의 효능 증진은 2가지 이상의 항원을 표적함으로써 얻어지는 상승 효과, 항체의 약물로서의 물성, 예컨대 약동학적 물성(pharmacokinetic (PK) properties)의 증진, 체내 또는 체외 안정성 증진, 항 HER2 항체에 대한 내성 극복, 항 HER2 항체의 부작용 감소, 또는 이들 모두를 의미하는 것일 수 있다.

[0075] 상기 항체의 효능 증진 방법에 있어서, DARPIn, 항 EGFR DARPIn, IgG 형태의 항체, scFv-Fc 형태의 항체, 이들의 연결 형태 등의 구체적 내용은 앞서 설명한 바와 같다.

### **발명의 효과**

[0076] 본 발명에서 제공되는 이중 특이 항체, 항 EGFR DARPIn과 항 HER2 항체를 포함하는 이중 특이 항체는 기존의 항체, 예컨대 기존의 항 HER2 항체와 비교하여 다음과 증진된 효과를 기대할 수 있다:

- [0077] 1. EGFR DARPIns 서열의 범용화
- [0078] 2. 새로운 MOA (mechanism of action)에 의한 EGFR 활성 저해
- [0079] 3. 기존 항 HER2 항체 또는 항 EGFR 치료제 보다 증가된 암세포 억제 효과.
- [0080] 4. 기존 항 HER2 항체 또는 항 EGFR 치료제에 대하여 내성을 가진 암세포의 억제 효과.
- [0081] 5. 항 EGFR 항체 및 항 HER2 항체의 병용투여와 비교하여 우수한 효능을 발휘하는 IgG-DARPIns 형태의 이중 특이 항체 확보.

### **도면의 간단한 설명**

[0082] 도 1은 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 제조 과정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 물성을 보여주는 결과이다.

도 3은 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 Biacore로 측정된 EGFR 및 HER2에 대한 친화도를 보여주는 결과이다.

도 4는 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 MKN45 세포주에 대한 증식 저해 정도를 보여주는 그래프이다.

도 5는 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 SNU638 세포주에 대한 증식 저해 정도를 보여주는 그래프이다.

도 6은 일 실시예에 따른 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 N87 세포주에 대한 증식 저해 정도를 보여주는 그래프이다.

도 7은 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체에 의한 EGFR과 HER2의 Internalization을 보여주는 형광 이미지이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0083] 이하 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0084] **실시예 1: 항 HER2/항 EGFR DARPin 이중 특이 항체의 제작**

[0085] Herceptin(Roche)의 c-말단에 항 EGFR DARPins (서열번호 1)을 융합시켜 항 HER2 항체/항 EGFR DARPin 융합체 (항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체)를 제작하였다 (도 1 참조). Herceptin 항체의 중쇄와 항 EGFR DARPin을 10 개의 아미노산으로 구성된 'GGGSGGGGS' [(G4S)2] 링커를 이용하여 연결하여 'Herceptin-중쇄-(G4S)2-항EGFR DARPins'의 형태로 제작하였다.

[0086] 상기 제작된 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체를 H2E-01이라 명명하였다.

[0087] **실시예 2: 항 HER2/항 EGFR DARPin 이중 특이 항체의 물성 및 EGFR 친화도**

[0088] 상기 실시예 1에서 제조된 항 HER2/항 EGFR DARPin 이중 항체의 물성을 살펴보기 위하여, 상기 항체를 정제하고, TSKG3000SWXL 컬럼 (Tosho)이 장착된 HPLC 장비 (WATERS 2695)에 20ug의 항체를 0/5 ml/min의 속도로 주입하여 HPLC를 사용하여 Size Exclusion Chromatography를 수행하였다.

[0089] 상기 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 "1"은 가용성 다이머(soluble dimer)에 대한 peak 정량값, "2"는 모노머에 대한 peak 정량값을 나타낸다. 도 2에서 보여지는 바와 같이, 상기 선발된 항 HER2/항 EGFR DARPin은 가용성 다이머의 형성이 매우 적은 것으로 (<1) 관찰되어 매우 안정한 분자임을 알 수 있다.

[0090] 상기 제작된 항 HER2/항 EGFR DARPin 이중항체의 두 가지 항원(HER2/EGFR)에 대한 각 친화도를 Biacore T100(GE)을 사용하여 확인하였다. 인간 Fab 결합제(GE Healthcare)를 CM5 칩(#BR-1005-30, GE)의 표면에 제조사 설명서에 따라서 고정화시켰다. 약 90~120 RU의 이중항체를 포획하고, 다양한 농도의 EGFR-Fc (#344-ER, R&D Systems)을 상기 포획된 항체에 주입하였다. 여기에 10mM Glycine-HCl(pH 1.5) 용액을 주입하여 상기 표면을 재생시켰다(regenerated). 친화도를 측정하기 위하여, 상기 실험에서 얻어진 데이터를 BIAevaluation software(GE Healthcare, Biacore T100 evaluation software)를 사용하여 fitting하였다.

[0091] 상기 얻어진 결과를 아래의 표 1 및 도 3에 나타내었다.

**표 1**

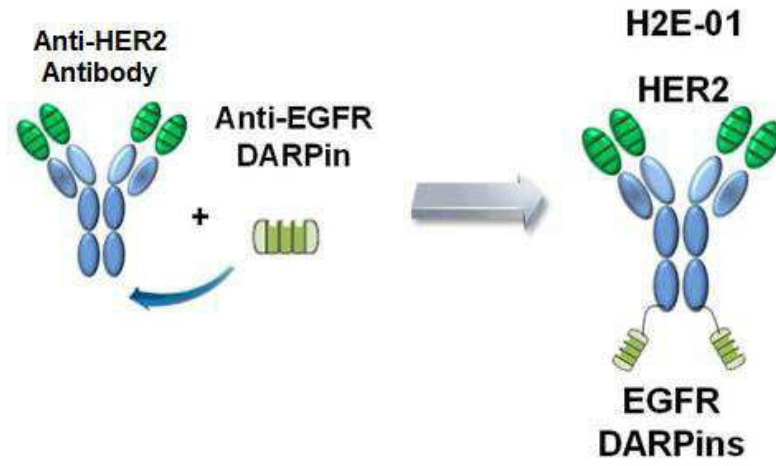
| Sample        | Antigen | Flow Cell | R <sub>max</sub> (RU) | K <sub>D</sub> (nM) | k <sub>a</sub> (1/Ms) | k <sub>d</sub> (1/s)  | Chi <sup>2</sup> | U-Value | T(k <sub>a</sub> )  | T(k <sub>d</sub> ) |
|---------------|---------|-----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|---------|---------------------|--------------------|
| H2E-01 130522 | EGFR-Fc | #4-#1     | 78.89                 | 0.03                | 1.0x10 <sup>5</sup>   | <2.8x10 <sup>-5</sup> | 1.58             | 95      | 6.2x10 <sup>2</sup> | 1.2                |
|               | Her2-Fc | #2-#1     | 80.45                 | <0.01               | 6.9x10 <sup>5</sup>   | <7.5x10 <sup>-5</sup> | 1.56             | 95      | 9.8x10 <sup>2</sup> | 1.4                |

[0092]

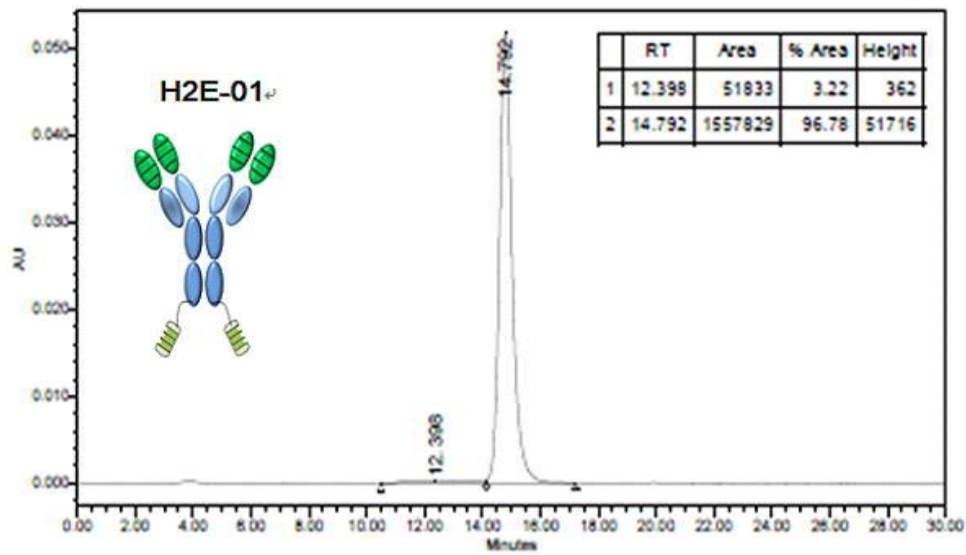
- [0093] 상기 표 1 및 도 3에서 확인되는 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제작된 이중 특이 항체는, Biacore를 사용하여 측정시, EGFR 및 HER2에 대하여 각각  $K_d=0.03nM$  및  $K_d<0.01nM$ 의 매우 높은 친화도를 보유하는 것으로 나타났다.
- [0094] **실시예 3: 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체의 세포 증식 저해 효과 시험**
- [0095] 상기 실시예 1에서 제작된 이중 특이 항체 H2E-01의 암세포 증식 저해 효과를 시험하기 위하여 MKN45 세포주(한국세포주은행 KCLB No.80103), SNU638 세포주(한국세포주은행 KCLB No.00683), 및 N87 세포주(ATCC No. CRL-5822)에 대한 세포 증식 저해 효과를 시험하였다.
- [0096] MKN45 세포주, SNU638 세포주 및 N87 세포주를 각각 RPMI1640 배지 (#11875-093, Gibco)에 10%(v/v) FBS와 1%(v/v) Penicilin-Streptomycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 및 37 °C 조건에서 배양하였다. 세포 증식 분석(Cell proliferation assay)를 위하여, 각 세포주들을  $1 \times 10^4$  cell/well의 농도로 96 웰 플레이트에서 계대배양하면서 실시예 1에서 제작된 H2E-01를 5 ug/ml의 양으로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 음성 대조군으로 항체를 첨가하지 않은 배지를 사용하고, 양성 대조군으로 시판중인 EGFR 저해제인 Erbitux (#ET509081213, Merck; 5 ug/ml) 처리군, HER2 저해제인 Herceptin (Trastuzumab, Roche; 5 ug/ml) 처리군, 및 Herceptin 항체와 Erbitux 항체와의 병용 처리군을 각각 사용하였다.
- [0097] 배양 후 Cell Counting Kit-8 assay (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 세포 증식 정도를 분석하였다. 간략하게 설명하면, 72시간 배양 후 CCK8 solution을 10  $\mu$ L씩 각 well에 첨가하여 2.5시간을 추가 배양한 후, microplate reader로 450 nm에서의 흡광도를 읽었다.
- [0098] 상기 얻어진 결과를 도 4 (MKN45), 도 5(SNU638), 및 도 6(N87)에 나타내었다. 도 4 내지 6에서와 같이, 항 HER2/항 EGFR DARP인 이중항체는 MKN45 SNU638, N87와 같은 위암세포에서 Herceptin 및 Erbitux의 단독 투여 및 병용 투여시보다 우수한 항암 효능을 보이는 것이 확인되었다. 또한, Herceptin 단독으로는 이들 위암 세포에 유의미한 증식 저해효과를 보이지 못하였지만, 항 EGFR DARP인과 융합된 형태로는 현저한 증식 저해효과를 보임을 확인하여, 항 EGFR DARP인이 Herceptin의 효능을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0099] **실시예 4: 항 HER2/항 EGFR 이중 특이 항체에 의한 HER2와 EGFR의 Internalization**
- [0100] MKN45 위암 세포주(한국세포주은행 KCLB No.80103)를  $4 \times 10^4$  cell/well의 양으로 준비하고, 여기에 Trastuzumab (Roche), Cetuximab (#ET509081213, Merck), 및 실시예 1에서 제작된 항 HER2/항 EGFR DARP인 이중항체 H2E-01을 각각 단독 처리 또는 병용 처리의 방법으로 각 웰당 1 ug/ml의 농도가 되도록(병용처리의 경우 각각 1 ug/ml이 되도록) 첨가하고, 2시간 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 여기에 4%(v/v) formaldehyde를 15분 동안 처리하여 세포를 플레이트에 고정시키고, PBS로 3번 세척하였다. 그 후, 블로킹 버퍼(0.5%(v/v) triton x-100 and 5%(v/v) donkey serum)를 상온에서 1시간 동안 처리한 후, HER2 및 EGFR에 대한 1차 항체 (HER2 1차 항체: #280003Z, Invitrogen; EGFR 1차 항체: #5616, Cell signaling)를 1:100으로 희석하여 100 ul(microliter)의 양으로 15시간 동안 4°C에서 처리하였다. PBS로 3번 세척한 후, 2차 항체 (#A21433, Invitrogen)를 1:2000으로 희석하여 100 ul의 양으로 1시간 동안 상온에서 처리하고, 다시 PBS로 3번 세척하여 mounting medium (#H-1200, Vector)으로 plate를 준비하였다. 상기 준비된 세포를 Confocal 현미경 (Zeiss, LSM710)으로 세포를 관찰하였다.
- [0101] 상기 얻어진 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, Herceptin과 Erbitux 병용 처리한 경우 EGFR과 HER2가 여전히 세포막에 위치하는 반면, 이중항체를 처리하는 경우에는 EGFR과 HER2가 세포 내로 이동함을 확인할 수 있다.
- [0102] 상기 결과를 종합해 보면 DARP인이 적용된 항 HER2/항 EGFR DARP인 이중항체는 기존의 EGFR 또는 HER2 저해 항체와는 다른 메커니즘에 의하여 EGFR과 HER2의 기능을 저해하는 것으로 보인다.

도면

도면1

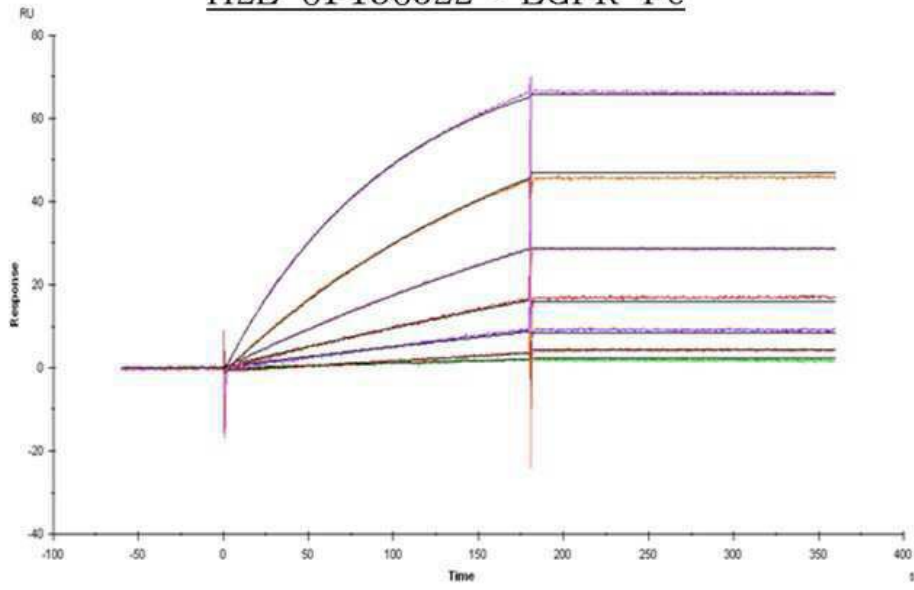


도면2

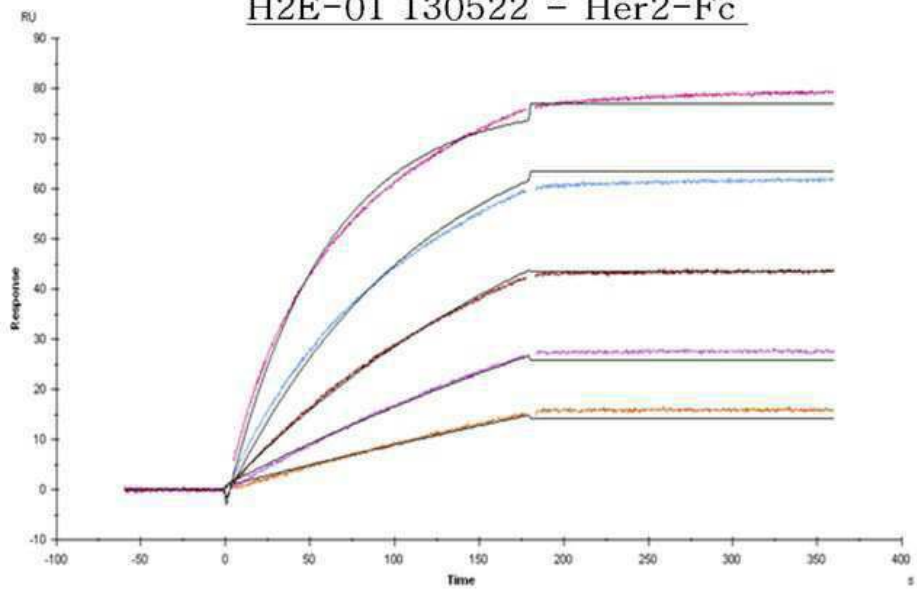


도면3

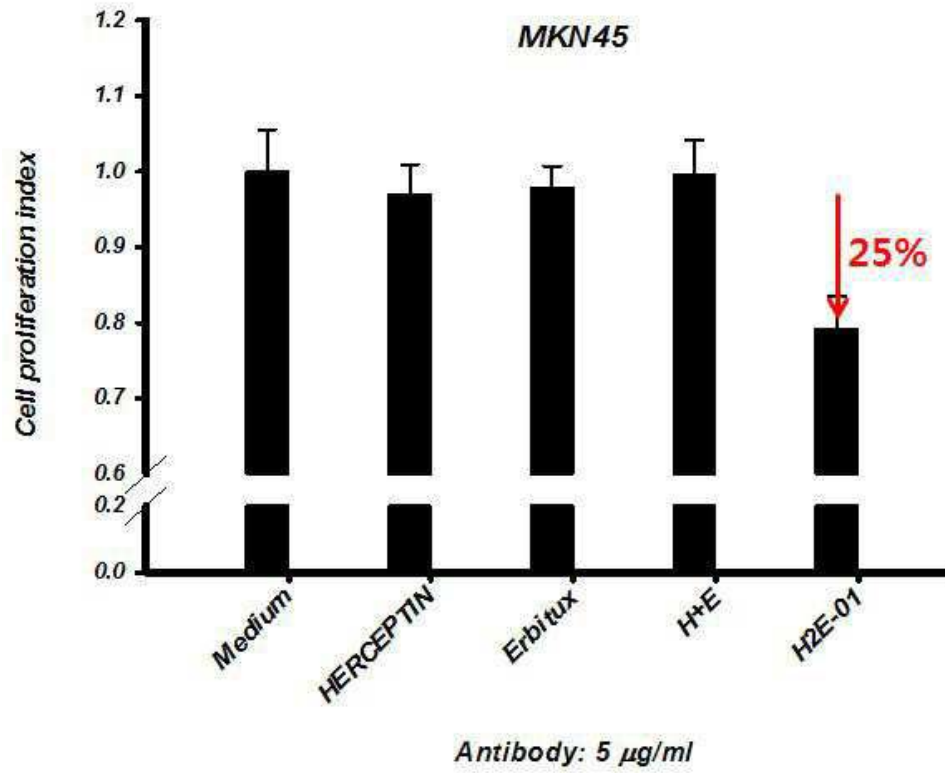
H2E-01 130522 - EGFR-Fc



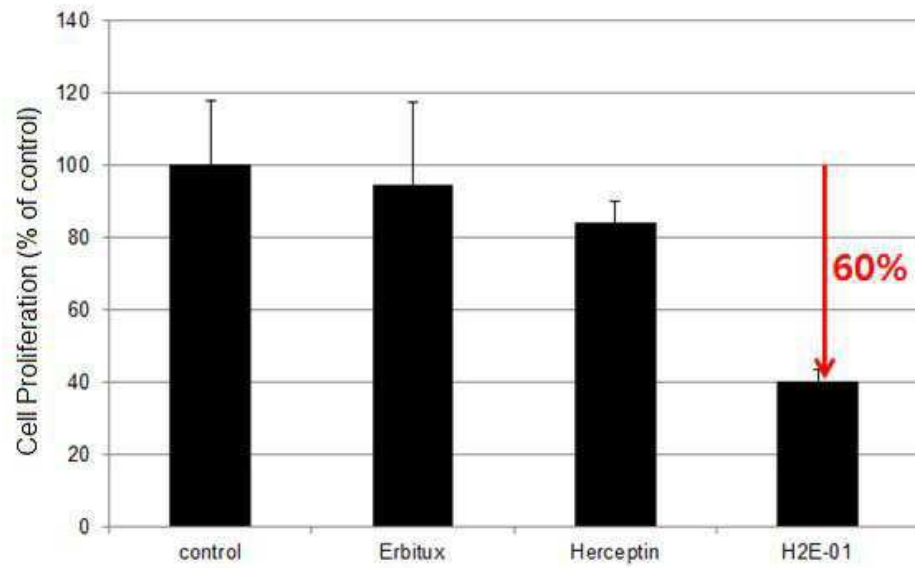
H2E-01 130522 - Her2-Fc



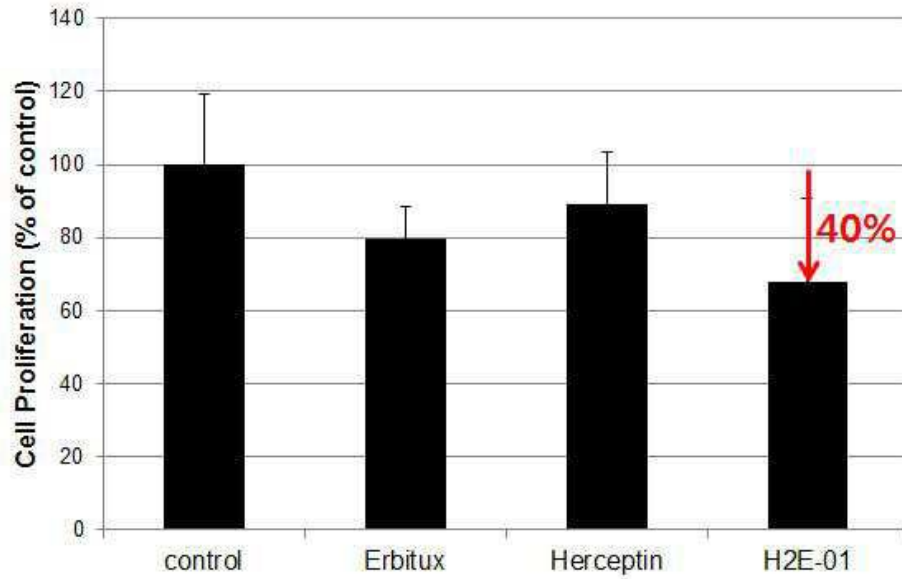
도면4



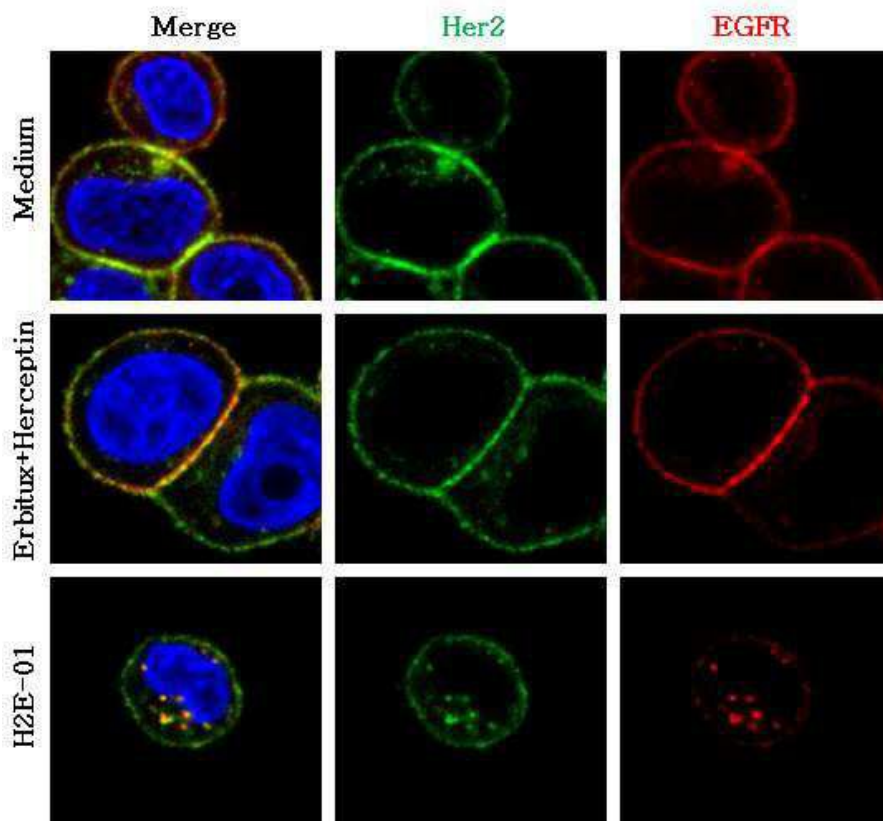
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> Samsung Electronics Co. Ltd

<120> Anti-EGFR/Anti-HER2 Bispecific Antibodies With Anti-EGFR DARPins



<130> DPP20133910KR

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR DARPin-01

<400> 1

Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp

1 5 10 15

Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp

20 25 30

Thr Trp Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Gln Gly His Leu

35 40 45

Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Tyr

50 55 60

Asp Tyr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Gly His Leu

65 70 75 80

Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Ser

85 90 95

Asp Tyr Ile Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Asn Gly His

100 105 110

Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala

115 120 125

Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly

130 135 140

Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln

145 150

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-EGFR DARPin-67

<400> 2

Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp

1 5 10 15  
 Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp  
 20 25 30  
 Asn Asp Gly Asn Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Trp Ile Gly His Leu  
 35 40 45  
 Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp  
 50 55 60  
 Asp Leu Leu Gly Met Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Thr Gly His  
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala  
 85 90 95  
 Arg Asp Thr Arg Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asp Gly  
 100 105 110  
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Asp Ala Asp Val Asn  
 115 120 125  
 Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn  
 130 135 140  
 Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln

145 150

<210> 3

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-EGFR DARPin-68

<400> 3

Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp

1 5 10 15  
 Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Phe Asp  
 20 25 30

Tyr Trp Gly Met Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Asn Gly His Leu  
 35 40 45

Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ser  
 50 55 60

Asp Asn Phe Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Tyr Gly His  
 65 70 75 80

Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala  
 85 90 95

Phe Asp Met Trp Gly Asn Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Asn Gly  
 100 105 110

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn

115 120 125  
 Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn  
 130 135 140

Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln  
 145 150

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-EGFR DARPin-69

<400> 4

Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp  
 1 5 10 15

Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp

20 25 30  
 Asn Ala Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Phe Gly His Leu

35 40 45  
 Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys

50 55 60  
 Gly His His Cys Asn Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Ala Gly His

65 70 75 80

Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala  
 85 90 95

Asp Asp Asp Glu Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Ile Gly  
 100 105 110

Asp Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn  
 115 120 125

Ala Trp Asp Met Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Ala  
 130 135 140

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val  
 145 150 155 160

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp  
 165 170 175

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln  
 180 185

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region of anti-HER2 antibody

<400> 5

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region of anti-HER2 antibody

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 7

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region of Trastuzumab

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
                   20                                  25                                  30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                                  40                                  45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                                  55                                  60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                                  90                                  95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                   100                                  105                                  110  
  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
                   115                                  120                                  125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
                   130                                  135                                  140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
                                   165                                  170                                  175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
                   180                                  185                                  190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
                   195                                  200                                  205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
                   210                                  215                                  220  
 <210> 8  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Light chain variable region of Trastuzumab  
 <400> 8

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

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

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of Pertuzumab

<400> 9

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



225                      230                      235                      240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                                  245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                                  260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                                  275                      280                      285  
  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                                  290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
                                  325                      330                      335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
                                  340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
  
                                  355                      360                      365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
                                  370                      375                      380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                                  405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                                  420                      425                      430  
  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                                  435                      440                      445  
 <210>    10  
 <211>    214  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Light chain of Pertuzumab

<400> 10  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> modified hinge region(U7-HC6)  
 <400> 11  
 Glu Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> modified hinge region(U6-HC7)  
 <400> 12  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 <210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> modified hinge region(U3-HC9)  
 <400> 13  
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 <210> 14  
 <211> 14  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><  
 223> modified hinge region(U6-HC8)  
 <400> 14  
 Glu Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 <210> 15  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> modified hinge region(U8-HC5)

<400> 15

Glu Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human hinge region

<400> 16

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10                    15